UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração - Desenvolvimento de Processos Químicos

Estudo da imobilização de células de Saccharomyces cerevisiae em suportes no

processo de fermentação alcoólica

Juliana Canto Duarte

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Paim Valença

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química

Campinas - São Paulo

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA

BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

	Duarte, Juliana Canto
D85e	Estudo da imobilização de células de Saccharomyces cerevisiae em suportes no processo de fermentação alcoólica / Juliana Canto DuarteCampinas, SP: [s.n.], 2011.
	Orientador: Gustavo Paim Valença. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.
	 Imobilização. Saccharomyces cerevisiae. Alcool fermentação. Etanol. Alginatos. Valença, Gustavo Paim. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. Título.

Título em Inglês: Study of immobilized Saccharomyces cerevisiae cells in supports for alcoholic fermentation

Palavras-chave em Inglês: Immobilization, Saccharomyces cerevisiae, Alcohol fermentation, Ethanol, Alginates

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora: Telma Teixeira Franco, José Augusto Rosário Rodrigues

Data da defesa: 22-11-2011

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de mestrado defendida por Juliana Canto Duarte e aprovada em 22 de

novembro de 2011 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. Gustavo Paim Valença Orientador – Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Telma Teixeira Franco Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP

Prof. Dr. José Augusto Rosário Rodrigues

Instituto de Química/UNICAMP

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Juliana Canto Duarte e aprovada em 22 de novembro de 2011

pela banca examinadora.

Prof. Dr. Gustavo Paim Valença

Orientador – Faculdade de Engenharia Química/UNICAMP

Dedico este trabalho aos meus pais,

Véra Lúcia e José Henrique,

Por acreditarem e por sempre incentivarem os meus estudos!

Agradeço

Aos meus pais, José Henrique e Véra Lúcia, pelo apoio incondicional, pelo exemplo de honestidade e amor, pela dedicação e compreensão, por acreditarem neste trabalho e por me acompanharem.

Ao Marcelo por sempre me fazer seguir em frente, por entender, respeitar, por me motivar, por acreditar em mim, me apoiar e por todo amor! Obrigada por cuidar de mim! O melhor lugar é aqui... E o melhor momento é agora...

Ao meu irmão Henrique por sempre me ajudar, me ensinar e pela paciência comigo! Obrigada Tatinho!^^

Ao querido orientador professor Dr. Gustavo Paim pela oportunidade que me foi dada, por sempre me incentivar, pela confiança depositada em mim, pelos ensinamentos e respeito. Muito obrigada pela excelente orientação!

Em especial aos queridos professores Dr. José Augusto R. Rodrigues e Dr. Paulo José S. Moran agradeço imensamente pelos ensinamentos, por terem me recebido em seu laboratório, por terem contribuído tanto com o desenvolvimento deste trabalho tanto na parte experimental como na parte escrita. Por todo o ensinamento, estímulo e acompanhamento. Agradeço!

Ao querido professor Nunhez por se envolver neste trabalho com tanta motivação, por me ajudar com os parâmetros das fermentações e com a análise dos resultados. Obrigada!

Aos colegas do LaBiosin – IQ - Unicamp e LEPAC – FEQ - Unicamp, por me ajudarem nos experimentos e análises de resultados, pelo carinho e amizade.

Ao CNPq, CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro concedido para este trabalho.

vi

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original."

(Albert Einstein)

"O ser humano vivencia a si mesmo, seus pensamentos como algo separado do resto do universo numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. E essa ilusão é uma espécie de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar completamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior."

(Albert Einstein)

"Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino."

(Leonardo da Vinci)

"Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas. Muito conhecimento, que se sintam humildes. É assim que as espigas sem grãos erguem desdenhosamente a cabeça para o Céu, enquanto que as cheias as baixam para a terra, sua mãe."

(Leonardo da Vinci)

Resumo

A utilização de sistemas empregando células de levedura imobilizadas é uma técnica promissora para a produção de etanol. Este trabalho apresenta a proposta de imobilizar células de Saccharomyces cerevisiae em montmorilonita K10, em óxido de zircônio, em esferas de alginato de cálcio e em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana, utilizando glicose e sacarose como fontes de carbono, a fim de observar o comportamento destas células nestes suportes. Estudos nesta área têm demonstrado que células imobilizadas apresentam maior resistência a variações de temperatura, atividade, concentração de substratos e metabólitos, além de um alto rendimento para fermentação alcoólica. A montmorilonita K10, o alginato de sódio e a quitosana que foram utilizados nos estudos tiveram origem comercial, enquanto que o óxido de zircônio foi sintetizado e caracterizado através de Difração de Raios-X (DRX) e área superficial B.E.T. (Brunauer, Emmet e Teller). Células de Saccharomyces cerevisiae liofilizada não aderiram aos suportes sólidos (montmorilonita K10, óxido de zircônio e óxido de zircônio com superfície modificada). Já a cepa JAY 270 de Saccharomyces cerevisiae foi imobilizada com sucesso em esferas de alginato de cálcio e em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana. Estudos de fermentação em regime batelada foram conduzidos em shaker orbital para avaliação da produção de etanol, estabilidade, rendimento, taxa de consumo de substratos e taxa de produção de produto. O comportamento destes sistemas foi avaliado através de dados de concentração de substrato e produto em equipamento de HPLC (High-Performance Liquid Chromatograph). A imobilização celular em esferas de alginato de cálcio e em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana permitiu a reutilização das esferas durante oito ciclos de fermentação de aproximadamente 10 horas cada. A produção de etanol para células livres foi 40 g/L e o rendimento foi de 78% e 74,3% utilizando a glicose e a sacarose como fontes de carbono, respectivamente. Para as células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio, utilizando a glicose como fonte de carbono, a produção de etanol foi de 33 g/L e o rendimento foi de 64,6 %, utilizando a sacarose, a produção de etanol foi de 33 g/L e o rendimento foi de 61,3%. Para as células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana, utilizando a glicose como fonte de carbono, a produção de etanol foi de 31 g/L e o rendimento foi de 60,7 % e utilizando a sacarose, a produção de etanol foi de 32 g/L e o rendimento foi de 59,5%.

Palavras chave: imobilização, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentação, produção de etanol, montmorilonita, óxido de zircônio, alginato de cálcio, quitosana.

Abstract

The use of immobilized yeast cells in supports systems is a promising technique for the ethanol production. This work proposes to immobilize Saccharomyces cerevisiae cells in montmorillonite K10, zirconium oxide, calcium alginate beads and chitosan covered calcium alginate beads, using glucose and sucrose as carbon sources, in order to observe the behavior of these cells in these media. Studies in this area have demonstrated that immobilized cells are more resistant to temperature, activity, concentration of substrates and metabolites, and a high yield for ethanol fermentation. The montmorillonite K10, sodium alginate and chitosan have been used in the studies had commercial origin, while the zirconium oxide was synthesized and characterized by X-ray Diffraction (XRD) and B.E.T. surface area (Brunauer, Emmet and Teller). Liofilized Saccharomyces cerevisiae did not adhere to solid supports (K10 montmorillonite, zirconium oxide and modified surface zirconium oxide). Since the strain of Saccharomyces cerevisiae, JAY 270, was successfully immobilized in calcium alginate beads and in chitosan covered calcium alginate beads. Studies under batch fermentation were conducted in orbital shaker for evaluation of ethanol production, stability, efficiency, substrate consumption rate and the product production rate. The behavior of these systems was assessed using concentration data of substrate and product in the HPLC equipment (High-performance liquid chromatography). The cell immobilization in calcium alginate beads and chitosan covered calcium alginate beads allowed reusing of the beads during fermentation of eight cycles every 10 hours. The production of ethanol to free cells was 40 g/L and 78% and 74.3% yield using the glucose and sucrose as carbon sources, respectively. For immobilized cells in calcium alginate beads, ethanol production was 33 g/L and 64.6% yield and 33 g/L and 61.3% yield, using glucose and sucrose, respectively. For immobilized cells in chitosan covered calcium alginate beads, ethanol production was 31 g/L and 60.7% yield and 32 g/L and 59.5% yield, using glucose and sucrose, respectively.

Key words: immobilization, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation, ethanol production, montmorillonite, zirconium oxide, calcium alginate, chitosan.

Lista de Figuras	XV
Lista de Tabelas	xxi
Nomenclatura	xxxix
Letras Gregas	xl
1. Introdução	1
1.1 Apresentação do problema	1
1.2 Justificativa e importância	3
1.3 Objetivos do trabalho	3
2. Revisão bibliográfica	4
2.1 Biocatálise	4
2.1.1 Vantagens e desvantagens do uso de biocatalisadores (enzimas ou microrg	ganismos) 5
2.1.2 Imobilização de biocatalisadores	8
2.1.3 Métodos de imobilização de biocatalisadores	9
2.1.4 Algumas considerações a serem observadas nas reações biocatalisadas	10
2.1.5 Escolha do tipo de biocatalisador (enzimas ou microrganismos)	11
2.2 Cinética das reações enzimáticas	12
2.2.1 Catalisadores reduzem ΔG^{\dagger}	17
2.3 Produção de etanol	19
2.3.1 Aspectos econômicos	19
2.4 Fermentação alcoólica	21
2.4.1 Processos de fermentação alcoólica	21
2.4.1.1 Fermentação em batelada	21
2.4.1.2 Fermentação contínua	22
2.4.1.3 Fermentação em batelada alimentada	23
2.4.2 Cinética de fermentação alcoólica	24
2.4.2 Fermentação com células imobilizadas	24
2.4.2.1 Vantagens do uso de células imobilizadas	25
2.5 A montmorilonita	25
2.6 O óxido de zircônio (ZrO ₂)	27
2.7 O alginato	

Sumário

	2.7.1 Formação do gel de alginato de cálcio	. 30
	2.8 A quitosana	. 32
	2.8.1 Interação entre alginato de cálcio e quitosana	. 34
	2.9 O microrganismo – Saccharomyces cerevisiae	. 37
	2.9.1 Interação microrganismo/suporte	. 38
	2.10 Mecanismos da imobilização por adsorção	. 38
	2.11 Imobilização de células microbianas por aprisionamento em matrizes poliméricas	. 40
3.	Parte Experimental	. 41
	3.1 Materiais e Reagentes	. 41
	3.2 Instrumentos	. 43
	3.3 Microrganismos	. 45
	3.4 Meio de crescimento	. 46
	3.5 Meio de fermentação com glicose	. 46
	3.6 Meio de fermentação com sacarose	. 46
	3.7 Montmorilonita K 10	. 46
	3.8 Síntese do óxido de zircônio	. 46
	3.8.1 Difratograma de raio X	. 47
	3.8.2 Determinação da área superficial B.E.T.	. 48
	3.8.3 Determinação do potencial zeta (ζ) do óxido de zircônio	. 48
	3.9 Imobilização das células de <i>S. cerevisiae</i> em montmorilonita K 10	. 48
	3.9.1 Determinação da proporção ideal de células de S. cerevisiae e montmorilonita K10	. 48
	3.10 Imobilização de <i>S. cerevisiae</i> em óxido de zircônio	. 49
	3.10.1 Modificação da superfície do óxido de zircônio com hidróxido de sódio	. 50
	3.10.1.1 Determinação do volume do ponto úmido do óxido de zircônio	. 50
	3.10.1.2 Impregnação do óxido de zircônio com hidróxido de sódio	. 51
	3.10.1.3 Determinação do potencial zeta (ζ) do óxido de zircônio modificado com hidróx de sódio	kido
	3 10 2 Imobilização de S. cerevisiae em óxido de zircônio modificado com hidróxido de sód	io
		. 53
	3.11 Experimentos de fermentação	. 53
	3.11.1 Fermentação com células livres	. 53
	3.11.1.1 Pré-inóculo	. 53

3.11.1.2 Inóculo	
3.11.1.3 Meio de fermentação com glicose	
3.11.1.4 Meio de fermentação com sacarose	55
3.11.1.5 Fermentação das células livres	55
3.11.1.5.1 Fermentação das células livres utilizando a glicose como fonte de c	arbono 55
3.11.1.5.2 Fermentação das células livres utilizando a sacarose como fonte de	carbono56
3.11.2 Fermentação com células imobilizadas	
3.11.2.1 Pré-inóculo	56
3.11.2.2 Inóculo	56
3.11.2.3 Esferas de alginato de cálcio	56
3.11.2.3.1 Solução 3% de alginato de sódio de média viscosidade	57
3.11.2.3.2 Solução 2% de cloreto de cálcio	57
3.11.2.3.3 Síntese das esferas de alginato de cálcio	57
3.11.2.4 Esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana	59
3.11.2.4.1 Solução de quitosana 0,25% de médio peso molecular	59
3.11.2.4.2 Síntese das esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana	60
3.11.2.5 Meio de fermentação com glicose	60
3.11.2.6 Meio de fermentação com sacarose	61
3.11.2.7 Fermentação das células imobilizadas	61
3.11.2.8 Ciclos de fermentação	62
3.11.2.8.1 Oito ciclos de fermentação de 10 horas cada – glicose e sacarose co de carbono	omo fontes 62
3.13.3 Crescimento celular no interior das esferas	63
3.11.2.8.2 Três ciclos de fermentação de 2 horas cada – glicose como fonte de	e carbono 63
3.12 Preparo das amostras das fermentações para análise em HPLC	64
3.13 Análise do consumo do substrato e da produção do produto das fermentações e	em HPLC 64
3.13.1 Construção da curva de calibração do etanol, da glicose e da sacarose	65
3.13.2 Análise das amostras das fermentações	66
3.14 Análise em Espectrofotômetro	66
3.14.1 Construção da curva de calibração de S. cerevisiae	66
3.14.2 Análise das amostras das fermentações	

4. Resultados e Discussões67
4.1 Síntese do óxido de zircônio67
4.1.1 Difratograma de raios – X67
4.1.2 Determinação da área superficial B.E.T
4.1.3 Determinação do potencial zeta (ζ) do óxido de zircônio
4.2 Imobilização das células de <i>S. cerevisiae</i> em montmorilonita K 10
4.2.1 Determinação da proporção ideal de células de S. cerevisiae e montmorilonita K10 71
4.3 Imobilização de <i>S. cerevisiae</i> em óxido de zircônio73
4.3.1 Modificação da superfície do óxido de zircônio com hidróxido de sódio
4.3.1.1 Determinação do volume do ponto úmido do óxido de zircônio
4.3.1.2 Impregnação do óxido de zircônio com hidróxido de sódio
4.3.1.3 Determinação do potencial zeta (ζ) do óxido de zircônio modificado com hidróxido de sódio
4.3.2 Imobilização de S. cerevisiae em óxido de zircônio modificado com hidróxido de sódio 76
4.4 Experimentos de fermentação77
4.4.1 Fermentação com células livres77
4.4.1.1Fermentação das células livres utilizando a glicose como fonte de carbono 77
4.4.1.2 Fermentação das células livres utilizando a sacarose como fonte de carbono 78
4.4.2 Fermentação com células imobilizadas79
4.4.2.1Fermentação das células imobilizadas utilizando a glicose como fonte de carbono 79
4.4.2.2Fermentação das células imobilizadas utilizando a sacarose como fonte de carbono
4.4.2.3 Ciclos de fermentação80
4.5 Análise do consumo do substrato e da produção do produto das fermentações em HPLC 81
4.5.1 Construção da curva de calibração do etanol, da glicose e da sacarose
4.5.2 Análise das amostras das fermentações90
4.5.2.1 Análise das fermentações para células livres90
4.5.2.1.1 Fermentação das células livres utilizando a glicose como fonte de carbono 90
4.5.2.1.2 Fermentação das células livres utilizando a sacarose como fonte de carbono.92
4.5.2.2 Análise das fermentações para células imobilizadas
4.5.2.2.1 Fermentação das células imobilizadas utilizando a glicose como fonte de carbono durante oito ciclos de fermentação de 10 horas cada

4.5.2.2.2 Fermentação das células imobilizadas utilizando a sacarose como fonte de
4.5.2.2.3 Crescimento celular no interior das esferas
4.5.2.2.4 Fermentação das células imobilizadas utilizando a glicose como fonte de
carbono durante três ciclos de fermentação de 2 horas
4.6 Análises em Espectrofotômetro152
4.6.1 Construção da curva de calibração de S. cerevisiae152
4.6.2 Análise das amostras das fermentações153
4.6.2.1 Análise das fermentações para células livres153
4.6.2.1.1 Fermentação das células livres utilizando a glicose como fonte de carbono 153
4.6.2.1.2 Fermentação das células livres utilizando a sacarose como fonte de carbono155
4.6.2.2 Análise das fermentações para células imobilizadas
4.6.2.2.1 Fermentação das células imobilizadas utilizando a glicose como fonte de
carbono durante oito ciclos de fermentação de 10 horas cada
4.6.2.2.2 Fermentação das células imobilizadas utilizando a sacarose como fonte de
carbono durante oito ciclos de fermentação de 10 horas cada
5. Considerações finais
6. Conclusões e sugestões para próximos trabalhos180
7. Referências bibliográficas

Lista de Figuras

Figura 01: Métodos de imobilização celular.

Figura 02: Diagrama do estado de transição. (a) A reação H + H₂. Os reagentes e produtos correspondem às estruturas de baixa energia livre. O ponto de mais alta energia é o estado de transição, no qual os reagentes são parcialmente convertidos a produtos. ΔG^{\dagger} é a energia livre de ativação, a diferença de energia livre entre os reagentes e o estado de transição, X[†]. (b) Diagrama do estado de transição para a reação A + B → P + Q. Esta é uma reação espontânea; isto é, $\Delta G_{reação} < 0$ (a energia livre de P + Q é menor do que a energia livre de A + B).

Figura 03: Diagrama do estado de transição para uma reação de duas etapas. A curva em azul representa uma reação ($A \rightarrow I \rightarrow P$), cuja primeira etapa determina a velocidade da reação, e a curva em vermelho representa uma reação cuja segunda etapa determina a velocidade da reação.

Figura 04: Efeito de um catalisador no diagrama do estado de transição de uma reação. Aqui $\Delta\Delta G_{cat}^{\dagger} = \Delta G_{(uncat)}^{\dagger} - \Delta G_{(cat)}^{\dagger}$.

Figura 05: Estrutura da montmorilonita.

Figura 06: Óxido de zircônio cúbico (a), Óxido de zircônio tetragonal (b), Óxido de zircônio monoclínico (c).

Figura 07: Estrutura do alginato.

Figura 08: Estrutura molecular do alginato de sódio.

Figura 09: Esquema das ligações cruzadas no gel de alginato de cálcio.

Figura 10: Ilustração esquemática da versatilidade da quitosana em diferentes condições de pH.

Figura 11: Estrutura da quitosana.

Figura 12: Representação esquemática da formação dos complexos de polieletrólitos (PEC) entre as cadeias de alginato e quitosana.

Figura 13: Estrutura e comportamento de inchamento (sensível a variações de pH) dos complexos polieletrólitos contendo quitosana e alginato; as elipses representam as interações iônicas entre as cargas negativas do alginato (-) e as cargas positivas da quitosana (+).

Figura 14: Aparato para a síntese das esferas de alginato de cálcio.

Figura 15: Aparato utilizado para o gotejamento e produção das esferas de alginato de cálcio.

Figura 16: Difratogramas de Raios-X das amostras de óxido de zircônio sintetizadas (Amostra A e Amostra B) e Difratograma de Raiosx do padrão 01-0750.

Figura 17: Curva de calibração para a glicose.

Figura 18: Curva de calibração para o etanol.

Figura 19: Curva de calibração para a glicose.

Figura 20: Curva de calibração para a sacarose.

Figura 21: Curva de calibração para o etanol.

Figura 22: Curva de calibração para a glicose.

Figura 23: Curva de calibração para a sacarose.

Figura 24: Curva de calibração para o etanol.

Figura 25: Gráfico apresentando o consumo de glicose e a produção de etanol durante 10 horas de fermentação utilizando células livres.

Figura 26: Gráfico apresentando o consumo de sacarose e a produção de etanol durante 10 horas de fermentação utilizando células livres.

Figura 27: Gráfico apresentando o consumo de glicose durante 10 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio.

Figura 28: Gráfico apresentando a produção de etanol durante 10 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio.

Figura 29: Gráfico apresentando a produção de etanol obtida no final de 10 horas de cada ciclo de fermentação (total de 8 ciclos), durante 10 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio.

Figura 30: Esferas de alginato de cálcio em meio de fermentação ao final do primeiro ciclo (Imagem à esquerda); esferas de alginato de cálcio em meio de fermentação ao final do oitavo ciclo (Imagem à direita).

Figura 31: Gráfico apresentando o consumo de glicose durante 10 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.

Figura 32: Gráfico apresentando a produção de etanol durante 10 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.

Figura 33: Gráfico apresentando a produção de etanol obtida no final de 10 horas de cada ciclo de fermentação (total de 8 ciclos), durante 10 horas de fermentação

xvii

utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.

Figura 34: Esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana em meio de fermentação após 2 horas do primeiro ciclo (Imagem à esquerda); esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana em meio de fermentação ao final do oitavo ciclo (Imagem à direita).

Figura 35: Gráfico apresentando o consumo de sacarose durante 10 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio.

Figura 36: Gráfico apresentando a produção de etanol durante 10 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio.

Figura 37: Gráfico apresentando a produção de etanol obtida no final de 10 horas de cada ciclo de fermentação (total de 8 ciclos), durante 10 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio.

Figura 38: Esferas de alginato de cálcio em meio de fermentação ao final do primeiro ciclo (Imagem à esquerda); esferas de alginato de cálcio meio de fermentação ao final do oitavo ciclo (Imagem à direita).

Figura 39: Gráfico apresentando o consumo de sacarose durante 10 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.

Figura 40: Gráfico apresentando a produção de etanol durante 10 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.

xviii

Figura 41: Gráfico apresentando a produção de etanol obtida no final de 10 horas de cada ciclo de fermentação (total de 8 ciclos), durante 10 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.

Figura 42: Esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana em meio de fermentação ao final do primeiro ciclo (Imagem à esquerda); esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana em meio de fermentação ao final do oitavo ciclo (Imagem à direita).

Figura 43: Aumento da massa das 20 esferas de alginato de cálcio e das 20 esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana ao longo do tempo total dos ciclos de fermentação.

Figura 44: Gráfico apresentando o consumo de glicose durante 2 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio.

Figura 45: Gráfico apresentando a produção de etanol durante 2 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio.

Figura 46: Gráfico apresentando a produção de etanol obtida no final de 2 horas de cada ciclo de fermentação (total de 3 ciclos), utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio.

Figura 47: Gráfico apresentando o consumo de glicose durante 2 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.

xix

Figura 48: Gráfico apresentando a produção de etanol durante 2 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.

Figura 49: Gráfico apresentando a produção de etanol obtida no final de 2 horas de cada ciclo de fermentação (total de 3 ciclos), utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.

Figura 50: Curva de calibração obtida para a *S. cerevisiae*.

Figura 51: Curva de crescimento celular para células livres. Fonte de carbono: glicose.

Figura 52: Curva de crescimento celular para células livres. Fonte de carbono: sacarose.

Figura 53: Curvas de crescimento celular para células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio.

Figura 54: Curvas de crescimento celular para células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.

Figura 55: Curvas de crescimento celular para células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio.

Figura 56: Curvas de crescimento celular para células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.

Lista de Tabelas

Tabela 01: Vantagens e desvantagens no uso de enzimas isoladas ou células inteirascomo sistema biocatalítico.

Tabela 02: Relação dos reagentes utilizados com as respectivas procedências e grau de pureza.

Tabela 03: Relação dos equipamentos utilizados com as respectivas marcas e modelos.

Tabela 04: Dados de absorbância a 0, 6 e 24 horas para os 5 sistemas preparados de células de *S. cerevisiae* e montmorilonita K 10.

Tabela 06: Dados de absorbância a 0, 2, 8 e 24 horas para o sistema preparado com 1,00 g de óxido de zircônio e células de *S. cerevisiae,* 0,8 g/L.

Tabela 07: Dados de massa e volume gasto de água determinados para quatro amostras de óxido de zircônio.

Tabela 08: Dados de absorbância no tempo inicial e após 2, 8 e 24 horas para o sistema preparado com 1,00 g de óxido de zircônio modificado e células de *S. cerevisiae*, 0,8 g/L.

Tabela 09: Valores obtidos em HPLC para os tempos de retenção de amostras padrão de etanol, glicose e sacarose.

Tabela 10: Resultados obtidos para a construção da curva de calibração para glicose e etanol.

Tabela 11: Resultados obtidos para a construção da curva de calibração para glicose,sacarose e etanol.

Tabela 12: Resultados obtidos para a construção da curva de calibração para glicose,sacarose e etanol.

Tabela 13: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células livres.

Tabela 14: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células livres.

Tabela 15: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células livres.

Tabela 16: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante aevolução da fermentação com células livres.

Tabela 17: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o primeiro ciclo de fermentação.

Tabela 18: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o primeiro ciclo de fermentação.

Tabela 19: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o segundo ciclo de fermentação.

Tabela 20: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o segundo ciclo de fermentação.

xxii

Tabela 21: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o terceiro ciclo de fermentação.

Tabela 22: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o terceiro ciclo de fermentação.

Tabela 23: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o quarto ciclo de fermentação.

Tabela 24: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o quarto ciclo de fermentação.

Tabela 25: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o quinto ciclo de fermentação.

Tabela 26: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o quinto ciclo de fermentação.

Tabela 27: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o sexto ciclo de fermentação.

xxiii

Tabela 28: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o sexto ciclo de fermentação.

Tabela 29: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o sétimo ciclo de fermentação.

Tabela 30: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o sétimo ciclo de fermentação.

Tabela 31: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o oitavo ciclo de fermentação.

Tabela 32: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o oitavo ciclo de fermentação.

Tabela 33: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o primeiro ciclo de fermentação.

Tabela 34: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o primeiro ciclo de fermentação.

xxiv

Tabela 35: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o segundo ciclo de fermentação.

Tabela 36: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o segundo ciclo de fermentação.

Tabela 37: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o terceiro ciclo de fermentação.

Tabela 38: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o terceiro ciclo de fermentação.

Tabela 39: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o quarto ciclo de fermentação.

Tabela 40: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o quarto ciclo de fermentação.

Tabela 41: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o quinto ciclo de fermentação.

Tabela 42: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o quinto ciclo de fermentação.

Tabela 43: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o sexto ciclo de fermentação.

Tabela 44: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o sexto ciclo de fermentação.

Tabela 45: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o sétimo ciclo de fermentação.

Tabela 46: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o sétimo ciclo de fermentação.

Tabela 47: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o oitavo ciclo de fermentação.

Tabela 48: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o oitavo ciclo de fermentação.

xxvi

Tabela 49: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginatov para o primeiro ciclo de fermentação.

Tabela 50: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o primeiro ciclo de fermentação.

Tabela 51: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o segundo ciclo de fermentação.

Tabela 52: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o segundo ciclo de fermentação.

Tabela 53: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o terceiro ciclo de fermentação.

Tabela 54: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o terceiro ciclo de fermentação.

Tabela 55: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o quarto ciclo de fermentação. **Tabela 56:** Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o quarto ciclo de fermentação.

Tabela 57: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o quinto ciclo de fermentação.

Tabela 58: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o quinto ciclo de fermentação.

Tabela 59: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o sexto ciclo de fermentação.

Tabela 60: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o sexto ciclo de fermentação.

Tabela 61: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o sétimo ciclo de fermentação.

Tabela 62: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o sétimo ciclo de fermentação.

xxviii

Tabela 63: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o oitavo ciclo de fermentação.

Tabela 64: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o oitavo ciclo de fermentação.

Tabela 65: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o primeiro ciclo de fermentação.

Tabela 66: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o primeiro ciclo de fermentação.

Tabela 67: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o segundo ciclo de fermentação.

Tabela 68: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o segundo ciclo de fermentação.

Tabela 69: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o terceiro ciclo de fermentação.

xxix

Tabela 70: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o terceiro ciclo de fermentação.

Tabela 71: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o quarto ciclo de fermentação.

Tabela 72: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o quarto ciclo de fermentação.

Tabela 73: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o quinto ciclo de fermentação.

Tabela 74: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o quinto ciclo de fermentação.

Tabela 75: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o sexto ciclo de fermentação.

Tabela 76: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o sexto ciclo de fermentação.

ххх

Tabela 77: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o sétimo ciclo de fermentação.

Tabela 78: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginatov revestidas com quitosana para o sétimo ciclo de fermentação.

Tabela 79: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o oitavo ciclo de fermentação.

Tabela 80: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginatov revestidas com quitosana para o oitavo ciclo de fermentação.

Tabela 81: Massa de 20 esferas de alginato de cálcio e de 20 esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana no início do primeiro ciclo e ao final dos ciclos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8. O tempo de fermentação total também está apresentado.

Tabela 82: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação durante 2 horas com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o primeiro ciclo de fermentação.

Tabela 83: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação durante 2 horas com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o primeiro ciclo de fermentação.

xxxi

Tabela 84: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação durante 2 horas com células imobilizadas em esferas de alginatov para o segundo ciclo de fermentação.

Tabela 85: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação durante 2 horas com células imobilizadas em esferas de alginato vpara o segundo ciclo de fermentação.

Tabela 86: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação durante 2 horas com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o terceiro ciclo de fermentação.

Tabela 87: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação durante 2 horas com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o terceiro ciclo de fermentação.

Tabela 88: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação durante 2 horas com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o primeiro ciclo de fermentação.

Tabela 89: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação durante 2 horas com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o primeiro ciclo de fermentação.

Tabela 90: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação durante 2 horas com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o segundo ciclo de fermentação.

xxxii

Tabela 91: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação durante 2 horas com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o segundo ciclo de fermentação.

Tabela 92: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação durante 2 horas com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o terceiro ciclo de fermentação.

Tabela 93: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação durante 2 horas com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o terceiro ciclo de fermentação.

Tabela 94: Valores de absorbância obtidos para diferentes concentrações desuspensões de *S. cerevisiae*.

Tabela 95: Valores de concentração celular para as amostras coletadas ao longo da fermentação.

Tabela 96: Valores de concentração celular para as amostras coletadas ao longo da fermentação.

Tabela 97: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o primeiro ciclo de fermentação.

Tabela 98: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o segundo ciclo de fermentação.

xxxiii

Tabela 99: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o terceiro ciclo de fermentação.

Tabela 100: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o quarto ciclo de fermentação.

Tabela 101: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o quinto ciclo de fermentação.

Tabela 102: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o sexto ciclo de fermentação.

Tabela 103: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o sétimo ciclo de fermentação.

Tabela 104: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o oitavo ciclo de fermentação.

Tabela 105: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o primeiro ciclo de fermentação.

Tabela 106: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o segundo ciclo de fermentação.

Tabela 107: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o terceiro ciclo de fermentação.

Tabela 108: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o quarto ciclo de fermentação.

Tabela 109: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o quinto ciclo de fermentação.

Tabela 110: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o sexto ciclo de fermentação.

Tabela 111: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o sétimo ciclo de fermentação.

Tabela 112: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o oitavo ciclo de fermentação.

Tabela 113: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o primeiro ciclo de fermentação.

Tabela 114: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o segundo ciclo de fermentação.

Tabela 115: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o terceiro ciclo de fermentação.

Tabela 116: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o quarto ciclo de fermentação.

Tabela 117: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o quinto ciclo de fermentação.

Tabela 118: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o sexto ciclo de fermentação.

Tabela 119: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o sétimo ciclo de fermentação.
Tabela 120: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o oitavo ciclo de fermentação.

Tabela 121: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o primeiro ciclo de fermentação.

Tabela 122: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o segundo ciclo de fermentação.

Tabela 123: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o terceiro ciclo de fermentação.

Tabela 124: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o quarto ciclo de fermentação.

Tabela 125: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o quinto ciclo de fermentação.

Tabela 126: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o sexto ciclo de fermentação.

Tabela 127: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginatov revestidas com quitosana para o sétimo ciclo de fermentação.

Tabela 128: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o oitavo ciclo de fermentação.

Tabela 129: Dados de produção de etanol, rendimento e crescimento celular livre para os estudos de fermentação com células livres e células imobilizadas utilizando a glicose e a sacarose como fontes de carbono.

Nomenclatura

A reagente

B reagente

 C_c concentração celular

C_p concentração de produto

C_s concentração de substrato

V volume do reator

r_p taxa de produção de produto

r_s taxa de consumo de substrato

 $Y_{p/c}$ coeficiente de rendimento para quantidade de produto formado por massa de células novas

 $Y_{s/c}$ coeficiente de rendimento para quantidade de substrato consumido por massa de

células novas

°GL teor alcoólico Gay Lussac

I intermediário de reação

m manutenção celular

P produto

Q produto

R constante dos gases

S concentração de substrato limitante

T temperatura absoluta

X[‡] estado de transição

ΔG[†] energia livre do estado de transição

 $\Delta\Delta G_{cat}^{\dagger}$ diferença entre os valores de Energia livre do estado de transição de uma reação não-catalisada e de uma reação catalisada

 ΔG^{\dagger}_{cat} energia livre do estado de transição de uma reação catalisada

 $\Delta G^{\dagger}_{uncat}$ energia livre do estado de transição de uma reação não-catalisada

 $\Delta G_{reação}$ diferença de energia livre entre os reagentes e os produtos

Letras Gregas

µm Micrômetro

 ζ Potencial zeta

1. Introdução

1.1 Apresentação do problema

Devido ao gradual esgotamento do petróleo bruto e ao problema causado ao meio-ambiente em consequência do consumo crescente do petróleo e seus derivados, a biomassa e a bioenergia ganharam atenção. Portanto, é importante o estudo e o desenvolvimento de alternativas que sejam ambas renováveis e ambientalmente amigáveis. O etanol tem sido considerado uma alternativa para diminuir problemas ambientais e energéticos (BAI, ANDERSON & MOO-YOUNG, 2008; LIN & TANAKA, 2006; LIU, WANG & OU-YANG, 2009; NAJFPOUR, YOUNESI & ISMAIL, 2004; XU, ZHAO & BAI, 2005). O etanol é menos poluente do que o petróleo, além disso, é produzido a partir de fontes renováveis. No Brasil o etanol é produzido a partir de cana-de-acúcar (ANDRADE, 2007; BORGES, 2008; PACHECO, 2010; WENDHAUSEN et al., 2001). O país é o maior exportador e segundo maior produtor de etanol do mundo, atrás dos Estados Unidos que lideram a produção de etanol basicamente a partir do milho (BORGES, 2008; PACHECO, 2010). Em 2006 o Brasil juntamente com os Estados Unidos foram responsáveis por 90% da produção mundial de etanol. Além disso, o Brasil apresenta condições favoráveis de solo e clima e é reconhecidamente líder em tecnologia de produção de etanol. Portanto, é o país com o maior potencial de expansão da produção de biocombustíveis (BORGES, 2008; PACHECO, 2010; FURTADO e SCANDIFFIO, 2006)

1

O desenvolvimento de tecnologias capazes de melhorar o desempenho da produção de etanol ganhou notável importância. Neste cenário, a imobilização celular tem sido utilizada para a produção de etanol em bioreatores com o objetivo de diminuir a inibição causada pela alta concentração de substrato e produto, aumentar a produção de etanol e reduzir seus custos, em geral, através da redução do consumo de energia devido à eliminação da etapa de centrifugação para separar as células do meio de fermentação (BAI, ANDERSON & MOO-YOUNG, 2008; INLOES *et al.*, 1983; LIN & TANAKA, 2006; NAJAFPOUR, YOUNESI & ISMAIL, 2004).

No trabalho de Joekes *et al.* (1998), os perfis de fermentação obtidos com células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas apresentaram maior rendimento na produção de etanol quando comparados ao processo com células livres. Outros trabalhos como o de Plessas *et al.* (2007) também apresentaram alta produtividade de etanol, boa estabilidade operacional e alta conversão para a fermentação alcoólica utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas. Há na literatura diversos trabalhos reportando a imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes suportes para a produção de etanol como em bagaço modificado, hidrogéis, copolímeros de acrilamida/acrilato de sódio, alginato de cálcio, k-carragena, crisotila, zeólitas, casca de laranja entre outros (BAI, ANDERSON & MOO-YOUNG, 2008; FREGONESI, 1998; KOURKOUTAS *et al.*, 2004; NIKOLIC *et al.*, 2010; ÖZTOP *et al.*, 2003; ÖZTOP *et al.*, 2002; PLESSAS *et al.*, 2007; PURWADI & TAHERZADEH, 2008; WENDHAUSEN, 2001; YU *et al.*, 2010; ZHOU, LI & LI, 2010)

2

1.2 Justificativa e importância

O presente trabalho é baseado na imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em suportes para a produção de etanol e inclui: 1) Seleção de uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (BIROL *et al.*, 1998; NAJAFPOUR, YOUNESI & ISMAIL, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2002; WENDHAUSEN, 1998; WENDHAUSEN *et al.*, 2001). 2) Síntese e caracterização do óxido de zircônio; 3) Estudo do comportamento do óxido de zircônio e da montmorilonita K10 como suportes para células de *Saccharomyces cerevisiae*; 4) Estudo da proporção ideal de suporte sólido e células de *Saccharomyces cerevisiae*; 5) Avaliação do melhor suporte sólido (óxido de zircônio e/ou montmorilonita K10); 6) Estudo da imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em esferas de alginato de cálcio e em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana; 7) Estudo da estabilidade dos sistemas célula/suporte; 8) Avaliação de condição ótima de trabalho; 9) Avaliação de rendimento reacional; 10) Levantamento de dados referentes à imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* visualizando um futuro projeto de reator contínuo para o uso de leveduras imobilizadas.

1.3 Objetivos do trabalho

Este trabalho tem como objetivo estudar e levantar dados referentes à imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* com vistas a um futuro projeto de reator contínuo para uso de levedura imobilizada. Além disso, propõem-se como objetivos para o presente projeto:

- Escolher uma cepa de Saccharomyces cerevisiae que, quando imobilizada, apresente ótimos resultados de produção de etanol e tempo reacional para atingir a máxima conversão, comparando com os sistemas com células livres;
- Determinar a proporção ideal de células de Saccharomyces cerevisiae/montmorilonita K10 e células de Saccharomyces cerevisiae/óxido de zircônio;
- Avaliar a fermentação de células de Saccharomyces cerevisiae imobilizadas em esferas de alginato de cálcio e em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.
- 4. Fermentação de glicose e sacarose a etanol em regime batelada;

2. Revisão bibliográfica

2.1 Biocatálise

A biocatálise está relacionada com o aproveitamento do potencial catalítico de microrganismos para o desenvolvimento de produtos. Estas biotransformações ocorrem com alta especificidade e eficiência por serem catalisadas por enzimas. Tendo emergido como uma importante ferramenta para a síntese industrial de muitos produtos químicos, agroquímicos, farmacêuticos com alto valor agregado, a biocatálise é hoje um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias. Entretanto, o número e a diversidade das aplicações são modestos, talvez devido às limitações como disponibilidade de enzima e estabilidade operacional (CARVALHO *et*

al., 2005; LABES & WENDHAUSEN, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2002; WENDHAUSEN, 1998).

Avanços em biologia molecular, metodologias de seleção de biocatalisadores e novas abordagens de pesquisa foram desenvolvidas com o objetivo de se obter biocatalisadores com suas especificidades alteradas e explorar sua biodiversidade. Os biocatalisadores disponíveis apresentam algumas limitações quanto a sua utilização em processos industriais (CONTI, RODRIGUES & MORAN, 2001). Segundo Dordik & Clark (2002), a biocatálise está rapidamente sendo transformada de uma ciência acadêmica para uma tecnologia industrial. Portanto os avanços na biologia molecular, biologia computacional, novas fontes enzimáticas, metodologia combinatorial e engenharia bioquímica têm estimulado a renascença da tecnologia enzimática.

2.1.1 Vantagens e desvantagens do uso de biocatalisadores (enzimas ou microrganismos)

A química orgânica moderna está fundamentada em métodos sintéticos altamente seletivos e vem utilizando cada vez mais enzimas e microrganismos, pois estes agem de forma catalítica e podem conduzir elevados excessos enantioméricos do isômero desejado.

Dentre as vantagens do uso de enzimas e microrganismos estão:

 São catalisadores muito eficientes: catalisam reações frequentemente 10⁶ – 10¹⁴ vezes mais rápido do que a correspondente reação não catalisada, que é um valor bastante acima dos obtidos através de catalisadores comuns,

5

transformando de 100 a 1000 moléculas de substrato em produto por minuto de reação (VIEIRA, 2006).

- Não geram resíduos de alta toxicidade (metais pesados) e são degradados pelo ambiente: diminuem a quantidade de efluentes danosos ao meio ambiente.
- Atuam sob condições reacionais suaves: efetuam a catálise na faixa de pH de 5-8 e em temperaturas de 20°C a 40°C à pressão atmosférica (VIEIRA, 2006; WENDHAUSEN, 1998).
- Apresentam atividade catalítica em meios não convencionais: muitas enzimas e até mesmo células tem demonstrado retenção da atividade catalítica em meios não convencionais como solventes orgânicos (VIEIRA, 2006; WENDHAUSEN, 1998).
- Podem catalisar uma ampla faixa de reações químicas. (VIEIRA, 2006; WENDHAUSEN, 1998).
- Apresentam três tipos de seletividade: Alguns biocatalisadores podem intermediar reações difíceis de obter por métodos tradicionais em química orgânica, tornando-os recomendáveis na síntese de compostos enantiomericamente puros. Isto se deve a aspectos de seletividade das reações enzimáticas (VIEIRA, 2006; WENDHAUSEN, 1998). São elas:
 - Quimiosseletividade atuam sobre um determinado grupamento químico. Isto proporciona produtos reacionais "mais limpos", facilitando, o processo de purificação (VIEIRA, 2006; WENDHAUSEN, 1998).

- Regiosseletividade ou Diastereosseletividade devido a sua estrutura tridimensional complexa, as enzimas podem distinguir entre grupos funcionais que estão situados em diferentes regiões da mesma molécula do substrato (VIEIRA, 2006; WENDHAUSEN, 1998).
- Enantiosseletividade Quase todas as enzimas são formadas de Laminoácido, portanto, são catalisadores quirais. Como consequência, qualquer tipo de quiralidade presente na molécula do substrato é reconhecida na formação do complexo (enzima-substrato). Assim, um substrato pró-quiral será transformado num produto opticamente ativo e ambos os enantiômeros de um substrato racêmico podem reagir a diferentes velocidades, promovendo uma resolução cinética. Estas últimas propriedades se constituem na especificidade de uma enzima e representam a mais importante de suas capacidades, podendo promover importantes sínteses quirais (VIEIRA, 2006; WENDHAUSEN, 1998).

Algumas desvantagens são apresentadas nas reações biocatalisadas, como:

- São sensíveis a condições energéticas: requerem sempre condições brandas de operação (VIEIRA, 2006).
- Possuem atividade máxima em água: a maioria dos substratos orgânicos é insolúvel ou bem pouco solúvel em água (VIEIRA, 2006).
- Muitas enzimas isoladas necessitam cofatores: os cofatores são caros e de difícil recuperação (VIEIRA, 2006).

2.1.2 Imobilização de biocatalisadores

A imobilização de biocatalisadores é um termo utilizado quando células ou enzimas, por métodos naturais ou artificiais, são impedidas de se moverem livremente em todas as partes da fase aquosa, confinando-a em um material por afinidade de sua natureza química, física ou por aprisionamento do retículo. O processo de imobilização deve ser realizado de maneira suave de forma a manter a estrutura do biocatalisador. Os principais fatores que afetam esse sistema são pH, natureza do solvente, natureza da substância a ser imobilizada, força iônica e a proporção adsorvente/substância imobilizada (BIROL *et al.*, 1998; FREGONESI, 1998; VIEIRA, 2006).

A imobilização de células microbianas para a fermentação tem sido desenvolvida para eliminar a inibição causada pela alta concentração de substrato e produto e também para aumentar a produtividade e o rendimento da produção de etanol (NAJAFPOUR, YOUNESI & ISMAIL, 2004).

As vantagens da imobilização celular sobre células não imobilizadas são extensas e têm sido reportadas na literatura, como sua repetida utilização resultando economia nos processos industriais, eliminação da operação de remoção de células livres do produto, aumento da estabilidade e metabolismo celular, além de diminuir custos, aumenta a rapidez e a exatidão do processo (JOEKES *et al.* 1998; NAJFPOUR, YOUNESI & ISMAIL, 2004; VIEIRA, 2006).

8

2.1.3 Métodos de imobilização de biocatalisadores

O desenvolvimento de diversos métodos tem sido relatado, atendendo aos mais diversos tipos de processos biocatalíticos (WENDHAUSEN, 1998).

O principal método para imobilização de células para a produção de etanol é por adsorção (ligação ao suporte). As vantagens da imobilização dos biocatalisadores neste método são que a imobilização pode ser feita sob condições brandas; a reutilização do suporte do biocatalisador é possível; maior quantidade de células pode ser usada em um suporte com grande área superficial; permite a produção em regime contínuo por longo tempo; aumento da estabilidade enzimática e, consequentemente, da produtividade; capacidade de parar a reação rapidamente e diminuição dos riscos de contaminação (FREGONESI, 1998).

Na **Figura 01** abaixo estão representados os diferentes métodos de imobilização celular.



Figura 01: Métodos de imobilização celular.

FONTE: Figura modificada KOURKOUTAS, Y., *et al.* Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology.* V.21, p.377-397, 2004.

2.1.4 Algumas considerações a serem observadas nas reações biocatalisadas

Há alguns fatores que devem ser observados e seguidos em uma reação biocatalítica (VIEIRA, 2006).:

 Estabelecer o tipo de reação de interesse (oxidação, redução, hidrólise, transesterificação, etc.)

- Avaliar a atividade enzimática do(s) microrganismo(s) ou da(s) enzima(s).
- Determinar as condições de reação (temperatura, tempo, pH, solvente, concentração de substrato).
- Determinar o método de caracterização do produto (CG, CG-EM, CLAE, RMN, etc.).
- Determinar a conversão (c), o excesso enantiomérico (ee), a razão enantiomérica (E).
- Estabelecer o método para determinar a configuração absoluta dos compostos.
- Determinar as condições necessárias para produzir os compostos em escala substancial.

2.1.5 Escolha do tipo de biocatalisador (enzimas ou microrganismos)

Muitos fatores devem ser levados em conta na escolha do biocatalisador (enzimas isoladas, células inteiras, organelas etc.). Por exemplo, se o produto desejado é convertido através de uma sequência enzimática e não da atuação de uma única enzima, é conveniente utilizar um microrganismo que possua essa sequência em seu metabolismo (ex. Produção de etanol via fermentação de glicose por *Saccharomyces cerevisiae*), pois a presença de várias enzimas colocadas para reagir de forma aleatória pode resultar em reações colaterais que dificultam a separação do produto desejado. Uma relação de vantagens e desvantagens na utilização de enzimas ou células está sumarizada na **Tabela 01** (LABES & WENDHAUSEN, 2008): **Tabela 01:** Vantagens e desvantagens no uso de enzimas isoladas ou célulasinteiras como sistema biocatalítico.

Sistema	Vantagens	Desvantagens
Células inteiras	-baixo custo.	-requer grande controle
	-co-fatores presentes.	microbiológico.
	-possuem várias enzimas.	-o processo envolve
		grandes quantidades de
		água para extração de
		produtos.
Enzimas	-aparatos simples.	-alto custo.
isoladas	-processo fácil de controlar e	-requerem muitas vezes
	monitorar.	adição de co-fatores.
	-produz apenas a reação	
	desejada.	
	-solventes e co-solventes bem	
	tolerados.	
	-fácil de separar produtos.	

FONTE: LABES e WENDHAUSEN, 2008, p. 73-79.

2.2 Cinética das reações enzimáticas

Para as reações catalisadas por enzimas puras, é possível obter informações importantes a partir de suas estruturas tridimensionais e de estudos das cinéticas das

reações. A cinética estuda as velocidades das reações em função dos parâmetros experimentais, como por exemplo, a concentração do substrato, mudanças na temperatura e no pH. Além disso, a cinética de reações enzimáticas tem como objetivo correlacionar seja por meio de equações empíricas ou por meio de modelos matemáticos, as velocidades das transformações com alguns dos fatores que as afetam (BORZANI *et al.*, 2001).

Grande parte do nosso conhecimento sobre o modo como as enzimas catalisam reações químicas é proveniente da Teoria do Estado de Transição, a qual foi desenvolvida em meados de 1930, principalmente por Henry Eyring. Considerando uma reação bi molecular envolvendo três átomos, como a reação de um átomo de hidrogênio diatômico (H₂) resultando em um átomo de hidrogênio diferente:

$$H_A - H_B + H_C \rightarrow H_A + H_B - H_C$$

Nessa reação, o H_c deve aproximar-se da molécula diatômica H_A-H_B, de modo que, em algum ponto da reação, exista um complexo (instável) de elevada energia representado como H_A--H_B--H_C. Nesse complexo, a ligação covalente H_A-H_B está em processo de ruptura, ao passo que a ligação H_B-H_C está em um processo de formação. O ponto de mais alta energia é chamado de **estado de transição** do sistema (VOET, D., VOET, J. G. & PRATT, C. W., 2000).

Os reagentes geralmente se aproximam ao longo de uma rota de energia livre mínima, conhecida como a **coordenada de reação** desses reagentes. Um gráfico da energia livre *versus* a coordenada de reação é chamado de **diagrama do estado de transição** ou de **diagrama da coordenada de reação** (**Figura 02**). Os reagentes e produtos estão em estado de energia livre mínima, e o estado de transição corresponde ao mais alto ponto do diagrama. Para a reação H+H₂, os reagentes e produtos têm a mesma energia livre (**Figura 02 a**). Caso os átomos no sistema reacional sejam de tipos diferentes, como na reação:

$$A + B \rightarrow X^{\dagger} \rightarrow P + Q$$

em que A e B são os reagentes, P e Q são os produtos e X⁺ representa o estado de transição, o diagrama do estado de transição não será simétrico, porque há uma diferença de energia livre entre reagentes e produtos (**Figura 02 b**). Em ambos os casos, ΔG^{\dagger} , a energia livre do estado de transição subtraída da energia livre dos reagentes, é conhecida como **energia livre de ativação**.



Figura 02: Diagrama do estado de transição. (a) A reação H + H₂. Os reagentes e produtos correspondem às estruturas de baixa energia livre. O ponto de mais alta energia é o estado de transição, no qual os reagentes são parcialmente convertidos a produtos. ΔG^{\dagger} é a energia livre de ativação, a diferença de energia livre entre os reagentes e o estado de transição, X[‡]. (b) Diagrama do estado de transição para a reação A + B → P + Q. Esta é uma reação espontânea; isto é, $\Delta G_{reação} < 0$ (a energia livre de P + Q é menor do que a energia livre de A + B).

FONTE: VOET, D., VOET, J. G. & PRATT, C. W., "Fundamentos de bioquímica", Artmed Editora, Porto Alegre, 2000, p. 288.

A passagem pelo estado de transição requer somente 10^{-13} a 10^{-14} s, de modo que a concentração do estado de transição no sistema reacional é pequena. Assim, a decomposição do estado de transição em produtos (ou de volta em reagentes) é postulada como sendo o processo determinante da velocidade da reação total. Há argumentos termodinâmicos indicando que a velocidade da reação é proporcional a $(e^{-\Delta G^{\ddagger/RT}})$, em que R é a constante dos gases e T é a temperatura absoluta. Dessa maneira, *quanto maior for o valor de* ΔG^{\ddagger} , *menor será a velocidade da reação.* A razão disso é que quanto maior for o ΔG^{\dagger} , menor será o número de moléculas de reagentes com energia térmica suficiente para alcançar a energia livre do estado de transição (VOET, D., VOET, J. G. & PRATT, C. W., 2000).

As reações químicas são comumente constituídas de várias etapas. Para uma reação de duas etapas, como

$$A \to I \to P$$

na qual I é um intermediário da reação, existem dois estados de transição e duas barreiras de energia de ativação. O formato do diagrama do estado de transição para tais reações reflete as velocidades relativas das duas etapas (**Figura 03**). (VOET, D., VOET, J. G. & PRATT, C. W., 2000).



Figura 03: Diagrama do estado de transição para uma reação de duas etapas. A curva em azul representa uma reação ($A \rightarrow I \rightarrow P$), cuja primeira etapa determina a velocidade da reação, e a curva em vermelho representa uma reação cuja segunda etapa determina a velocidade da reação.

FONTE: Modificada de VOET, D., VOET, J. G. & PRATT, C. W., "Fundamentos de bioquímica", Artmed Editora, Porto Alegre, 2000, p. 289.

2.2.1 Catalisadores reduzem ΔG^{\dagger}

Os catalisadores atuam reduzindo a energia livre do estado de transição da reação catalisada (**Figura 04**). A diferença entre os valores de ΔG^{\dagger} de uma reação nãocatalisada e de uma reação catalisada, $\Delta \Delta G^{\dagger}_{cat}$, indica a eficiência do catalisador. O **aumento da velocidade** (quociente da velocidade da reação catalisada pela nãocatalisada) é dado por $e^{\Delta \Delta G^{\dagger}_{RT}}$. Dessa maneira, um aumento da velocidade em 10 vezes requer uma $\Delta \Delta G^{\dagger}_{cat}$ de somente 5,71 kJ.mol⁻¹ a qual é menos que a metade da energia livre de uma ligação de hidrogênio. De modo semelhante, um aumento de 1 milhão de vezes da velocidade ocorre quando $\Delta \Delta G^{\dagger}_{cat} \approx 34$ kJ.mol⁻¹, que é uma fração pequena da maioria das ligações covalentes. Portanto, do ponto de vista teórico, uma enorme eficiência catalítica parece possível para os grupos reativos presentes nos sítios ativos das enzimas (VOET, D., VOET, J. G. e PRATT, C. W., 2000).

Um catalisador reduz a barreira de energia livre na mesma proporção tanto para uma reação direta como para a reversa (**Figura 04**). Em consequência, um catalisador acelera igualmente as reações direta e reversa. Apesar de o catalisador poder acelerar a conversão de reagentes a produtos (ou produtos de volta a reagentes), a probabilidade de a reação ocorrer em uma ou outra direção depende somente da diferença de energia livre entre os reagentes e os produtos. Se $\Delta G_{reação} < 0$, a reação ocorrerá espontaneamente dos reagentes em direção aos produtos; se $\Delta G_{reação} > 0$, a reação reversa ocorrerá de modo espontâneo. Uma enzima não altera o $\Delta G_{reação}$, ela somente pode diminuir o ΔG^{\dagger} de modo a permitir que a reação atinja o equilíbrio (em que as velocidades das reações direta e reversa são iguais) mais rapidamente do que na ausência de catalisador. A velocidade real para a qual os reagentes são convertidos em produtos é o objeto da cinética (VOET, D., VOET, J. G. & PRATT, C. W., 2000).



Coordenada da reação

Figura 04: Efeito de um catalisador no diagrama do estado de transição de uma reação. Aqui $\Delta\Delta G_{cat}^{\dagger} = \Delta G_{(uncat)}^{\dagger} - \Delta G_{(cat)}^{\dagger}$ FONTE: Modificada de VOET, D., VOET, J. G. & PRATT, C. W., "Fundamentos de bioquímica", Artmed

Editora, Porto Alegre, 2000, p. 289.

2.3 Produção de etanol

2.3.1 Aspectos econômicos

Etanol é produzido em escala comercial a partir do etileno, derivado do petróleo, ou por fermentação de açúcares. No Brasil, criou-se em 1975 o programa Proálcool, visando à produção de etanol através da cana-de-açúcar para fins combustíveis, devido à alta do preço da gasolina no mercado interno e ao risco de desabastecimento. A preocupação ambiental favoreceu a utilização de 22% de etanol à gasolina, eliminando o aditivo a base de chumbo tetraetílico e hidrocarbonetos aromáticos. Atualmente, a produção de etanol, que possui potencial para substituir combustíveis fósseis, tem sentido bem diferente do início do projeto do Proálcool: visa

a obtenção do reconhecimento da tecnologia envolvida para esse fim, a utilização de um combustível limpo, proveniente de uma fonte renovável, a preocupação com a qualidade do ar e a redução de CO₂ lançado na atmosfera, saúde e a manutenção de empregos ligados direta ou indiretamente à fabricação do produto (LIU, WANG, & OU-YANG, 2009; NAJAFPOUR, YOUNESI & ISMAIL, 2004). Além disso, é incentivado o uso de tecnologias que visem o aumento da produtividade e a redução dos custos de produção setorial. A literatura mostra que estudos nesta área buscam escolher matérias-primas e microrganismos e obter reatores que permitam um processo com custos mais baixos e com melhor eficiência energética (FREGONESI, 1998; LIU, WANG, & OU-YANG, 2009). No Brasil, a cana-de-açúcar é utilizada como matéria-prima para o processo de fermentação para obtenção de etanol. Como o preço do etanol depende dos custos da produção, portanto, é importante que novas tecnologias sejam desenvolvidas e empregadas para melhorar o processo de fermentação.

A utilização da cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção de etanol faz com que o custo por litro seja menor do que o produzido por outras biomassas, pois não é necessária a conversão do amido em glicose, o que ocorre nos processos que utilizam o milho e trigo nos Estados Unidos e Alemanha, respectivamente (ANDRIETTA, STECKELBERG & ANDRIETTA, 2006; FURTADO & SCANDIFFIO, 2006).

A fermentação em condições anaeróbicas consiste na metabolização da glicose em etanol através de microrganismos. Essa conversão pode ser representada estequiometricamente por:

 $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$

20

2.4 Fermentação alcoólica

2.4.1 Processos de fermentação alcoólica

Os biorreatores para a produção de etanol podem operar de maneira descontínua (ou batelada), descontínua alimentada (ou batelada alimentada) e contínua. Na indústria, os reatores de aço são normalmente fechados, do tipo tanque agitado, e operam em temperatura entre 33 a 35°C. A concentração de etanol no final do processo varia entre 7 e 12° GL. É comum a presença de um sistema de lavagem do gás de saída para a recuperação do etanol evaporado, que corresponde a 1,5% de todo etanol gerado. A fermentação inicia-se com uma concentração celular de 10⁶ a 10⁷ células/mL e ao final da fermentação a concentração celular pode atingir valores de 10⁸ células/mL (PACHECO, 2010).

2.4.1.1 Fermentação em batelada

A operação em batelada também conhecida como operação descontínua é importante para a obtenção de dados de cinética do processo. Uma importante vantagem deste modo de operação é a assepsia durante o processo. Antes de cada fermentação o reator é esterilizado com um novo meio e uma nova inoculação é feita (SCHIMIDELL & FACCIOTTI, 2001). Além desta, este modo de operação apresenta uma grande flexibilidade devido à possibilidade utilização do reator para a produção de diferentes produtos e ainda permitir uma melhor condição de controle da estabilidade genética do microorganismo. Segundo Carvalho (2001) há algumas desvantagens para o modo de operação em batelada como o tempo gasto para encher, esvaziar e esterilizar o reator.

2.4.1.2 Fermentação contínua

Segundo Facciotti (2001) neste modo de operação há uma alimentação contínua do meio de cultura a uma determinada vazão e o volume de reação é mantido constante pela retirada do caldo de fermentação. Há também uma série de vantagens como redução dos tempos mortos, o que resulta num aumento de produtividade; fermentado mais uniforme, o que facilita a recuperação do produto; facilidade de utilização de controladores; manutenção das células em um mesmo estado, permitindo o estudo de regulação metabólica e otimização da composição de meios de cultivo e redução da mão-de-obra empregada no processo. Facciotti (2001) cita que a maior desvantagem do modo de operação contínuo é a susceptibilidade à contaminação bacteriana. Segundo Atala et al. (2000), o processo contínuo de produção de etanol pode ser encontrado em várias indústrias. É possível obter maiores rendimentos e melhor controle da produtividade, no entanto, requer maior conhecimento do comportamento do microorganismo, fatores como pH, temperatura, concentração de substrato e produto, concentração de biomassa, viabilidade celular, etc. No Brasil, o modo de operação em batelada é considerado mais confiável por engenheiros por ser de fácil assepsia. Pesquisadores acreditam que o etanol produzido através do modo de operação contínua corresponda entre 25% a 30% do etanol produzido no país, portanto o modo de operação em batelada é dominante. No entanto, o modo de operação continua a gerar discussões e faz-se necessário ainda

muito estudo de Engenharia e Cinética da Fermentação Alcoólica (ALCOOLBRÁS, 2006).

2.4.1.3 Fermentação em batelada alimentada

A batelada alimentada permite o controle e a adição de um ou mais nutrientes no fermentador durante o processo de cultivo (CARVALHO & SATO, 2001 a), o que diminui a inibição pelo substrato. Além disso, para a grande maioria dos processos fermentativos, tem se mostrado versátil e eficiente, inclusive para a fermentação alcoólica. Apresenta menores riscos de contaminação e flexibilidade de operação, permitindo a utilização dos biorreatores para a fabricação de diferentes produtos (CARVALHO & SATO, 2001 b; VIEGAS, 2003). Segundo Mcneil & Harvey (1990), em tais processos, especialmente naqueles com altas densidades celulares, a produtividade é alta devido ao grande número de células viáveis no meio de fermentação, além disso, a batelada alimentada permite o controle da concentração de açúcar, minimizando os efeitos de inibição pelo substrato e permitindo a adição do mesmo nos momentos mais propícios durante a fermentação. A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo, e a adição de mosto pode ser contínua ou intermitente. Devido à flexibilidade de utilização de diferentes vazões de enchimento dos reatores com meio nutriente, nos processos batelada alimentada é possível controlar a concentração de substrato no fermentador, de modo que, por exemplo, o metabolismo microbiano seja deslocado para uma determinada via metabólica, levando ao acúmulo de produto específico (CARVALHO & SATO, 2001 c).

23

2.4.2 Cinética de fermentação alcoólica

Segundo Viegas (2003), o objetivo básico do estudo da cinética de processos microbianos é o de quantificar as taxas de crescimento celular, de consumo de substrato, de formação de produtos e demais parâmetros relacionados, além de avaliar a influência do pH, temperatura, inibidores etc. nestas taxas. No caso de fermentação alcoólica, a determinação destes valores é de grande importância para se projetar adequadamente uma unidade industrial de produção de etanol.

Segundo Bailey & Ollis (1986), os modelos cinéticos normalmente usados em fermentações podem ser divididos em:

- Não estruturados e não segregados, nos quais as células de microrganismos são consideradas como soluto;

- Estruturados e não segregados, onde as células são tratadas como seres individuais distintos, porém descritos por um único componente;

- Estruturados e segregados, onde as células de microrganismos são consideradas como indivíduos distintos e formados por múltiplos componentes. Para o estudo da fermentação alcoólica o modelo não estruturado e não segregado é o modelo mais utilizado para descrever o comportamento das variáveis envolvidas.

2.4.2 Fermentação com células imobilizadas

Há diversos trabalhos relatando o emprego de células imobilizadas em diversos suportes para a produção econômica de etanol. Estes sistemas mostram-se atrativos e promissores uma vez que a produção é superior aquela observada para células livres. Nos trabalhos de Joekes *et al.* (1998) e Wendhausen *et al.* (2001), crisotila, um silicato de magnésio muito abundante na região central do Brasil, foi utilizado como suporte para células de *Saccharomyces sp.* e apresentou maior rendimento no processo de produção de etanol quando comparado a células livres sob as mesmas condições.

2.4.2.1 Vantagens do uso de células imobilizadas (WENDHAUSEN, 1998).

- Processamento através de regime multienzimático.
- Maior densidade celular por litro de reator.
- Facilidade de separação do meio reacional.
- Possibilidade de operar em sistema contínuo com maior controle sobre a permanência das células dentro do reator.
- Utilização de altas velocidades de diluição sem perigo de eluição do biocatalisador.
- Redução da fase de adaptação (fase "lag").
- Maior porcentagem de conversão.
- Menor inibição pelos produtos formados.
- Menor tempo reacional.
- Controle da reprodução das células (crescimento da biomassa).

2.5 A montmorilonita

A montmorilonita é uma argila pertencente ao grupo das esmectitas constituída de silicatos hidratados, de alumínio, ferro e magnésio com duas folhas tetraédricas de silicato e uma folha central octaédrica de alumínio, unida por átomos de oxigênio, com fórmula (Al Mg)(SiAl)O₁₀(OH)₂M⁺nH₂O, onde M é o cátion interlamelar. A **Figura 05** mostra a estrutura da montmorilonita. Os tetraedros de SiO_4^{4-} formam uma estrutura bidimensional ou lamelar, na forma de um hexágono. A folha de silicato pode se ligar a uma segunda folha, geralmente de unidades octaédricas de hidróxidos metálicos (FREGONESI, 1998).

Os cátions, presentes nas intercamadas estruturais, podem ser trocados por outros, dependendo do grau de substituição isomórfica, que pode ocorrer quando a argila for imersa em água e ocorrer o intumescimento das camadas lamelares. A troca iônica altera sensivelmente as propriedades físico-químicas da argila, não causando alterações estruturais. Na montmorilonita, a capacidade de troca iônica é devida, principalmente, à substituição de Al³⁺ em posições octaédricas por cátions Mg²⁺ e Fe²⁺ e, menos frequentemente, à substituição de Si⁴⁺ por Al³⁺ em folhas tetraédricas (FREGONESI, 1998).

A fraca ligação entre as camadas e o elevado grau de substituição isomórfica torna fácil a clivagem, em meio líquido, das partículas desse tipo de argilomineral. Há uma tendência muito grande, principalmente quando os cátions trocáveis são K^+ , Li^+ , NH_4^+ , à separação das camadas estruturais em meio aquoso, podendo ir até 1 nm. As medidas de área superficial, em geral, aumentam com o aumento do raio do cátion trocável; o valor alcança 68 m²/g para a montmorilonita-Li e 138 m²/g para montmorilonita-Cs. As argilas pertencentes a esses argilominerais possuem um elevado grau de propriedades plásticas e coloidais e apresentam variações em suas propriedades físicas, provocadas pelos cátions trocáveis ou por fatores estruturais. A montmorilonita como um mineral natural, tem sido extensivamente estudada no que se refere a suas propriedades e aplicações industriais (FREGONESI, 1998).



o e Sílicio e ocasionalmente alumínio

Figura 05: Estrutura da montmorilonita.

FONTE: SANTOS, P. S., "Tecnologia das argilas". Edgard Blucher Ltda., v. 2, 1975.

2.6 O óxido de zircônio (ZrO₂)

O ZrO₂ apresenta três formas cristalográficas distintas: monoclínica, tetragonal e cúbica conforme representadas na **Figura 06**. A fase monoclínica é estável até 1440 K, temperatura na qual se transforma na fase tetragonal, que é estável até 2640 K. A partir de 2640 K a forma cristalográfica mais estável é a cúbica, cujo ponto de fusão é de 2950 K (MERCERA *et al.*, 1991). Apesar de sua resistência térmica a fase cúbica não tem grande aplicação em suportes para catálise, uma vez que as formas tetragonais e monoclínicas apresentam as maiores áreas superficiais específicas devido à sua textura, que possui um grande número de poros (BAILAR, 1973).



Figura 06: Óxido de zircônio cúbico (a), Óxido de zircônio tetragonal (b), Óxido de zircônio monoclínico (c).

FONTE: Modificada de: PINHEIRO, T.B. Processamento e caracterização da microestrutura e de algumas propriedades mecânicas da zircônia parcialmente estabilizada com ítria e da parcialmente estabilizada com magnésia. 2008. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

2.7 O alginato

O alginato é um polissacarídeo natural, não tóxico, extraído de algas marrons como *Laminaria hyperborean, Ascophyllum nodosum* e *Macrocystispyrifera*, nas quais o alginato compreende até 40% de seu peso seco (ALBARGHOUTHI *et al.*, 2000; GEORGE & ABRAHAM, 2006). Também pode ser produzido por bactéria (COVIELLO *et al.*, 2007), como *Azotobacter vinelandii* e várias espécies de *Pseudomonas* (GEORGE & ABRAHAM, 2006). Este polissacarídeo se apresenta sob a forma randômica, linear e aniônica o qual contém unidades de(1,4) β-D- manuronato (unidade M) e (1,4) α-Lguluronato (unidade G) como pode ser visualizado na **Figura 07**. O alginato pode variar tanto na proporção quanto na sequência em que essas unidades são arranjadas ao longo da cadeia (DE & ROBINSON, 2003; COVIELLO et al., 2007; GOMBOTZ & WEE, 1998). A composição e a extensão das seguências das unidades e o peso molecular, determinam as propriedades físicas dos alginatos. A variabilidade molecular é dependente do organismo e tecido do qual o alginato é isolado. Por exemplo, alginatos preparados de estipes, estrutura semelhante a um caule, de L. hyperborea velha contém alto conteúdo de resíduo de β-D-manuronato, enquanto alginatos obtidos de A. nodosum e L. japonica têm baixo conteúdo de resíduos de β-D-manuronato (COVIELLO et al., 2007; GOMBOTZ & WEE, 1998). São conhecidos tradicionalmente pelas suas propriedades gelificantes em soluções aquosas devido à interação entre os grupos carboxílicos e contra-íons bivalentes como cálcio, chumbo e cobre. É possível também obter géis de alginato diminuindo o pH do meio. Devido à propriedades intrínsecas do alginato como, biocompatibilidade, mucoadesão, porosidade e facilidade de manipulação, seu uso tem chamado atenção para a encapsulação celular, regeneração tecidual e liberação de proteínas, no qual as esferas ou microesferas de alginato de cálcio são empregadas (COVIELLO et al., 2007).

O alginato apresenta propriedades que possibilitam seu uso como matriz para o aprisionamento e/ou liberação de uma variedade de proteínas e células. Essas propriedades são: (i) ambiente aquoso inerte no interior da matriz; (ii) processo de encapsulação em temperatura ambiente livre de solventes orgânicos; (iii) alta porosidade do gel, o que permite altas taxas de difusão para macromoléculas; (iv) a habilidade de controlar essa porosidade através de recobrimentos e (v) dissolução e biodegradação sob condições fisiológicas normais (GOMBOTZ & WEE 1998). Segundo Orive *et al.* (2002) um fator importante é a pureza do alginato que proporciona a biocompatibilidade e tem influência direta na fermentação.

Segundo Park & Chang (2000), células imobilizadas em matriz hidrofílica podem ser protegidas de condições não adequadas de pH, temperatura, solventes orgânicos e/ou compostos inibidores presentes no meio de fermentação.



Figura 07: Fórmula molecular estrutural do alginato. G representa os copolímeros lineares de α-L-guluronato e M, os copolímeros de β-D-manuronato. Fonte: RODRIGUES, A.P., Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

2.7.1 Formação do gel de alginato de cálcio

O alginato de sódio, solúvel em água, apresenta a propriedade de formação de gel na presença de cátions multivalentes como os íons cálcio (GONG *et al.*, 2011). Esferas de alginato podem ser preparadas através da extrusão da solução de alginato, contendo a proteína ou célula de interesse, por gotejamento em soluções de Ca²⁺, Sr²⁺ ou Ba²⁺. Cátions monovalentes e Mg²⁺ não induzem a formação de gel, além disso, géis

de Pb²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ e Mn²⁺ têm seu uso limitado devido sua toxicidade. A formação do gel e crosslinking dos polímeros é possível devido à troca dos íons de sódio por cátions divalentes (GOMBOTZ & WEE, 1998). A **Figura 08** apresenta a estrutura molecular do alginato de sódio e a **Figura 09** ilustra o esquema das ligações cruzadas que ocorrem entre as unidades do alginato e o íon cálcio.



Figura 08: Estrutura molecular do alginato de sódio.

Fonte: YANG, J.; XIE, Y. and HE, W., Research progress on chemical modification of alginate: A review, *Carbohydrate Polymers*, v. 84, p. 33–39, 2011.



Figura 09: Esquema das ligações cruzadas no gel de alginato de cálcio.

Fonte: RODRIGUES, A.P., Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

2.8 A quitosana

A quitosana é um copolímero linear derivado da quitina, formado por uma seguência de acúcares monoméricos de β-(1-4)-2-acetamido-2-deóxi-β-Dglicopiranose e 2-amino-2-deóxi-β-D-glicopiranose. A obtenção da quitosana é dada pela remoção de grupamentos acetila da quitina, o qual é o principal componente do exoesqueleto de crustáceos como o camarão, por tratamento com bases fortes. Os principais parâmetros que influenciam as características da quitosana são o peso molecular e o grau de deacetilação. A quitosana é um polímero policatiônico que tem um grupo amino e dois grupos hidroxila, em pH abaixo de 6 os grupos amina da quitosana são protonados conferindo o comportamento catiônico, em pH acima de 6,5 os grupos amina são desprotonados e se tornam reativos. (BERGER et al, 2004; DASH et al., 2011). A presença destes grupos amino explica também a afinidade da quitosana por íons metálicos, que pode ocorrer através de mecanismos de quelação para cátions metálicos em soluções próximas a neutralidade e através de atração eletrostática e troca iônica para ânions metálicos em soluções ácidas. (GUIBAL, 2005).


Figura 10: Ilustração esquemática da versatilidade da quitosana em diferentes condições de pH.

Fonte: Modificada de DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R.M.; CHIELLINI, E., Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Progress in Polymer Science*, v. 36, p. 981–1014, 2011.

O uso da quitosana tem despertado o interesse devido suas propriedades intrínsecas como a biocompatibilidade, atividade antimicrobiana, além de ser biodegradável (CAMACHO *et al.*, 2010). Recentes estudos também abordam o interesse em combinar os efeitos dos íons metálicos e da quitosana no tratamento de doenças de plantas, produção de baterias e dispositivos óticos e eletrônicos (GUIBAL, 2005), além do tratamento de efluentes contendo íons cobre (NGAH & FATINATHAN, 2008).

O emprego de esferas de quitosana é reportado na literatura devido seu potencial para aplicações farmacêuticas como a encapsulação de medicamentos e proteínas (ALBARGHOUTHI, *et al.*, 2000; ANAL & STEVENS, 2005; BERGER *et al.*, 2004; COVIELLO *et al.*, 2007; DE & ROBINSON, 2003; GEORGE & ABRAHAM, 2006; GOMBOTZ & WEE, 1998; GONG *et al.*, 2011; GUIBAL, 2005; Leonard *et al.*, 2004; MLADENOVSKA *et al.*, 2007; MURATA *et al.*, 1999; PASPARAKIS & BOUROPOULOS, 2006; SINHA *et al.*, 2004; SHU & ZHU, 2002, XU *et al.*, 2007) e também para a imobilização de células microbianas como a de *Saccharomyces cerevisiae* (PARK & CHANG, 2000).



Figura 11: Estrutura da quitosana.

Fonte: Modificada de GUIBAL, E., Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: a review, *Prog. Polym. Sci.*, v. 30, p. 71–109, 2005.

2.8.1 Interação entre alginato de cálcio e quitosana

A associação de dois ou mais polímeros, ligados, principalmente devido às forças eletrostáticas, a interações hidrofóbicas, a ligações de hidrogênio, a forças de van der Waals, ou pela combinação destas interações é denominada de Complexo Polieletrólito (PEC) (BERGER *et al.,* 2004; RODRIGUES, 2008). Quando o alginato de cálcio é misturado com a quitosana, fortes interações iônicas entre os grupos amino da quitosana e grupos carboxila do alginato ocorrem para a formação do complexo polieletrólito (PEC), que confere boas características aos dois polímeros (NGAH & FATINATHAN, 2008, RODRIGUES, 2008; SHU and ZHU, 2002, XU *et al.,* 2007), **Figura 12**. O PEC não dissolve na presença de quelantes do íon Ca²⁺ e, além disso, a associação com a quitosana permite a redução dos poros das esferas de alginato (ALBARGHOUTHI *et al.*, 2000).

O recobrimento das esferas de alginato com polímeros catiônicos, como a quitosana, tem sido utilizado para controlar a desintegração das esferas de alginato. Normalmente, há dois métodos principais de se obter esferas de alginato-quitosana. Um deles consiste no gotejamento da solução de alginato em uma solução de cloreto de cálcio com quitosana e o outro método consiste de duas etapas, na primeira etapa, a solução de alginato é gotejada em uma solução de cloreto de cálcio, na segunda etapa, as esferas de alginato são recobertas com quitosana (MLADENOVSKA *et al.,* 2007).



Figura 12: Representação esquemática da formação dos complexos de polieletrólitos (PEC) entre as cadeias de alginato e quitosana.

Fonte: RODRIGUES, A.P., Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

Segundo Rodrigues (2008), os PEC's formados por alginato e quitosana, apresentam características de intumescimento que podem ser caracterizados como um ambiente hidrofílico com alta quantidade de água e alta densidade de cargas elétricas (**Figura 13**).



Figura 13: Estrutura e comportamento de inchamento (sensível a variações de pH) dos complexos polieletrólitos contendo quitosana e alginato; as elipses representam as interações iônicas entre as cargas negativas do alginato (-) e as cargas positivas da quitosana (+).

Fonte: RODRIGUES, A.P., Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

2.9 0 microrganismo – Saccharomyces cerevisiae

A célula de Saccharomyces cerevisiae, que utiliza glicose ou sacarose como fonte de energia, é um dos biocatalisadores mais versáteis e de baixo custo. A facilidade de manuseio, que não requer nenhum cuidado especial, o faz alvo de escolha quando se deseja conduzir reações de oxidação-redução. É preferencialmente utilizado na forma de célula inteira, ao invés de enzimas isoladas, evitando dessa forma, o problema da dificuldade de reciclar o cofator, um passo necessário quando se usa a enzima pura. As células inteiras apresentam uma grande variedade de atividades enzimáticas. Por isso, o maior problema encontrado neste tipo de biocatálise é a baixa seletividade, devido à ação simultânea das várias enzimas presentes, que geralmente apresentam diferentes cinéticas e velocidades de conversão para um mesmo substrato. No entanto, quando o processo não é satisfatoriamente seletivo, modificações simples nas condições experimentais podem ser realizadas no sentido de influenciar tanto a estereoquímica como a enantiosseletividade. Algumas das modificações mais comuns são o uso de solventes orgânicos, a adição de inibidores ou co-substratos e as técnicas de imobilização, entre outras (NASCIMENTO et al., 2002; VIEIRA, 2006). Além disso, é muito tolerante às mudanças das condições do meio, por esta razão ele é geralmente preferido para a produção de etanol, permitindo a sobrevivência por décadas. Saccharomyces cerevisiae apresenta, sob condições anaeróbicas, somente a produção de CO₂ e etanol; é geneticamente estável e pode operar em pH mais baixo e em altas concentrações de acúcar (FREGONESI, 1998).

37

Diversos trabalhos relatam o emprego de células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em um suporte para a produção de etanol (BIROL *et al.*, 1998; FREGONESI, 1998; JOEKES *et al.*, 1998; LIU, WANG & OU-YANG, 2009; NAJAFPOUR, YOUNESI & ISMAIL, 2004; WENDHAUSEN *et al.*, 2001).

2.9.1 Interação microrganismo/suporte

Grupos químicos na superfície de um material tendem a interagir com moléculas ou átomos diferentes presentes na fase adjacente (por exemplo, água) e os tipos e forças de interação que devem ocorrer dependerão das propriedades químicas de ambas as fases (FREGONESI, 1998).

Alguns microrganismos têm tendência natural de se aderir sobre superfícies sólidas. O mecanismo exato como o suporte altera o metabolismo celular não está bem claro. Mas de forma geral pode-se dizer que os efeitos estão relacionados à maneira como a célula está imobilizada em um determinado suporte e às mudanças no microambiente ao redor destas células decorrente da imobilização (WENDHAUSEN, 1998).

2.10 Mecanismos da imobilização por adsorção

O mecanismo de adsorção de células em suporte sólido ocorre basicamente devido a:

- Atração eletrostática.
- Área superficial do suporte.
- Composição química da superfície do suporte e da célula e a interação entre eles.

- Energia livre superficial.
- Metabólitos de fixação produzidos pela célula (glicoproteínas) (WENDHAUSEN, 1998).

Com relação à atração eletrostática, o potencial zeta ou carga líquida superficial (ζ), relacionada tanto ao suporte quanto à superfície celular, desempenham importante papel na interação célula/suporte. Esta atração desenvolve uma interação de longo alcance, indispensável para a aproximação das duas espécies (WENDHAUSEN, 1998).

Obviamente as células serão atraídas por superfícies de potencial zeta oposto. Porém, mesmo que as duas espécies tenham potenciais zeta de mesmo sinal, é ainda possível a aproximação pela predominância dos outros fatores (WENDHAUSEN, 1998).

A energia livre superficial é um fator dominante em qualquer sistema de adsorção entre duas espécies. Estudos sobre a adsorção de microrganismos por sólidos de baixa e alta energia livre superficial demonstram que este tipo de interação apresenta dois aspectos importantes:

1. A quantidade de células adsorvidas.

2. A força de adesão das células adsorvidas.

Superfícies de baixa energia livre (abaixo de 100 ergs/cm²) tendem a acumular rapidamente grandes quantidades de células fracamente aderidas, enquanto superfícies de alta energia livre tendem a acumular vagarosamente pequenas quantidades de células mais firmemente aderidas (WENDHAUSEN, 1998).

39

Sólidos inorgânicos possuem, em geral, alta energia livre de superfície. Os argilominerais que constituem parte do solo são, em geral, silicatos de alumínio e magnésio e apresentam grandes variações na superfície e propriedades de hidratação. Grandes quantidades de microrganismos se aderem espontaneamente às grandes áreas superficiais das argilas (2 a 3 m²/g) no meio ambiente (WENDHAUSEN, 1998).

Estudos com microscópio eletrônico sobre o material adsorvido têm demonstrado que a forma de adsorção dos microrganismos inclui adesão por secreção celular de substâncias aderentes. Um importante componente do material adesivo gerado pelas células é o ácido polissacarídico (WENDHAUSEN, 1998).

2.11 Imobilização de células microbianas por aprisionamento em matrizes poliméricas

Segundo Park & Chang (2000), a imobilização celular microbiana em alta densidade não só melhora a produtividade de um reator, mas também proporciona vantagens em relação às células livres, pois as células imobilizadas são protegidas de condições extremas de pH, temperatura, solvente orgânico entre outros. Os mesmos autores afirmam também que células microbianas imobilizadas podem ser manuseadas mais facilmente e recuperadas da solução sem dificuldade. Desta forma, processos contínuos podem ser operados com alta densidade celular sem perdas mesmo com altas taxas de diluição, resultando em um bioreator com alta produtividade volumétrica. Park & Chang (2000) também reportam o método de aprisionamento de células microbianas imobilizadas em matrizes de alginato, quitosana e colágeno, destacando a facilidade da difusão de substratos e produtos nestas matrizes. Além destas citadas, as matrizes podem ser de ágar, agarose, κcarragena e celulose.

Neste trabalho será estudada a fermentação da glicose e da sacarose em regime batelada utilizando a imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em montmorilonita, em óxido de zircônio, em esferas de alginato de cálcio e em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana. Os resultados obtidos serão analisados em comparação com sistemas de fermentação empregando células livres sob as mesmas condições. Será também estudada a estabilidade dos sistemas célula/suporte e será feito um levantamento de dados referentes à imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* visualizando um futuro projeto de reator contínuo para o uso de leveduras imobilizadas.

3. Parte Experimental

3.1 Materiais e Reagentes

Os experimentos foram conduzidos em dois laboratórios especialmente remodelados para esse fim, são eles: LEPAC – Laboratório para o Estudo de Processos de Adsorção e Catálise da Faculdade de Engenharia Química FEQ/UNICAMP e LaBioSin – Laboratório de Biocatálise e Síntese do Instituto de Química – IQ/UNICAMP. A estrutura de equipamentos e afins da Faculdade de Engenharia Química/Unicamp e do Instituto de Química/UNICAMP foram usados como suporte a esse projeto. Tabela 02: Relação dos reagentes utilizados com as respectivas procedências e

lote.

REAGENTE	PROCEDÊNCIA	LOTE	
D-glicose anidra	Synth	139600	
Etanol anidro ≥99,5%	Sigma-Aldrich	49996JK	
Montmorilonita K 10	Sigma-Aldrich	STBB1680	
Extrato de levedura	Oxoid	1116795-02	
Quitosana – médio PM	Sigma-Aldrich	MKBD4275V	
Ácido algínico de sódio -	Sigma-Aldrich	108K1228	
viscosidade média	Sigina-Alui Ich		
Ácido acético glacial	Synth	63730	
Cloreto de cálcio	Aldrich Chemical	iemical	
	Company, Inc.	07219D0	
Ácido algínico de sódio –	Sigma-Aldrich	030M0126V	
viscosidade baixa	Sigina-Alurich		
Peptona bacteriológica	Himedia	0000088433	
Extrato de malte	Himedia	0000058715	
Ágar	Acumedia	102,579 B	
Ácido sulfúrico	Mallinckrodt	2876G02D01	
Amoníaco em solução – 28-30% PA	Merk	K40199523922	
Oxicloreto de zircônio	Alfa Aesar	10144454	
octahidratado - 98%	1111a 1703a1	10111131	

3.2 Instrumentos

A caracterização do óxido de zircônio foi realizada através de Difração de Raios – X (DRX) para determinação da geometria cristalográfica do material e através da área superficial B.E.T. (Brunauer, Emmet e Teller), que forneceu informações sobre a distribuição de tamanho e o volume dos poros. Para os experimentos de Difração de Raios X (DRX) foi utilizada a estrutura do Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração - LRAC da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.

As fermentações foram conduzidas em shaker orbital da marca Marconi, modelo MA-420, do Instituto de Química/UNICAMP.

A avaliação da evolução das fermentações foi realizada através de equipamento de HPLC (High-Performance Liquid Chromatograph) da marca Agilent Technologies, modelo 1200 Series, com coluna Aminex ® HPX-87H, 300mm x 7,8mm (Catalog # 125-0140), serial number: 432844, Bio-rad.

O crescimento celular das células livres foi avaliado através de medidas de absorbância em espectrofotômetro da marca Agilent, modelo HP 8453.

Tabela 03: Relação dos equipamentos utilizados com as respectivas marcas emodelos:

EQUIPAMENTO	MARCA	MODELO	
Ultra-som	Thornton	T14	
HPLC	Agilent Technologies	1200 Series	
Equipamento de fluxo unidirecional	Grupo Veco	CFLV 12	
Autoclave vertical	Prismatec	CS	
Novatécnica eq. j Centrífuga laboratório	Novatécnica eq. para	NT 800	
	laboratório		
Estufa de secagem e	Fanem	315 SE	
esterilização	rancin		
Balança analítica	Mettler Toledo	AB204-S	
Balança semi-analítica	Bel Engineering	-	
pHmetro	Digimed	DM-20	
Agitador magnético	IKA	C-MAG HS7	
Espectrofotômetro	Agilent	HP8453	
Área superficial	Micromeritics	Gemini III 2375	
Difratômetro de Raios-	Philing Analytical	V'Dort DW 2050	
Х	r inips Analytical	A FEILF W 3030	
Incubadora – Shaker	Marconi	MA-420	
orbital	Marcolli	MA-420	

EQUIPAMENTO	MARCA	MODELO
Incubadora – Shaker orbital	Marconi	MA-415
Bomba dosadora peristáltica	Milan	-
Balança	Mettler Toledo	PB 8001-S
Zetasizer – nano series	Malvern instruments	ZS

3.3 Microrganismos

Os microrganismos utilizados nos experimentos foram: *Saccharomyces cerevisiae* Type I liofilizado, Sigma-Aldrich, utilizado para o estudo de imobilização em óxido de zircônio e em montmorilonita K10 e a cepa JAY 270 de *Saccharomyces cerevisiae* (ARGUESO *et al.*, 2009), utilizada para o estudo de imobilização em esferas de alginato de cálcio e em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana, fornecida pelo Instituto de Biologia – IB – Unicamp. A cepa JAY 270 de *Saccharomyces cerevisiae* foi escolhida para o estudo, pois segundo Argueso *et al.*, 2009 esta cepa exibe alta produção de massa celular e de etanol e além disso, é tolerável a altas temperaturas e ao estresse oxidativo.

3.4 Meio de crescimento

O meio utilizado para crescimento do microrganismo possui a seguinte composição: extrato de malte 3,0 g/L; extrato de levedura 3,0 g/L; peptona bacteriológica 5,0 g/L e glicose 10g/L. Este meio foi utilizado para preparar o préinóculo e o inóculo da *S. cerevisiae*.

3.5 Meio de fermentação com glicose

O meio de fermentação utilizado nos experimentos possui a seguinte composição: extrato de levedura 10g/L; peptona bacteriológica 20 g/L e glicose 100g/L.

3.6 Meio de fermentação com sacarose

O meio de fermentação utilizado nos experimentos possui a seguinte composição: extrato de levedura 10g/L; peptona bacteriológica 20 g/L e sacarose 100g/L.

3.7 Montmorilonita K 10

A Montmorilonita K 10 foi obtida comercialmente.

3.8 Síntese do óxido de zircônio

A síntese de óxido de zircônio foi realizada no LEPAC – Laboratório para o Estudo de Processos de Adsorção e Catálise da FEQ/UNICAMP.

Síntese do óxido de zircônio: Precipitação pelo método sol-gel

- Foram adicionados 10 mL de uma solução aquosa de hidróxido de amônio 6,7
 M a uma bureta de 50 mL;
- Em um béquer com agitador magnético, adicionou-se 100 mL de uma solução aquosa de oxicloreto de zircônio 0,1 M e o pH inicial foi determinado;
- Em temperatura ambiente sob agitação branda e constante, a solução de hidróxido de amônio 6,7 M foi gotejada sobre a solução de oxicloreto de zircônio 0,1 M até que fosse atingido e estabilizado o pH 10;
- Após o valor de pH 10 se manter constante, a agitação foi pausada e o sistema foi envelhecido na água-mãe por 2 horas a temperatura ambiente;
- Após 2 horas de envelhecimento o sistema foi filtrado em funil de Büchner usando uma bomba a vácuo, lavado com porções de água destilada até que a água de lavagem atingisse aproximadamente o pH 7;
- Em seguida o sólido foi colocado em um vidro de relógio com o auxílio de uma espátula e seco em estufa a 90°C por 4 horas;
- Após a secagem em estufa o sólido foi transferido para um cadinho e calcinado em ar estático com rampa de aquecimento de 15°C/min durante 1 hora e a 627°C por 5 horas.

3.8.1 Difratograma de raio X

Caracterização através de Difratograma de Raios-X

As condições utilizadas no difratômetro de raios–X Philips Analytical, modelo
 X' Pert PW 3050 do Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração - LRAC
 da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp foram:

 Velocidade de 0,0333°/s e radiação Kα- Cu de comprimento de onda de 1,5406x 10⁻¹⁰ m, com ângulo inicial de 20° e ângulo final de 70°. Passo de 0,020°.

3.8.2 Determinação da área superficial B.E.T.

 Para a determinação da área superficial B.E.T. o óxido de zircônio foi seco em estufa a 150°C por 24 horas e mantido em dessecador até a análise de área superficial. Os dados foram adquiridos a partir do instrumento de análise de área superficial da marca Micromeritics, modelo Gemini III 2375, da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp.

3.8.3 Determinação do potencial zeta (ζ) do óxido de zircônio

 O potencial zeta (ζ) do óxido de zircônio foi determinado em equipamento Zetasizer – nano series da marca Malvern instruments, modelo ZS, do Instituto de Química da Unicamp utilizando uma pequena quantidade de amostra diluída em 1000 µL de solução de KCl 2 mM e 1000 µL de água Milli-Q.

3.9 Imobilização das células de S. cerevisiae em montmorilonita K 10

3.9.1 Determinação da proporção ideal de células de S. cerevisiae e montmorilonita K10

 Foram preparados 5 sistemas em erlenmeyers, adicionando-se 0,60; 0,80; 1,00; 1,20 e 1,40 g de montmorilonita K 10 em 100 mL de solução de *S. cerevisiae*, 10 g/L, obtida a partir da suspensão das células liofilizadas em água destilada na temperatura de 40°C, sob leve agitação;

- Foi preparado um branco em erlenmeyer contendo apenas a suspensão de S. cerevisiae;
- No instante inicial, foram feitas leituras de absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nm de cada um destes sistemas diluindo 100 vezes cada uma das amostras;
- Esses erlenmeyers foram fechados com tampão de algodão e levados ao shaker orbital a 30°C, com agitação de 180 rpm;
- Após 6 e 24 horas, foram feitas leituras de absorbância de cada um destes sistemas a fim de avaliar a adsorção celular à montmorilonita K10. Para estas análises também foram feitas diluições de 100 vezes de cada uma das amostras.

3.10 Imobilização de S. cerevisiae em óxido de zircônio

- Foi adicionado 1,00 g de óxido de zircônio, sob leve agitação, a 100 mL de uma suspensão de S. cerevisiae, 0,8 g/L, em erlenmeyer, preparada seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente;
- Foi preparado um branco contendo apenas a suspensão de *S. cerevisiae*;
- No instante inicial, foram feitas leituras de absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nm;
- Esses erlenmeyers foram fechados com tampão de algodão e levados ao shaker orbital a 30°C, com agitação de 180 rpm;

 Após 2, 8 e 24 horas, foram feitas leituras de absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nm a fim de avaliar a adsorção em óxido de zircônio.

3.10.1 Modificação da superfície do óxido de zircônio com hidróxido de sódio

3.10.1.1 Determinação do volume do ponto úmido do óxido de zircônio

- Uma amostra de óxido de zircônio preparado como o descrito no item 3.8 foi seca em estufa por 24 horas a 110°C;
- Após este período, a amostra foi retirada da estufa e deixada em dessecador por 15 minutos;
- A massa total foi dividida em quatro vidros de relógio, previamente tarados, e pesada em balança analítica;
- Uma bureta de 50 mL foi preenchida com água destilada tomando o cuidado de aferir seu menisco corretamente;
- A amostra de óxido de zircônio contida no vidro de relógio foi posicionada abaixo da bureta;
- O volume do ponto úmido foi determinado através do gotejamento lento da água destilada sobre o óxido de zircônio no vidro de relógio até que um aspecto de pasta fosse alcançado. Esse procedimento foi realizado em quadruplicata.

3.10.1.2 Impregnação do óxido de zircônio com hidróxido de sódio

- As amostras em quadruplicata de óxido de zircônio foram novamente secas em estufa por 24 horas a 110°C e após esse período deixadas em dessecador por 15 minutos;
- Após a determinação do volume do ponto úmido e com posse do valor da área superficial B.E.T. do óxido de zircônio previamente determinada, a concentração necessária da solução de hidróxido de sódio para saturar os poros do óxido de zircônio foi calculada seguindo o cálculo abaixo:
- 1. Área superficial B.E.T. do óxido de zircônio $\sim 10 \text{ m}^2/\text{g}$
- 2. Massa molar do hidróxido de sódio: 40 g/mol
- 3. Densidade superficial de sítios em óxidos é da ordem de 10¹⁸ sítios/m²
- Para a área superficial B.E.T. do óxido de zircônio, a densidade superficial de sítios é da ordem de 10¹⁹ sítios/g
- 5. Média do volume do ponto úmido: 0,3 mL
- 6. Massa de hidróxido de sódio necessária para saturar os poros do óxido de zircônio

massa de hidróxido de sódio = $\frac{10^{19}(\text{sítios/g}) \times 40(\text{g/mol})}{6 \times 10^{23}(\text{g/mol})}$

 \cong 0,67 x 10⁻⁴ g de hidróxido de sódio

(Equação 1)

Concentração da solução de hidróxido de sódio = $\frac{0,67 \times 10^{-4}(g)}{40(g/mol) \times 0,3(mL)}$

 \cong 0,06 mol/L

(Equação 2)

- A impregnação de óxido de zircônio com hidróxido de sódio foi feita através do gotejamento da solução de hidróxido de sódio 0,06 mol/L utilizando-se a média do volume do ponto úmido, 0,3 mL, para cada uma das quatro amostras de óxido de zircônio;
- As amostras foram novamente secas em estufa por 24 horas a 110°C, deixadas em dessecador por 15 minutos;
- As quatro amostras foram misturadas e em seguida foi realizada a medida do potencial zeta desta amostra.

3.10.1.3 Determinação do potencial zeta (ζ) do óxido de zircônio modificado com hidróxido de sódio

 A determinação do potencial zeta (ζ) do óxido de zircônio modificado com hidróxido de sódio foi realizada em equipamento Zetasizer – nano series da marca Malvern instruments, modelo ZS, utilizando uma pequena quantidade de amostra diluída em 1000 μL de solução de KCl 2 mM e 1000 μL de água Milli-Q.

3.10.2 Imobilização de S. cerevisiae em óxido de zircônio modificado com hidróxido de sódio

- Foi adicionado 1 g de óxido de zircônio modificado com hidróxido de sódio, sob leve agitação, a 100 mL de uma suspensão de *S. cerevisiae*, 0,8 g/L, preparada seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente;
- Foi preparado um branco contendo apenas a suspensão de *S. cerevisiae*;
- No instante inicial, foram feitas leituras de absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nm;
- Esses erlenmeyers foram fechados com tampão de algodão e levados ao shaker orbital a 30°C, com agitação de 180 rpm;
- Após 2, 8 e 24 horas, foram feitas leituras de absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nm a fim de avaliar a adsorção em óxido de zircônio modificado.

3.11 Experimentos de fermentação

3.11.1 Fermentação com células livres

3.11.1.1 Pré-inóculo

- Em dois erlenmeyers de 125 mL foram adicionados 20 mL do meio de crescimento com a composição descrita no item 3.4;
- Os erlenmeyers contendo o meio de crescimento foram fechados com tampão de algodão e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos;

- Após o resfriamento, em câmara de fluxo laminar, a cepa JAY 270 de *S. cerevisiae* foi inoculada nos erlenmeyers contendo o meio de crescimento;
- Os erlenmeyers foram levados ao shaker orbital por 9 horas a 30°C, com agitação de 200 rpm.

3.11.1.2 Inóculo

- O inóculo foi preparado dividindo o volume do pré-inóculo, em câmara de fluxo laminar, para quatro erlenmeyers de 2 L contendo 1 L do meio de crescimento cada, previamente fechados com tampão de algodão e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos;
- Esses inóculos foram levados para o shaker orbital por 15 horas a 30°C, com agitação de 200 rpm;
- Após esse período, em câmara de fluxo laminar, os 4 L de inóculo foram divididos em oito frascos plásticos de 500 mL com tampa, previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, e centrifugados a 2000 rpm durante 20 minutos;
- O sobrenadante foi desprezado e as células foram utilizadas para a fermentação.

3.11.1.3 Meio de fermentação com glicose

 Em um erlenmeyer de 500 mL foi preparado 200 mL do meio de fermentação utilizando como fonte de carbono a glicose conforme descrito no item 3.5. O erlenmeyer foi fechado com tampão de algodão e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

3.11.1.4 Meio de fermentação com sacarose

 Em um erlenmeyer de 500 mL foi preparado 200 mL do meio de fermentação utilizando como fonte de carbono a sacarose conforme descrito no item 3.6. O erlenmeyer foi fechado com tampão de algodão e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

3.11.1.5 Fermentação das células livres

3.11.1.5.1 Fermentação das células livres utilizando a glicose como fonte de carbono

- Foram utilizados 100 mL do meio de fermentação contendo a glicose como fonte de carbono para ressuspender a massa celular centrifugada de quatro frascos plásticos de 500 mL conforme descrito no item 3.11.2;
- O volume do meio de fermentação contendo as células ressuspendidas foi adicionado aos 100 mL de meio de fermentação contido erlenmeyer e fechado novamente com tampão de algodão. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar;
- O erlenmeyer foi levado ao shaker orbital por 10 horas a 30°C, com agitação de 200 rpm para a fermentação;
- Neste período, durante as duas primeiras horas, amostras foram retiradas a cada 30 minutos e após este período, as amostras foram retiradas a cada duas horas e congeladas em microtubos de centrífuga para posterior análise em HPLC e em espectrofotômetro. Foram coletadas amostras em triplicata.

3.11.1.5.2 Fermentação das células livres utilizando a sacarose como fonte de carbono

- Foram utilizados 100 mL do meio de fermentação contendo a sacarose como fonte de carbono para ressuspender a massa celular centrifugada de quatro frascos plásticos de 500 mL conforme descrito no item 3.11.2;
- Os passos seguintes para a fermentação das células livres utilizando a sacarose como conte de carbono seguiram como o que foi descrito no item 3.11.5.1.

3.11.2 Fermentação com células imobilizadas

3.11.2.1 Pré-inóculo

 O procedimento para o preparo do pré-inóculo seguiu o descrito no item 3.11.1.1.

3.11.2.2 Inóculo

• O procedimento para o preparo do inóculo seguiu o descrito no item 3.11.1.2.

3.11.2.3 Esferas de alginato de cálcio

 O procedimento descrito abaixo foi feito em duplicata, pois o processo de fermentação foi realizado com duas fontes de carbono: glicose e sacarose.
 Portanto, uma batelada de esferas de alginato de cálcio foi utilizada para a fermentação utilizando a glicose como fonte de carbono e outra batelada para a fermentação utilizando a sacarose como fonte de carbono.

3.11.2.3.1 Solução 3% de alginato de sódio de média viscosidade

 Em dois béqueres foram preparadas soluções 3% de alginato de sódio de média viscosidade adicionando 3 g de alginato de média viscosidade e 100 mL de água destilada sob agitação até a completa dissolução do alginato de sódio.

3.11.2.3.2 Solução 2% de cloreto de cálcio

 Foi preparado 1 L de solução de cloreto de cálcio 2% adicionando 20 g de cloreto de cálcio em um erlenmeyer e 1 L de água destilada sob agitação até a dissolução do cloreto de cálcio.

3.11.2.3.3 Síntese das esferas de alginato de cálcio

- A massa celular obtida de 4 frascos plásticos conforme o descrito no item 3.11.2.1.3, foi ressuspendida em 100 mL de água destilada e adicionada à solução de alginato de sódio permanecendo sob leve agitação.
- Foi montado o aparato apresentados nas Figuras 14 e 15 para a síntese das esferas de alginato de cálcio.
- Uma mangueira de silicone foi mergulhada na mistura contendo alginato de sódio 3% de média viscosidade e a suspensão celular;
- Essa mangueira foi passada por uma bomba peristáltica e conectada a uma seringa com uma agulha na ponta;
- Abaixo da seringa com a agulha foi colocado um béquer com 150 mL da solução de cloreto de cálcio 2% para gotejamento;

 A vazão da mistura contendo alginato de sódio 3% de média viscosidade e a suspensão celular foi ajustada para que a seringa gotejasse de forma constante sobre a solução de cloreto de cálcio 2%;



Figura 14: Aparato para a síntese das esferas de alginato de cálcio.



Figura 15: Aparato utilizado para o gotejamento e produção das esferas de alginato de cálcio.

- Periodicamente a solução de cloreto de cálcio com as esferas de alginato de cálcio foi homogeneizada levemente e aproximadamente no meio do processo, a solução de cloreto de cálcio 2% foi trocada por uma solução nova;
- Após o gotejamento de toda a mistura contendo alginato de sódio 3% de média viscosidade e a suspensão celular, as esferas foram curadas na própria solução de cloreto de cálcio 2% durante 1 hora;
- Após o tempo de cura, as esferas foram filtradas em peneira e lavadas cuidadosamente com quatro porções 100 mL de água destilada e armazenadas sob refrigeração durante uma noite antes do uso na fermentação.

3.11.2.4 Esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana

 O procedimento descrito abaixo foi feito em duplicata, pois o processo de fermentação foi realizado com duas fontes de carbono: glicose e sacarose.
 Portanto, uma batelada de esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana foi utilizada para a fermentação utilizando a glicose como fonte de carbono e outra batelada para a fermentação utilizando a sacarose como fonte de carbono.

3.11.2.4.1 Solução de quitosana 0,25% de médio peso molecular

 Foi adicionado 0,25 g de quitosana de médio peso molecular em 100 mL de uma solução de ácido acético 5% em um béquer sob agitação até completa dissolução.

3.11.2.4.2 Síntese das esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana

- Para a síntese das esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana, foi realizado um experimento idêntico ao descrito no item 3.11.3 até o passo em que as esferas são curadas por 1 hora na solução de cloreto de cálcio 2%, filtradas em peneira e lavadas com quatro porções de 100 mL de água destilada;
- Após esta etapa as esferas foram colocadas em contato com a solução ácida de quitosana 0,25%;
- As esferas foram curadas durante 30 minutos com leves agitações periódicas;
- Após o tempo de cura em solução ácida de quitosana 0,25% as esferas foram filtradas em peneira e lavadas com quatro porções de 100 mL de água destilada e armazenadas, sob refrigeração durante uma noite antes do uso na fermentação.

3.11.2.5 Meio de fermentação com glicose

 O procedimento para o preparo do meio de fermentação com glicose seguiu o descrito no item 3.11.1.3, porém foram preparados dois meios de fermentação com glicose como fonte de carbono, pois um foi utilizado para a fermentação das esferas de alginato de cálcio e outro foi utilizado para a fermentação das esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.

3.11.2.6 Meio de fermentação com sacarose

 O procedimento para o preparo do meio de fermentação com glicose seguiu o descrito no item 3.11.1.4, porém foram preparados dois meios de fermentação com sacarose como fonte de carbono, pois um foi utilizado para a fermentação das esferas de alginato de cálcio e outro foi utilizado para a fermentação das esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.

3.11.2.7 Fermentação das células imobilizadas

- O volume total de esferas de cada uma das duas bateladas de esferas de alginato de cálcio foi de aproximadamente 100 mL;
- Uma batelada foi adicionada a 200 mL de meio de fermentação com glicose como fonte de carbono em câmara de fluxo laminar;
- A outra batelada foi adicionada a 200 mL de meio de fermentação com sacarose como fonte de carbono em câmara de fluxo laminar;
- O mesmo procedimento descrito acima foi feito para as duas bateladas de esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana (o volume total de esferas de alginato de cálcio revetidas com quitosana também foi de aproximadamente 100 mL);
- Os 4 erlenmeyers foram fechados com tampão de algodão e levados ao shaker orbital por 10 horas a 30°C, com agitação de 200 rpm;

3.11.2.8 Ciclos de fermentação

3.11.2.8.1 Oito ciclos de fermentação de 10 horas cada – glicose e sacarose como fontes de carbono

- Para os erlenmeyers contendo glicose como fonte de carbono, foram coletadas amostras a cada 2 horas para os ciclos 1, 3 e 5. Para os ciclos 2, 4, 6, 7 e 8 foram coletadas amostras apenas no tempo inicial e no tempo final da fermentação. As amostras foram congeladas em microtubos de centrífuga para posterior análise em HPLC e em espectrofotômetro. Foram coletadas amostras em triplicata.
- Para os erlenmeyers contendo sacarose como fonte de carbono, foram coletadas amostras a cada 30 minutos durante as 2 horas iniciais dos ciclos 1, 3 e 5 e após esse tempo as amostras foram coletadas a cada 2 horas. Para os ciclos 2, 4, 6, 7 e 8 foram coletadas amostras apenas no tempo inicial e no tempo final da fermentação. As amostras foram congeladas em microtubos de centrífuga para posterior análise em HPLC e em espectrofotômetro. Foram coletadas amostras em triplicata.
- Após 10 horas de fermentação, os 4 erlenmeyers com as esferas de alginato de cálcio que foram fermentadas em meio de fermentação com glicose e em meio de fermentação com sacarose e as esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana que foram fermentadas em meio de fermentação com glicose e em meio de fermentação com sacarose, foram filtradas e lavadas com água destilada separadamente;

- As esferas foram colocadas em 4 meios novos de fermentação, sendo dois meios de 200 mL com glicose e dois meios com 200 mL com sacarose, e foi seguido o mesmo procedimento descrito no item anterior;
- Essa sequência de experimentos reutilizando as mesmas esferas foi repetido por um total de 8 ciclos de aproximadamente 10 horas cada.

3.13.3 Crescimento celular no interior das esferas

Para acompanhar o crescimento celular no interior das esferas, no início do primeiro ciclo de fermentação e ao final de cada ciclo, 20 esferas de alginato de cálcio e 20 esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana foram retiradas e a massa dessas esferas foi determinada. Este experimento foi realizado apenas para os oito ciclos de fermentação utilizando a sacarose como fonte de carbono.

3.11.2.8.2 Três ciclos de fermentação de 2 horas cada – glicose como fonte de carbono

- Foram preparadas esferas de alginato de cálcio e esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana seguindo o procedimento descrito no item 3.11.2;
- Foram preparados 6 meios de fermentação de 200 mL contendo glicose como fonte de carbono conforme o procedimento descrito no item 3.11.1.3, sendo 3 deles para os 3 ciclos de fermentação de 2 horas das esferas de alginato de cálcio e os outros 3 para os 3 ciclos de fermentação de 2 horas das esferas de alginto de cálcio revestidas com quitosana;
- Para 2 erlenmeyers contendo glicose como fonte de carbono, foram coletadas amostras a cada 30 minutos durante as 2 horas de fermentação. As amostras

foram congeladas em microtubos de centrífuga para posterior análise em HPLC e em espectrofotômetro. Foram coletadas amostras em triplicata;

- As esferas de alginato de cálcio e as esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana foram filtradas e lavadas separadamente e colocadas em um novo meio de fermentação;
- Essa sequência de experimentos reutilizando as mesmas esferas foi repetido por um total de 3 ciclos de 2 horas cada.

3.12 Preparo das amostras das fermentações para análise em HPLC

- Para a análise em HPLC, foi descongelado a temperatura ambiente, apenas um microtubo de centrífuga dos três que foram coletados em cada amostragem;
- Em seguida os microtubos contendo as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente;
- As amostras foram filtradas para frascos de vidro com tampa utilizando seringas de vidro acopladas a um filtro de 0,22 μm;
- As amostras foram então diluídas 10 vezes com água Milli-Q e colocadas em frascos apropriados para análise em HPLC.

3.13 Análise do consumo do substrato e da produção do produto das fermentações em HPLC

 Para construir a curva de calibração dos substratos utilizados e do produto gerado nas fermentações e também para analisar as amostras das fermentações, foi preparada uma fase móvel de ácido sulfúrico aquoso de concentração 0,008 N e pH 2,80. Esta fase móvel foi filtrada em filtro de 0,45 μm e degaseificada em equipamento de ultrassom acoplado a uma bomba a vácuo por 12 minutos;

- As condições utilizadas no equipamento de HPLC foram:
- i. Temperatura da coluna: 35°C
- ii. Vazão da fase móvel: 0,4 mL/min
- iii. Volume de injeção de amostra: 40 µL
- iv. Tempo de corrida por amostra: 35 minutos
- v. Detector de índice de refração
 - Inicialmente foram injetados padrões de etanol, glicose e sacarose no equipamento de HPLC para determinar os tempos de retenção de cada um destes componentes;

3.13.1 Construção da curva de calibração do etanol, da glicose e da sacarose

- Para a construção da curva de calibração foram preparadas soluções de etanol, glicose e sacarose na concentração de 15 g/L;
- Foram injetados volumes de 70; 50; 30; 20; 10; 8; 5; 3; 1; 0,8; 0,5; 0,2 e 0,1 μL das soluções de etanol, glicose e sacarose no equipamento de HPLC;
- Através do resultado obtido da área dos picos fornecida pelos diferentes volumes de injeção de etanol, glicose e sacarose, foi possível construir uma curva de calibração de área do pico vs massa de etanol/glicose/sacarose.

3.13.2 Análise das amostras das fermentações

 As amostras das fermentações preparadas como descrito no item 3.14 foram injetadas em equipamento de HPLC utilizando as condições descritas no item 3.15, subitens i – v.

3.14 Análise em Espectrofotômetro

3.14.1 Construção da curva de calibração de S. cerevisiae

- Para a construção da curva de calibração foi preparada uma suspensão da cepa JAY 270 de *S. cerevisiae*, utilizada em todas as fermentações, na concentração inicial de 0,7 g/L em meio de fermentação;
- Essa suspensão inicial foi diluída utilizando o meio de fermentação para as concentrações de: 0,47; 0,35; 0,23; 0,12; 0,06; 0,02 e 0,01 g/L;
- Para cada uma das 7 suspensões de *S. cerevisiae* acima foi determinado o valor de absorbância em espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nm, utilizando o meio de fermentação como branco;
- Com os valores de absorbância e concentração foi possível construir uma curva de calibração de absorbância vs concentração celular.

3.14.2 Análise das amostras das fermentações

- Para a análise em espectrofotômetro, foram descongeladas as outras duas amostras coletadas em microtubos de centrífuga de cada amostragem das fermentações;
- As amostras foram diluídas de acordo com a necessidade para que o valor lido de absorbância ficasse sempre entre 0 e 1.

4. Resultados e Discussões

4.1 Síntese do óxido de zircônio

O óxido de zircônio foi escolhido para o estudo de imobilização de *S. cerevisiae* devido a sua densidade elevada, 5,7 g/cm³, para a fase cristalina monoclínica (BURLESON *et al.*, 2002), e também devido à possibilidade de síntese com alta área superficial B.E.T. A densidade elevada seria interessante neste caso, pois facilitaria a etapa de separação das células do meio de fermentação ao final do processo e desta forma haveria um ganho energético devido a eliminação da etapa de centrifugação. A possibilidade de síntese com alta área superficial para o óxido de zircônio possibilitaria o estudo de processos fermentativos com altas densidades de células imobilizadas.

4.1.1 Difratograma de raios - X

Foram sintetizadas duas amostras de óxido de zircônio, estas amostras foram nomeadas de amostra A e amostra B. As duas amostras produziram os Difratogramas de Raios-X conforme apresentados na **Figura 16**. Os Difratogramas de Raios-X produzidos pelas amostras A e B foram comparados com um Difratograma padrão de Raios-X de óxido de zircônio. Este padrão foi encontrado no banco de dados do equipamento Philips Analytical, modelo X' Pert PW 3050 do Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração - LRAC da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp. O padrão possui o código de referência 01-0750 e corresponde a fase cristalina monoclínica. Este padrão tem como referência o artigo Hanawalt, Rinn & Frevel (1938).

De acordo com a **Figura 16** os picos de maior intensidade do Difratograma de Raios-X do Padrão 01-0750 estão presentes também nas amostras A e B. No padrão 01-0750, os picos de maior intensidade apresentam ângulos 2 Theta em 27,9° e em 31,2°, e como pode ser observado para as amostras A e B os picos de maior intensidade estão em ângulos 2 Theta muito próximos ao do padrão. Portanto pode-se dizer que o óxido de zircônio foi preparado corretamente.


Figura 16: Difratogramas de Raios-X das amostras de óxido de zircônio sintetizadas (Amostra A e Amostra B) e Difratograma de Raios-X do padrão 01-0750.

4.1.2 Determinação da área superficial B.E.T.

A área superficial B.E.T. foi determinada em equipamento da marca Micromeritics, modelo Gemini III 2375 da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp.

Foram feitas duas análises de determinação de área superficial B.E.T. com duas amostras preparadas separadamente. Os valores encontrados foram:

Amostra A: 9,25 m²/g

Amostra B: 11,94 m²/g

Os valores encontrados para a área superficial B.E.T. foram menores do que esperado, porém estão de acordo com valores de área superficial para óxido de zircônio disponível comercialmente.

Para o cálculo de concentração da solução de hidróxido de sódio onde o valor de área superficial B.E.T. foi utilizado, considerou-se o valor de 10 m²/g.

4.1.3 Determinação do potencial zeta (ζ) do óxido de zircônio

A determinação do potencial zeta (ζ) para a amostra sintetizada de óxido de zircônio foi -23,3 mV.

4.2 Imobilização das células de *S. cerevisiae* em montmorilonita K 10

O objetivo deste experimento foi verificar a interação das células de *S. cerevisiae* com a montmorilonita K 10. Como não existem na literatura dados sobre a montmorilonita K 10 como suporte para imobilização da levedura, ou o tipo de

interação entre a montmorilonita K10 e essas células, foram realizados experimentos preliminares a fim de determinar a interação célula/suporte para imobilização.

4.2.1 Determinação da proporção ideal de células de S. cerevisiae e montmorilonita K10

Os 5 sistemas preparados para este estudo foram avaliados através da leitura de absorbância em comprimento de onda de 600 nm. Era esperado que houvesse uma diminuição do valor de absorbância com o tempo indicando que as células de *S. cerevisiae* haviam sido imobilizadas na superfície da montmorilonita K 10. Ou seja, esperava-se uma diminuição na turbidez do meio analisado devido à imobilização no suporte, porém dos dados da **Tabela 04** mostram que não houve uma diminuição no valor da absorbância, indicando que ao final de 24 horas não houve imobilização em montmorilonita K 10. Por este motivo, os experimentos pretendidos de fermentação com células de *S. cerevisiae* imobilizadas em montmorilonita K 10 não foram realizados.

Concentração de	Massa de	Absorbância (nm)		m)
S. cerevisiae	montmorilonita K 10			
(g/L)	(g)	0h	6h	24h
10	0	0,6213	0,6958	0,6174
10	0,60	0,6329	0,7035	0,6859
10	0,80	0,6240	0,7267	0,7964
10	1,00	0,6004	0,7220	0,7479
10	1,20	0,6272	0,7576	0,7769
10	1,40	0,6923	0,7637	0,7871

Tabela 04: Dados de absorbância a 0, 6 e 24 horas para os 5 sistemas preparados de células de *S. cerevisiae* e montmorilonita K 10:

Uma possível explicação para não ocorrer a imobilização das células de *S. cerevisiae* em montmorilonita K10 é a dimensão muito pequena da montmorilonita K10 em relação às células de *S. cerevisiae*. A montmorilonita tem uma dimensão que varia de 0,01 a 1,0 μ m (LEMES, FILHO & PIRES, 2003) enquanto que a célula de *S. cerevisiae* possui forma oval com largura de aproximadamente 5 μ m e comprimento de aproximadamente 10 μ m

(http://www.microbiolobybytes.com/video/Scerevisiae.html).

4.3 Imobilização de *S. cerevisiae* em óxido de zircônio

O sistema preparado para este estudo foi avaliado através da leitura de absorbância em comprimento de onda de 600 nm. Era esperado que houvesse uma diminuição do valor de absorbância com o tempo indicando que as células de *S. cerevisiae* haviam sido imobilizadas na superfície do óxido de zircônio. Ou seja, esperava-se uma diminuição na turbidez do meio analisado devido à imobilização no suporte, porém dos dados da **Tabela 06** mostram que não houve uma diminuição no valor da absorbância, indicando que mesmo ao final de 24 horas não houve imobilização em óxido de zircônio. Por este motivo, os experimentos pretendidos de fermentação com células de *S. cerevisiae* imobilizadas em óxido de zircônio não foram realizados.

Tabela 06: Dados de absorbância a 0, 2, 8 e 24 horas para o sistema preparado com 1,00 g de óxido de zircônio e células de *S. cerevisiae,* 0,8 g/L:

Tempo (h)	0	2	8	24
Absorbância (nm)	0,4984	0,5644	0,5728	0,3075

A partir destes resultados decidiu-se fazer um estudo modificando a acidez da superfície do óxido de zircônio. Como apresentado no item 4.1.3, o óxido de zircônio forneceu o potencial zeta (ζ) de -23,3 mV, e segundo Bowen, Lovitt & Wright (2001), a *S. cerevisiae* apresenta potencial zeta (ζ) negativo, que pode variar de -17,5 mV a -16,1 mV, sendo este um motivo que provavelmente justifica a interação entre as células de *S. cerevisiae* e uma superfície com potencial zeta (ζ) positivo.

4.3.1 Modificação da superfície do óxido de zircônio com hidróxido de sódio

O objetivo deste experimento foi alterar a acidez da superfície do óxido de zircônio para que o potencial zeta (ζ) fornecido fosse positivo. As células de *S. cerevisiae* apresentam um potencial zeta (ζ) negativo que pode variar de -17,5 mV a - 16,1 mV (BOWEN, LOVITT & WRIGHT, 2001), então através da modificação da acidez da superfície do óxido de zircônio, seria possível avaliar se a interação eletrostática entre as células de *S. cerevisiae* e o óxido de zircônio era determinante para que a interação ocorresse.

4.3.1.1 Determinação do volume do ponto úmido do óxido de zircônio

O volume do ponto úmido do óxido de zircônio foi determinado para avaliar o volume de poros da amostra sintetizada de óxido de zircônio. Conhecendo-se o volume de poros do óxido de zircônio é possível calcular a concentração adequada da solução de hidróxido de sódio capaz de saturar os poros deste material.

A **Tabela 07** apresenta massas de amostras de óxido de zircônio sintetizado separadas em quatro vidros de relógio e o volume gasto de água para atingir o volume do ponto úmido. O volume do ponto úmido considerado foi aquele em que a amostra adquiriu o aspecto de uma pasta e é igual ao volume de água gasto para atingir este aspecto. **Tabela 07:** Dados de massa e volume gasto de água determinados para quatroamostras de óxido de zircônio:

Amostra	Massa de óxido de zircônio (g)	Volume gasto de água (mL)
1	1,003	0,30
2	1,001	0,30
3	1,003	0,25
4	1,001	0,25

A partir dos dados da **Tabela 07** tem-se que a média da massa de óxido de zircônio é 1,002 g e a média do volume do ponto úmido é 0,30 mL.

4.3.1.2 Impregnação do óxido de zircônio com hidróxido de sódio

Para a determinação da concentração adequada da solução de hidróxido de sódio para saturar os poros do óxido de zircônio, os seguintes valores do item 3.10.1.2 foram utilizados:

- 1. Área superficial B.E.T. do óxido de zircônio~10 m²/g
- 2. Massa molar do hidróxido de sódio: 40 g/mol
- 3. Densidade superficial de sítios em óxidos é da ordem de 10^{18} sítios/m²
- Para a área superficial B.E.T. do óxido de zircônio, a densidade superficial de sítios é da ordem de 10¹⁹ sítios/g
- 5. Média do volume do ponto úmido: 0,30 mL

6. Massa de hidróxido de sódio necessária para saturar os poros do óxido de zircônio:

massa de hidróxido de sódio =
$$\frac{10^{19}(\text{sítios/g}) \times 40(\text{g/mol})}{6 \times 10^{23}(\text{g/mol})}$$

 \cong 0,67 x 10⁻⁴ g de hidróxido de sódio

(Equação 1)

Concentração da solução de hidróxido de sódio = $\frac{0.67 \times 10^{-4}(g)}{40(g/mol) \times 0.30(mL)}$

$$\approx$$
 0,06 mol/L

(Equação 2)

A partir da equação 2 foi preparada a solução de hidróxido de sódio na concentração calculada e as quatro amostras de óxido de zircônio foram impregnadas com sódio.

4.3.1.3 Determinação do potencial zeta (ζ) do óxido de zircônio modificado com hidróxido de sódio

A determinação do potencial zeta (ζ) para a amostra sintetizada de óxido de zircônio modificada com hidróxido de sódio foi +38,7 mV.

4.3.2 Imobilização de S. cerevisiae em óxido de zircônio modificado com hidróxido de sódio

A partir dos valores de potencial zeta (ζ) positivo, +38,7 mV, para o óxido de zircônio modificado com hidróxido de sódio e potencial zeta (ζ) negativo, variando entre -17,5 e 16,1 mV, para a *S. cerevisiae*, esperava-se que houvesse uma interação entre as células e o suporte devido à atração eletrostática entre eles. Porém, os dados

obtidos para este estudo, apresentados na **Tabela 08**, mostram que não houve interação entre as células e o suporte.

Tabela 08: Dados de absorbância no tempo inicial e após 2, 8 e 24 horas para o sistema preparado com 1,00 g de óxido de zircônio modificado com didróxido de sódio e células de *S. cerevisiae,* 0,8 g/L:

Tempo (h)	0	2	8	24
Absorbância (nm)	0,4572	0,5086	0,5188	0,4503

Como não foi observada a imobilização das células de *S. cerevisiae* em óxido de zircônio modificado com hidróxido de sódio, os experimentos pretendidos de fermentação com células imobilizadas em óxido de zircônio modificado não foram realizados.

4.4 Experimentos de fermentação

4.4.1 Fermentação com células livres

4.4.1.1Fermentação das células livres utilizando a glicose como fonte de carbono

Os objetivos deste experimento foram determinar a produção de etanol, tempo para atingir a produção máxima de etanol, tempo para o consumo total de substrato, rendimento, crescimento celular ao longo da fermentação, utilizando como fonte de carbono a glicose e posteriormente comparar estes dados com aqueles obtidos para a fermentação de células livres utilizando a sacarose como fonte de carbono e com as células imobilizadas. Para este experimento a massa de células úmidas obtida através do inóculo foi de aproximadamente 6 g.

A **Tabela 13** apresenta os valores obtidos para a fermentação de células livres durante um período de 10 horas. Nesta tabela é possível verificar o consumo do substrato, glicose. A **Tabela 14** apresenta os valores obtidos para a produção do produto, etanol, para esta fermentação.

4.4.1.2 Fermentação das células livres utilizando a sacarose como fonte de carbono

Os objetivos deste experimento foram determinar a produção de etanol, tempo para atingir a produção máxima de etanol, tempo para o consumo total de substrato, rendimento, crescimento celular ao longo da fermentação, utilizando como fonte de carbono a sacarose e posteriormente comparar estes dados com aqueles obtidos para a fermentação de células livres utilizando a glicose como fonte de carbono e com as células imobilizadas. Para este experimento a massa de células úmidas obtida através do inóculo foi de aproximadamente 6 g.

A **Tabela 15** apresenta os valores obtidos para a fermentação de células livres durante um período de 10 horas. Nesta tabela é possível verificar o consumo do substrato, sacarose. A **Tabela 16** apresenta os valores obtidos para a produção do produto, etanol, para esta fermentação.

4.4.2.1Fermentação das células imobilizadas utilizando a glicose como fonte de carbono

Os objetivos deste experimento foram determinar a produção de etanol, tempo para atingir a produção máxima de etanol, tempo para o consumo total de substrato, rendimento, crescimento celular livre ao longo da fermentação, número de ciclos de fermentação utilizando as mesmas esferas, estabilidade das esferas de alginato de cálcio e das esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana, utilizando como fonte de carbono a glicose e posteriormente comparar estes dados com aqueles obtidos utilizando a sacarose como fonte de carbono e com aqueles obtidos para a fermentação de células livres (para glicose e sacarose como fontes de carbono). Para cada experimento de células imobilizadas, a massa de células úmidas obtida através do inóculo foi de aproximadamente 6 g. O volume total das esferas utilizadas nos experimentos de fermentação foi de aproximadamente 100 mL, portanto a concentração celular nas esferas foi de 60 g/L.

4.4.2.2Fermentação das células imobilizadas utilizando a sacarose como fonte de carbono

Os objetivos deste experimento foram determinar a produção de etanol, tempo para atingir a produção máxima de etanol, tempo para o consumo total de substrato, rendimento, crescimento celular livre ao longo da fermentação, número de ciclos de fermentação utilizando as mesmas esferas, estabilidade das esferas de alginato de cálcio e das esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana, utilizando como fonte de carbono a sacarose e posteriormente comparar estes dados com aqueles obtidos utilizando a glicose como fonte de carbono e com aqueles obtidos para a fermentação de células livres (para glicose e sacarose como fontes de carbono). Para cada experimento de células imobilizadas, a massa de células úmidas obtida através do inóculo foi de aproximadamente 6 g. O volume total das esferas utilizadas nos experimentos de fermentação foi de aproximadamente 100 mL, portanto a concentração celular nas esferas foi de 60 g/L.

4.4.2.3 Ciclos de fermentação

Para determinar o número de ciclos de fermentação utilizando as mesmas esferas de alginato de cálcio e esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana, ao final de 10 horas, as esferas foram filtradas em peneira simples, lavadas com água destilada e colocada em novos meios de fermentação contendo a glicose ou a sacarose como fontes de carbono. Inicialmente, o primeiro estudo foi feito utilizando o meio de fermentação com glicose como fonte de carbono. A partir destes resultados observouse que a glicose era consumida totalmente até 2 horas de fermentação a partir do segundo ciclo de fermentação. Portanto, ao iniciar o estudo de ciclos de fermentação foi feita a cada 30 minutos nas 2 primeiras horas dos ciclos 1, 3 e 5 para avaliar melhor o consumo dos substratos. Para que o consumo de glicose também fosse avaliado durante as 2 horas iniciais dos ciclos de fermentação, um novo estudo de fermentação foi feito coletando as amostras a cada 30 minutos durante 2 horas iniciais de cada ciclo de fermentação, porém nesta etapa do estudo, foram realizados 3 ciclos de 2 horas cada para avaliar o comportamento do consumo da glicose neste intervalo de tempo.

4.5 Análise do consumo do substrato e da produção do produto das fermentações em HPLC

4.5.1 Construção da curva de calibração do etanol, da glicose e da sacarose

Inicialmente foram injetados padrões para a determinação dos tempos de retenção da glicose, sacarose e etanol. Os valores encontrados estão na **Tabela 09**.

Tabela 09: Valores obtidos em HPLC para os tempos de retenção de amostras padrão de etanol, glicose e sacarose:

Tempo de retenção do	Tempo de retenção da	Tempo de retenção da
etanol (min.)	glicose (min.)	sacarose (min.)
~ 29	~ 13	~11

Para a construção das curvas de calibração do etanol, da glicose e da sacarose, foram preparadas soluções de concentração 15 g/L. Esta concentração foi escolhida pois está dentro do limite máximo detectável pelo equipamento e como a concentração inicial adicionada dos substratos glicose e sacarose para as fermentações foi de 100 g/L, a partir de uma diluição de 10 vezes da amostra, seria possível analisar em HPLC todas as amostras. A curva de calibração foi construída injetando-se volumes de 70; 50; 30; 20; 10; 8; 5; 3; 1; 0,8; 0,5; 0,2 e 0,1 µL das soluções de etanol, glicose e sacarose no equipamento de HPLC. Como a concentração preparada para o etanol, glicose e sacarose foi de 15 g/L, calculou-se a massa injetada para cada um destes volumes. Cada uma destas injeções gerou uma área de pico, esta área versus a massa injetada foi utilizada para a construção das curvas de calibração.

Para a construção da curva de calibração da sacarose, a área do pico considerada foi a soma das áreas da glicose e da frutose, pois quando a sacarose é injetada na coluna cromatográfica contendo a fase móvel de ácido sulfúrico aquoso de concentração 0,008 N a sacarose é quebrada em glicose + frutose. Para a análise das amostras de fermentação, o consumo da sacarose também foi avaliado através da soma das áreas de pico da glicose e da frutose. O tempo de retenção para a sacarose apresentado na **Tabela 09** é uma média obtida entre o tempo de retenção para a glicose e o tempo de retenção para a frutose.

Foi feita a construção de mais de uma curva de calibração para esses compostos, pois as análises foram realizadas em datas diferentes, então para cada nova série de análise das amostras das fermentações em HPLC, uma nova curva de calibração foi construída. Os resultados obtidos em HPLC das injeções de etanol, glicose e sacarose para a construção da curva de calibração estão representados nas **Tabelas 10, 11** e **12**.

Volume de injeção (µL)	Massa de glicose e de etanol (g)	área glicose	área etanol
0,2	3,00E-06	6,93E+04	2,49E+04
0,5	7,50E-06	1,67E+05	6,67E+04
0,8	1,20E-05	2,72E+05	1,00E+05
2	3,00E-05	6,65E+05	2,64E+05
5	7,50E-05	1,65E+06	6,88E+05
8	1,20E-04	2,64E+06	1,03E+06
10	1,50E-04	3,32E+06	1,26E+06
30	4,50E-04	9,81E+06	3,98E+06
50	7,50E-04	1,62E+07	6,62E+06
70	1,05E-03	2,07E+07	9,34E+06

Tabela 10: Resultados obtidos para a construção da curva de calibração para glicose e etanol:



Figura 17: Curva de calibração para a glicose.

A partir da **Figura 17**, a equação da curva de calibração obtida para a glicose foi:



Figura 18: Curva de calibração para o etanol.

A partir da **Figura 18**, a equação da curva de calibração obtida para o etanol foi:

$$y = 9E + 09x - 14145$$
 (Equação 4)

A **Tabela 11** apresenta os dados que foram utilizados para a construção da segunda curva de calibração para a glicose, sacarose e etanol.

Volume de injeção (µL)	Massa de sacarose, glicose e de etanol (g)	área sacarose	área glicose	área etanol
0,08	0,0000012	3,40E+04	2,80E+04	1,01E+04
0,2	0,000003	7,44E+04	6,74E+04	2,72E+04
0,5	0,0000075	1,76E+05	1,68E+05	6,81E+04
0,8	1,20E-05	2,83E+05	2,68E+05	1,09E+05
1	1,50E-05	3,52E+05	3,35E+05	1,37E+05
3	4,50E-05	1,04E+06	1,01E+06	4,05E+05
5	7,50E-05	1,74E+06	1,68E+06	6,87E+05
8	1,20E-04	2,78E+06	2,67E+06	1,10E+06
10	1,50E-04	3,43E+06	3,33E+06	1,37E+06
20	3,00E-04	6,94E+06	6,66E+06	2,81E+06
30	4,50E-04	1,02E+07	9,92E+06	4,09E+06
50	7,50E-04	1,69E+07	1,63E+07	6,72E+06
70	1,05E-03	2,17E+07	2,02E+07	9,51E+06

Tabela 11: Resultados obtidos para a construção da curva de calibração paraglicose, sacarose e etanol:



Figura 19: Curva de calibração para a glicose.

A partir da Figura 19, a equação da curva de calibração obtida para a glicose

foi:



Figura 20: Curva de calibração para a sacarose.

A partir da **Figura 20**, a equação da curva de calibração obtida para a sacarose

foi:

$$y = 2E + 10x + 169247$$
 (Equação 6)



Figura 21: Curva de calibração para o etanol.

A partir da **Figura 21**, a equação da curva de calibração obtida para o etanol foi:

$$y = 9E + 09x + 10047$$
 (Equação 7)

A **Tabela 12** apresenta os dados que foram utilizados para a construção da terceira curva de calibração para a glicose, sacarose e etanol.

	Tabela 12: Rest	ultados obtidos p	oara a constru	ição da curva	a de calibração	para
glicos	e, sacarose e etan	ol:				

Volume de injeção (µL)	Massa de sacarose, glicose e etanol (g)	área sacarose	área glicose	área etanol
0,08	1,2E-06	3,77E+04	2,96E+04	1,02E+04
0,2	3,0E-06	7,66E+04	7,02E+04	2,63E+04
0,5	7,5E-06	1,84E+05	1,69E+05	6,59E+04
0,8	1,2E-05	2,90E+05	2,71E+05	1,07E+05
1	1,5E-05	3,56E+05	3,41E+05	1,36E+05
3	4,5E-05	1,08E+06	1,03E+06	4,17E+05
5	7,5E-05	1,77E+06	1,70E+06	6,90E+05
8	1,2E-04	2,85E+06	2,72E+06	1,10E+06
10	1,5E-04	3,53E+06	3,40E+06	1,40E+06
20	3,0E-04	7,02E+06	6,79E+06	2,83E+06
30	4,5E-04	1,04E+07	1,01E+07	4,26E+06
50	7,5E-04	1,75E+07	1,66E+07	6,97E+06
70	1,1E-03	2,23E+07	2,14E+07	9,61E+06



Figura 22: Curva de calibração para a glicose.

A partir da **Figura 22**, a equação da curva de calibração obtida para a glicose

foi:



Figura 23: Curva de calibração para a sacarose.

A partir da Figura 23, a equação da curva de calibração obtida para a sacarose

foi:

$$y = 2E + 10x + 162978$$
 (Equação 9)



Figura 24: Curva de calibração para o etanol.

A partir da Figura 24, a equação da curva de calibração obtida para o etanol

foi:

4.5.2 Análise das amostras das fermentações

4.5.2.1 Análise das fermentações para células livres

4.5.2.1.1 Fermentação das células livres utilizando a glicose como fonte de carbono

Para o cálculo da massa de glicose e etanol contida em cada amostra foram

utilizadas as equações 8 e 10, respectivamente.

Tabela 13: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células livres:

Tempo (h)	Concentração de glicose	Glicose
Tempo (ii)	(g/L)	(%)
0	94,3	9,4
0,5	85,3	8,6
1	68,7	6,9
1,5	57,2	5,7
2	43,1	4,3
4	0	0
6	0	0
8	0	0
10	0	0

Tabela 14: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células livres utilizando a glicose como fonte de carbono:

Tempo	Concentração de etanol	Etanol
(h)	(g/L)	(%)
0	0	0
0,5	7,0	0,7
1	9,8	1,0
1,5	14,7	1,5
2	20,5	2,1
4	40,0	4,0
6	38,5	3,6
8	39,2	3,9
10	39,4	3,9

Como pode ser observado na **Figura 25**, o consumo total da glicose acorre em aproximadamente 4 horas de fermentação. Com 4 horas de fermentação a produção de etanol é máxima. De acordo com os valores obtidos neste experimento, a produção

de etanol foi de aproximadamente 4% (40g/L) para células livres utilizando a glicose como fonte de carbono. Portanto o rendimento desta reação foi de 78%.



Figura 25: Gráfico apresentando o consumo de glicose e a produção de etanol

durante 10 horas de fermentação utilizando células livres.

4.5.2.1.2 Fermentação das células livres utilizando a sacarose como fonte de carbono

Para o cálculo da massa de sacarose e etanol contida em cada amostra foram

utilizadas as equações 9 e 10, respectivamente.

Tabela 15: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células livres:

Tempo	Concentração de sacarose	Sacarose
<u>(h)</u>	(g/L)	(%)
0	86,0	8,6
0,5	84,8	8,5
1	75,3	7,5
1,5	62,7	6,3
2	49,7	5,0
4	1,4	0,1
6	0	0
8	0	0
10	0	0

Tabela 16: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células livres utilizando a sacarose como fonte de carbono:

Tempo	Concentração de etanol	Etanol
(h)	(g/L)	(%)
0	0	0
0,5	4,3	0,4
1	9,1	0,9
1,5	13,9	1,4
2	19,0	1,9
4	39,5	3,9
6	39,5	3,9
8	40,5	4,1
10	41,7	4,2

Como pode ser observado na **Figura 26**, o consumo total da sacarose ocorre em aproximadamente 4 horas de fermentação. Com 4 horas de fermentação a produção de etanol é máxima. De acordo com os valores obtidos neste experimento, a produção de etanol foi também de aproximadamente 4% (40g/L) para células livres utilizando a sacarose como fonte de carbono. Portanto o rendimento desta reação foi de 74,3%.

De acordo com os dados das **Tabelas 13** à **16** e das **Figuras 25** e **26**, pode-se dizer que não houve diferença na produção final máxima de etanol e também não houve diferença no tempo para que a produção máxima de etanol fosse alcançada e o consumo total das fontes de carbono fossem completadas.



Figura 26: Gráfico apresentando o consumo de sacarose e a produção de etanol durante 10 horas de fermentação utilizando células livres.

4.5.2.2 Análise das fermentações para células imobilizadas

4.5.2.2.1 Fermentação das células imobilizadas utilizando a glicose como fonte de carbono durante oito ciclos de fermentação de 10 horas cada

4.5.2.2.1.1 Fermentação das células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio

O estudo de fermentação para células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio foi realizado em 8 ciclos de fermentação. Para o cálculo da massa de glicose e etanol contida em cada amostra foram utilizadas as equações 3 e 4, respectivamente.

Tabela 17: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o primeiro ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de glicose	Glicose
(h)	(g/L)	(%)
0	84,9	8,5
0,25	72,5	7,2
2	42,8	4,3
4	0,3	0,03
6	0	0
8	0	0
10	0	0

Tabela 18: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o primeiro ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,25	0,4	0,04
2	10,6	1,1
4	28,4	2,8
6	29,9	3,0
8	30,1	3,0
10	30,2	3,0

Tabela 19: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o segundo ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de glicose (g/L)	Glicose (%)
0	84,9	<u> </u>
0,25	63,3	6,3
13	1,5	0,1

Tabela 20: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o segundo ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de etanol	Etanol
<u>(h)</u>	(g/L)	(%)
0	0	0
0,25	8,1	0,8
13	31,5	3,2

Tabela 21: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o terceiro ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de glicose (g/L)	Glicose (%)
0	84,9	8,5
0,25	50,1	5,0
2	2,3	0,2
4	0	0
6	0	0
8	0	0
10	0	0

Tabela 22: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o terceiro ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,25	12,3	1,2
2	33,5	3,3
4	35,8	3,6
6	36,4	3,6
8	35,9	3,6
10	35,6	3,6

Tabela 23: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicosedurante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato decálcio para o quarto ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de glicose	Glicose
(h)	(g/L)	(%)
0	84,9	8,5
0,25	34,9	3,5
14	0,3	0,03

Tabela 24: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o quarto ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,25	17,4	1,7
14	33,7	3,4

Tabela 25: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o quinto ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de glicose (g/L)	Glicose (%)
0	84,9	8,5
0,25	28,6	2,9
2	0,3	0,03
4	0	0
6	0	0
8	0	0
10	0	0

Tabela 26: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o quinto ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de etanol	Etanol
(h)	(g/L)	(%)
0	0	0
0,25	17,4	1,7
2	31,8	3,2
4	32,4	3,2
6	32,9	3,3
8	33,3	3,3
10	33,6	3,4

Tabela 27: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o sexto ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de glicose (g/L)	Glicose (%)
0	84,9	8,5
0,25	30,1	3,0
14	0,5	0,1

Tabela 28: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o sexto ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,25	20,0	2,0
14	32,7	3,3

Tabela 29: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o sétimo ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de glicose (g/L)	Glicose (%)
0	84,9	8,5
0,25	20,6	2,1
9	0	0

Tabela 30: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o sétimo ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de etanol	Etanol
(h)	(g/L)	(%)
0	0	0
0,25	20,8	2,1
9	33,2	3,3

Tabela 31: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o oitavo ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de glicose (g/L)	Glicose (%)
0	84,9	8,5
0,25	20,5	2,0
16	0	0

Tabela 32: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o oitavo ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,25	23,2	2,3
16	32,2	3,2

Como pode ser observado na **Figura 27**, o consumo total da glicose é mais lento apenas no primeiro ciclo de fermentação e ocorre em aproximadamente 4 horas. Já para o terceiro e quinto ciclos de fermentação, o consumo total da glicose ocorre em 2 horas de fermentação.



Figura 27: Gráfico apresentando o consumo de glicose durante 10 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio.

De acordo com a **Figura 28** pode-se notar que a produção de etanol é mais lenta e menor para o primeiro ciclo de fermentação, para o terceiro e quinto ciclo de fermentação a produção de etanol é mais rápida e maior e ocorre em aproximadamente 4 horas. A média de produção de etanol para os oito ciclos de fermentação foi de 3,3% (33 g/L), portanto o rendimento médio foi de 64,6%.

O comportamento das células frente ao consumo de glicose e produção de etanol ao longo dos ciclos pode ser explicado devido a uma adaptação das células ao microambiente onde estão imobilizadas e também às condições do meio de fermentação.



Figura 28: Gráfico apresentando a produção de etanol durante 10 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio.

A **Figura 29** apresenta a produção de etanol ao final de cada ciclo de fermentação. De acordo com essa figura pode-se notar que a produção de etanol durante os oito ciclos de fermentação manteve-se estável. Portanto, o reuso das células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio não causa efeito negativo no rendimento da produção de etanol.



Figura 29: Gráfico apresentando a produção de etanol obtida no final de 10 horas de cada ciclo de fermentação (total de 8 ciclos), durante 10 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio.

A **Figura 30** apresenta as esferas de alginato de cálcio ao final do primeiro ciclo e ao final do oitavo ciclo. Nesta figura é possível observar o aumento do volume das esferas de alginato de cálcio e também o rompimento das esferas ao final do oitavo ciclo. Ao longo dos ciclos de fermentação, além da multiplicação celular, o intumescimento das esferas (RODRIGUES, 2008) as torna mais frágeis, ao ponto que ao final do oitavo ciclo, muitas esferas estão rompidas ou totalmente destruídas e são solubilizadas no meio de fermentação.

Uma alternativa para manter a estabilidade das esferas por mais tempo, seria diminuir o tempo dos ciclos de fermentação, já que como apresentado na **Figura 28**, após o primeiro ciclo de fermentação, a produção máxima de etanol é alcançada com aproximadamente 6 horas. Outro parâmetro que poderia ser avaliado seria a velocidade de agitação. Nestes estudos a agitação utilizada foi de 200 rpm, esta agitação provoca um atrito entre as esferas contribuindo para seu rompimento.



Figura 30: Esferas de alginato de cálcio em meio de fermentação ao final do primeiro ciclo (Imagem à esquerda); esferas de alginato de cálcio em meio de fermentação ao final do oitavo ciclo (Imagem à direita).

4.5.2.2.1.2 Fermentação das células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana

O estudo de fermentação para células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana foi realizado em 8 ciclos de fermentação. Para o cálculo da massa de glicose e etanol contida em cada amostra foram utilizadas as equações 3 e 4, respectivamente.
Tabela 33: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicosedurante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato decálcio revestidas com quitosana para o primeiro ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de glicose (g/L)	Glicose (%)
0	84,9	8,5
0,25	68,6	6,9
2	63,5	6,3
4	47,3	4,7
6	28,4	2,8
8	2,4	0,2
10	0	0

Tabela 34: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanoldurante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato decálcio revestidas com quitosana para o primeiro ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,25	2,2	0,2
2	4,1	0,4
4	6,7	0,7
6	13,7	1,4
8	28,2	2,8
10	31,2	3,1

Tabela 35: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicosedurante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato decálcio revestidas com quitosana para o segundo ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de glicose (g/L)	Glicose (%)
0	84,9	8,5
0,25	60,0	6,0
13	2,0	0,2

Tabela 36: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o segundo ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de etanol	Etanol
(h)	(g/L)	(%)
0	0	0
0,25	8,4	0,8
13	32,9	3,3

Tabela 37: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o terceiro ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de glicose (g/L)	Glicose (%)
0	84,9	8,5
0,25	35,3	3,5
2	10,3	1,0
4	0	0
6	0	0
8	0	0
10	0	0

Tabela 38: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanoldurante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato decálcio revestidas com quitosana para o terceiro ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,25	14,5	1,4
2	25,4	2,5
4	28,8	2,9
6	33,0	3,3
8	32,2	3,2
10	31,4	3,1

Tabela 39: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o quarto ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de glicose (g/L)	Glicose (%)
0	84,9	8,5
0,25	24,4	2,4
14	0	0

Tabela 40: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o quarto ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,25	15,4	1,5
14	29,2	2,9

Tabela 41: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicosedurante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato decálcio revestidas com quitosana para o quinto ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de glicose	Glicose
<u>(h)</u>	(g/L)	(%)
0	84,9	8,5
0,25	81,8	8,2
2	11,7	1,2
4	0	0
6	0	0
8	0	0
10	0	0

Tabela 42: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanoldurante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato decálcio revestidas com quitosana para o quinto ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,25	4,7	0,5
2	26,1	2,6
4	30,5	3,1
6	31,7	3,2
8	31,4	3,1
10	31,4	3,1

Tabela 43: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicosedurante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato decálcio revestidas com quitosana para o sexto ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de glicose (g/L)	Glicose (%)
0	84,9	8,5
0,25	17,8	1,8
14	0	0

Tabela 44: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o sexto ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de etanol	Etanol
(h)	(g/L)	(%)
0	0	0
0,25	20,4	2,0
14	28,9	2,9

Tabela 45: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o sétimo ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de glicose	Glicose
(h)	(g/L)	(%)
0	84,9	8,5
0,25	13,3	1,3
9	0	0

Tabela 46: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o sétimo ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,25	21,4	2,1
9	29,0	2,9

Tabela 47: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o oitavo ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de glicose	Glicose
(h)	(g/L)	(%)
0	84,9	8,5
0,25	15,0	1,5
16	0	0

Tabela 48: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o oitavo ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,25	23,0	2,3
16	31,2	3,1

A **Figura 31** apresenta o consumo da glicose para as células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana. Pode-se observar, que assim como para as células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio, o consumo da

glicose é mais lento apenas no primeiro ciclo de fermentação. No primeiro ciclo, o consumo total de glicose ocorre em aproximadamente 8 horas de fermentação, já para o terceiro e quinto ciclo, o consumo total da glicose ocorre em aproximadamente 4 horas.



Figura 31: Gráfico apresentando o consumo de glicose durante 10 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.

A **Figura 32** apresenta a produção de etanol ao longo do primeiro, terceiro e quinto ciclo de fermentação. É possível observar que a produção máxima de etanol é alcançada apenas após 10 horas para o primeiro ciclo, e após 6 horas para o terceiro e quinto ciclo. A média de produção de etanol para os oito ciclos de fermentação foi de 3,1% (31 g/L), portanto o rendimento médio foi de 60,7%.



Figura 32: Gráfico apresentando a produção de etanol durante 10 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.

Comparando os perfis de consumo da glicose das **Figuras 27 e 31**, ou seja, para as células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio e em alginato de cálcio revestidas com quitosana, respectivamente, é possível observar que o consumo de glicose é mais lento quando as células estão imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana. Para as esferas de alginato de cálcio o consumo total de glicose ocorre após aproximadamente 2 horas, já para as esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana, o consumo total de glicose ocorre apenas após aproximadamente 4 horas, excluindo-se o primeiro ciclo em ambos os casos. O mesmo comportamento é observado para a produção de etanol, comparando as **Figuras 28** e **32**, nota-se que o máximo de produção de etanol é alcançado com aproximadamente 4 horas para as esferas de alginato de cálcio, já para as esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana o máximo de produção de etanol é alcançado apenas após aproximadamente 6 horas. Isto ocorre provavelmente devido a dificuldade da passagem do substrato, glicose, para as células e devido à camada de quitosana que oferece uma resistência a passagem do substrato devido uma diminuição dos poros das esferas de alginato de cálcio (ALBARGHOUTHI *et al.*, 2000).

A **Figura 33** apresenta a produção de etanol ao final de cada ciclo de fermentação. De acordo com essa figura pode-se notar que a produção de etanol durante os oito ciclos de fermentação manteve-se estável. Portanto, o reuso das células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana também não causa efeito negativo no rendimento da produção de etanol.



Figura 33: Gráfico apresentando a produção de etanol obtida no final de 10 horas de cada ciclo de fermentação (total de 8 ciclos), durante 10 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.

A Figura 34 apresenta as esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana após 2 horas de fermentação do primeiro ciclo e ao final do oitavo ciclo. Assim como na Figura 30, é possível notar o aumento do volume das esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana, porém este aumento é menor, o que pode ser justificado pela barreira oferecida pela quitosana à entrada de água na esfera. Desde o início dos ciclos de fermentação as esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana apresentaram volume menor do que as esferas de alginato de cálcio. Outra observação é que ao final do oitavo ciclo de fermentação a quantidade de esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana que estavam rompidas foi menor do que a quantidade observada para as esferas de aginato de cálcio. Portanto, a quitosana desempenhou o papel desejado de oferecer maior dureza e rigidez às esferas, porém não foi suficientemente adequado, pois mesmo a quantidade de esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana rompida ser menor o que a quantidade de esferas de alginato de cálcio rompidas, ainda assim está em grande quantidade para continuar com mais um ciclo de fermentação. Para avaliar melhor o comportamento da quitosana como agente protetor para esferas de alginato de cálcio, um estudo envolvendo diferentes concentrações de quitosana e tempo de cura seria interessante para ser desenvolvido.



Figura 34: Esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana em meio de fermentação após 2 horas do primeiro ciclo (Imagem à esquerda); esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana em meio de fermentação ao final do oitavo ciclo (Imagem à direita).

4.5.2.2.2 Fermentação das células imobilizadas utilizando a sacarose como fonte de carbono durante oito ciclos de fermentação de 10 horas cada

4.5.2.2.2.1 Fermentação das células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio

O estudo de fermentação para células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio foi realizado em 8 ciclos de fermentação. Para o cálculo da massa de sacarose e etanol contida em cada amostra foram utilizadas as equações 6 e 7, respectivamente. **Tabela 49:** Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o primeiro ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de sacarose	Sacarose
(h)	(g/L)	(%)
0	105,4	10,5
0,25	78,0	7,8
0,5	48,3	4,8
1	36,5	3,7
1,5	19,8	2,0
2	8,5	0,9
3	1,6	0,2
5	0,7	0,1
6	0	0
8	0	0
10	0	0

Tabela 50: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o primeiro ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,25	0	0
0,5	0,2	0,02
1	0,5	0,1
1,5	0,8	0,1
2	25,3	2,5
3	17,5	1,7
5	23,3	2,3
6	27,0	2,7
8	24,5	2,4
10	25,4	2,5

Tabela 51: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o segundo ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de sacarose (g/L)	Sacarose (%)
0	105,4	10,5
0,25	60,1	6,0
13	4,0	0,4

Tabela 52: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o segundo ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,25	7,7	0,8
13	33,5	3,3

Tabela 53: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o terceiro ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de sacarose	Sacarose
(h)	(g/L)	(%)
0	105,4	10,5
0,25	49,5	4,9
0,5	41,9	4,2
1	25,0	2,5
1,5	6,3	0,6
2	3,3	0,3
4	0	0
8	0	0
10	0	0

Tabela 54: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o terceiro ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,25	11,9	1,2
0,5	0,7	0,1
1	1,1	0,1
1,5	1,4	0,1
2	35,9	3,6
4	33,9	3,4
8	38,4	3,8
10	39,0	4,0

Tabela 55: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o quarto ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de sacarose	Sacarose
(h)	(g/L)	(%)
0	105,4	10,5
0,25	53,5	5,3
14	4,1	0,4

Tabela 56: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o quarto ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,25	16,7	1,7
14	27,8	2,8

Tabela 57: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o quinto ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de sacarose	Sacarose
(h)	(g/L)	(%)
0	105,4	10,5
0,25	53,2	5,3
0,5	42,2	4,2
1	16,2	1,6
1,5	4,0	0,4
2	4,5	0,5
4	0	0
6	0	0
8	0	0
10	0	0

Tabela 58: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o quinto ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de etanol	Etanol
(h)	(g/L)	(%)
0	0	0
0,25	13,0	1,3
0,5	0,8	0,1
1	0,7	0,1
1,5	1,2	0,1
2	32,1	3,2
4	30,4	3,0
6	36,2	3,6
8	37,4	3,7
10	37,5	3,7

Tabela 59: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o sexto ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de sacarose (g/L)	Sacarose (%)
0	105,4	10,5
0,25	42,3	4,2
13	3,2	0,3

Tabela 60: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o sexto ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,25	18,4	1,8
13	35,1	3,5

Tabela 61: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o sétimo ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de sacarose	Sacarose
(h)	(g/L)	(%)
0	105,4	10,5
0,25	43,5	4,3
9	2,2	0,2

Tabela 62: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o sétimo ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,25	17,9	1,8
9	35,3	3,5

Tabela 63: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o oitavo ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de sacarose (g/L)	Sacarose
0	105,4	10,5
0,25	32,1	3,2
15	0,8	0,1

Tabela 64: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanoldurante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato decálcio para o oitavo ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de etanol	Etanol
(h)	(g/L)	(%)
0	0	0
0,25	18,7	1,9
15	34,4	3,4

Como pode ser observado na **Figura 35**, o consumo total da sacarose ocorre para o terceiro e quinto ciclo em aproximadamente 2 horas sendo um pouco mais lento para o primeiro ciclo. Diferentemente do que ocorre para o perfil de consumo da glicose (**Figura 27**) o consumo de sacarose para o primeiro ciclo de fermentação é semelhante ao terceiro e quinto ciclo. No entanto, a velocidade com que o consumo total dos substratos glicose e sacarose ocorrem é a mesma, 2 horas aproximadamente.





De acordo com a **Figura 36** pode-se notar que a produção de etanol é mais lenta e menor para o primeiro ciclo de fermentação, para o terceiro e quinto ciclo de fermentação a produção de etanol é maior e é alcançada mais rapidamente. A média de produção de etanol para os oito ciclos de fermentação foi de 3,3% (33 g/L), portanto o rendimento médio foi de 61,3%.



Figura 36: Gráfico apresentando a produção de etanol durante 10 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio.

A **Figura 37** apresenta a produção de etanol ao final de cada ciclo de fermentação. De acordo com essa figura pode-se notar que a produção de etanol durante os oito ciclos de fermentação manteve-se estável com exceção do quarto ciclo onde talvez tenha havido algum erro durante o preparo da amostra para análise em HPLC. Portanto, o reuso das células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio também não causa efeito negativo no rendimento da produção de etanol.



Figura 37: Gráfico apresentando a produção de etanol obtida no final de 10 horas de cada ciclo de fermentação (total de 8 ciclos), durante 10 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio.

A **Figura 38** apresenta as esferas de alginato de cálcio em meio de fermentação ao final do primeiro ciclo e ao final do oitavo ciclo utilizando a sacarose como meio de fermentação. Assim como para as fermentações utilizando a glicose como fonte de carbono, observa-se um aumento do volume das esferas ao final dos ciclos de fermentação, assim como uma crescente fragilidade das esferas devido ao intumescimento de água, multiplicação celular e desgaste por atrito mecânico devido à agitação.



Figura 38: Esferas de alginato de cálcio em meio de fermentação ao final do primeiro ciclo (Imagem à esquerda); esferas de alginato de cálcio meio de fermentação ao final do oitavo ciclo (Imagem à direita).

Para o ajuste linear dos dados de fermentação de células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio foram utilizados os dados obtidos para o terceiro e quinto ciclo de fermentação. Estes ciclos foram escolhidos por apresentarem dados coletados a cada 30 minutos durante as 2 horas iniciais de fermentação e a cada 2 horas após este período. Não foi escolhido o primeiro ciclo, pois este pode representar uma fase de adaptação celular às novas condições de imobilização e fermentação. Para esse ajuste foi assumido que o sistema se encontrava em estado estacionário, onde o substrato é consumido apenas para a manutenção celular e produção de produto. Também foi assumido que a concentração celular não variou com o tempo e se manteve constante em 60 g/L, correspondente ao valor inicial de células imobilizadas adicionada à fermentação. De acordo com os resultados da **Tabela 81**, assumir que a

concentração celular é constante ao longo dos ciclos de fermentação é razoável, uma vez que após 94 h (8 ciclos de fermentação), a massa correspondente a 20 esferas de alginato de cálcio aumentou apenas 2,7%, sendo que este aumento deve-se além da multiplicação celular, à absorção de água pelas esferas.

As equações 11 e 12 (FOGLER, 2006) abaixo foram simplificadas e a equação 13 foi utilizada para os cálculos de linearização.

$$V\frac{dC_s}{dt} = -mC_cV + Y_{\frac{s}{p}}(-r_p)V$$

(Equação 11)

$$V\frac{dC_p}{dt} = r_p V = Y_{\frac{p}{s}}(-r_s)V$$

(Equação 12)

$$\frac{d(C_s+C_p)}{dt} = -m C_c$$

(Equação 13)

Onde C_c é a concentração de células em g/L imobilizadas em esferas de alginato de cálcio, C_s é a concentração de substrato em g/L, C_p é a concentração de produto em g/L e m é a manutenção celular em g de substrato/g de células secas x h.

Os valores de m obtidos mediante o ajuste linear para o terceiro e quinto ciclo de fermentação foram 0,56 h⁻¹ e 0,58 h⁻¹, respectivamente. Um valor típico descrito na

literatura para a manutenção celular em fermentação com células livres é 0,05 h⁻¹ (FOGLER, 2006). O valor obtido mediante o ajuste linear foi aproximadamente 10 vezes maior que o descrito na literatura. Uma possível explicação para este aumento no valor de manutenção celular seria o estresse sofrido pelas células durante o processo de imobilização, ou seja, durante a imobilização, fermentação e novas condições de microambiente devido á imobilização, as células gastam muito mais energia para se manterem.

4.5.2.2.2 Fermentação das células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana

O estudo de fermentação para células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana foi realizado em 8 ciclos de fermentação. Para o cálculo da massa de sacarose e etanol contida em cada amostra foram utilizadas as equações 6 e 7, respectivamente.

 Tabela 65: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose

 durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de

 cálcio revestidas com quitosana para o primeiro ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de sacarose	Sacarose
(h)	(g/L)	(%)
0	105,4	10,5
0,25	71,5	7,1
0,5	61,1	6,1
1	65,8	6,6
1,5	66,3	6,6
2	51,8	5,2
3	58,0	5,8
5	23,9	2,4
6	49,6	5,0
8	37,9	3,8
10	32,2	3,2

Tabela 66: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o primeiro ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,25	0	0
0,5	0	0
1	0	0
1,5	0	0
2	2,8	0,3
3	3,9	0,4
5	5,1	0,5
6	8,3	0,8
8	10,0	1,0
10	15,3	1,5

Tabela 67: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarosedurante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato decálcio revestidas com quitosana para o segundo ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de sacarose (g/L)	Sacarose (%)
0	105,4	10,5
0,25	68,7	6,9
13	3,9	0,4

Tabela 68: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o segundo ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de etanol	Etanol
(h)	(g/L)	(%)
0	0	0
0,25	5,0	0,5
13	36,2	3,6

Tabela 69: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o terceiro ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de sacarose	Sacarose
(h)	(g/L)	(%)
0	105,4	10,5
0,25	37,8	3,8
0,5	45,7	4,6
1	43,0	4,3
1,5	42,7	4,3
2	32,9	3,3
4	2,0	0,2
8	0	0
10	0	0

Tabela 70: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanoldurante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato decálcio revestidas com quitosana para o terceiro ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de etanol	Etanol
(h)	(g/L)	(%)
0	0	0
0,25	16,3	1,6
0,5	0,5	0,1
1	0,4	0,04
1,5	0,6	0,1
2	16,7	1,7
4	37,0	3,7
8	32,5	3,3
10	31,8	3,2

Tabela 71: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o quarto ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de sacarose	Sacarose
(h)	(g/L)	(%)
0	105,4	10,5
0,25	43,1	4,3
14	3,0	0,3

Tabela 72: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanoldurante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato decálcio revestidas com quitosana para o quarto ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,25	15,8	1,6
14	33,5	3,3

Tabela 73: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarosedurante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato decálcio revestidas com quitosana para o quinto ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de sacarose	Sacarose
<u>(h)</u>	(g/L)	(%)
0	105,4	10,5
0,25	37,7	3,8
0,5	37,2	3,7
1	33,3	3,3
1,5	23,8	2,4
2	13,6	1,4
4	0	0
6	0	0
8	0	0
10	0	0

Tabela 74: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o quinto ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de etanol	Etanol
(h)	(g/L)	(%)
0	0	0
0,25	17,5	1,7
0,5	0,8	0,1
1	0,9	0,1
1,5	1,0	0,1
2	27,1	2,7
4	35,8	3,6
6	34,4	3,4
8	34,5	3,5
10	36,8	3,7

Tabela 75: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarosedurante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato decálcio revestidas com quitosana para o sexto ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de sacarose (g/L)	Sacarose (%)
0	105,4	10,5
0,25	37,4	3,7
13	1,4	0,1

Tabela 76: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o sexto ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de etanol	Etanol
(h)	(g/L)	(%)
0	0	0
0,25	18,0	1,8
13	33,3	3,3

Tabela 77: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o sétimo ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de sacarose	Sacarose
(h)	(g/L)	(%)
0	105,4	10,5
0,25	32,8	3,3
9	0,2	0,02

Tabela 78: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanoldurante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato decálcio revestidas com quitosana para o sétimo ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,25	20,1	2,0
9	33,2	3,3

Tabela 79: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de sacarose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o oitavo ciclo de fermentação:

Tempo	Concentração de sacarose	Sacarose
(h)	(g/L)	(%)
0	105,4	10,5
0,25	42,9	4,3
15	0,7	0,1

Tabela 80: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o oitavo ciclo de fermentação:

Tempo (h)	Concentração de etanol	Etanol (%)
0	0	0
0,25	17,8	1,8
15	34,4	3,4

Como pode ser observado na **Figura 39** o consumo total da sacarose ocorre para o terceiro e quinto ciclo em aproximadamente 4 horas, porém após 10 horas o consumo de sacarose não é totalizado para o primeiro ciclo. Excluindo o primeiro ciclo de fermentação, o comportamento do terceiro e do quinto ciclo é bastante semelhante com o que ocorre no perfil de consumo da glicose (**Figura 31**).



Figura 39: Gráfico apresentando o consumo de sacarose durante 10 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.

A **Figura 40** apresenta a produção de etanol ao longo do primeiro, terceiro e quinto ciclo de fermentação. É possível observar que a produção máxima de etanol não é alcançada mesmo após 10 horas para o primeiro ciclo, pois não houve o consumo total da sacarose. A produção máxima é alcançada após aproximadamente 4 horas para o terceiro e quinto ciclo. A média de produção de etanol para os oito ciclos de fermentação foi de 3,2% (32 g/L), portanto o rendimento médio foi de 59,5%.



Figura 40: Gráfico apresentando a produção de etanol durante 10 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.

A **Figura 41** apresenta a produção de etanol ao final de cada ciclo de fermentação. De acordo com essa figura pode-se notar que a produção de etanol durante os oito ciclos de fermentação manteve-se estável. Portanto, o reuso das células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana também não causa efeito negativo no rendimento da produção de etanol.



Figura 41: Gráfico apresentando a produção de etanol obtida no final de 10 horas de cada ciclo de fermentação (total de 8 ciclos), durante 10 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.

A **Figura 42** apresenta as esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana em meio de fermentação ao final do primeiro ciclo e ao final do oitavo ciclo utilizando a sacarose como meio de fermentação. Nestes experimentos também se observa um aumento do volume das esferas ao final dos ciclos de fermentação, como dito anteriormente, ocorre um aumento da fragilidade das esferas devido ao intumescimento de água, multiplicação celular e desgaste por atrito mecânico devido à agitação.



Figura 42: Esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana em meio de fermentação ao final do primeiro ciclo (Imagem à esquerda); esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana em meio de fermentação ao final do oitavo ciclo (Imagem à direita).

Para o ajuste linear dos dados de fermentação de células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana foram utilizados os dados obtidos para o terceiro e quinto ciclo de fermentação e a equação 13. Também foi assumido que a concentração celular não variou com o tempo e se manteve constante em 60 g/L, correspondente ao valor inicial de células imobilizadas adicionada à fermentação. De acordo com os resultados da **Tabela 81**, assumir que a concentração celular é constante ao longo dos ciclos de fermentação é razoável, uma vez que após 94 h (8 ciclos de fermentação), a massa correspondente a 20 esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana aumentou apenas 2,5%, sendo que este aumento deve-se além da multiplicação celular, à absorção de água pelas esferas.

Os valores de m obtidos mediante o ajuste linear para o terceiro e quinto ciclo de fermentação foram 0,38 h⁻¹ e 0,47 h⁻¹, respectivamente. Novamente observa-se que os valores de manutenção são muito maiores que o valor típico descrito na literatura, 0,05 h⁻¹, e como dito anteriormente, possivelmente este aumento se deve ao estresse sofrido pelas células no processo de imobilização.

4.5.2.2.3 Crescimento celular no interior das esferas

O objetivo deste experimento foi acompanhar o crescimento celular no interior das esferas durante os ciclos de fermentação. Para isso, no início do primeiro ciclo de fermentação, utilizando a sacarose como fonte de carbono, 20 esferas de alginato de cálcio e 20 esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana foram retiradas e a massa dessas esferas foi determinada. O mesmo procedimento foi repetido ao final deste ciclo e ao final de cada ciclo de fermentação. Os resultados de massa das 20 esferas de alginato de cálcio e das 20 esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana estão representados na **Tabela 81** de acordo com o ciclo de fermentação e o tempo de fermentação desde o início. **Tabela 81:** Massa de 20 esferas de alginato de cálcio e de 20 esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana no início do primeiro ciclo e ao final dos ciclos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8. O tempo de fermentação total também está apresentado.

Tempo (h)	Ciclo nº	Massa de 20 esferas de alginato de cálcio (g)	Massa de 20 esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana (g)
0	1	52,0469	46,6314
10	1	51,9868	46,6664
23	2	52,1459	46,8830
33	3	52,4066	47,0376
47	4	52,4993	47,1195
57	5	52,5591	47,2551
70	6	52,8430	47,3450
79	7	52,9450	47,3791
94	8	53,4584	47,7887

O aumento da massa das 20 esferas de alginato de cálcio e das 20 esferas de

alginato de cálcio revestidas com quitosana também está apresentado na Figura 43.



Figura 43: Aumento da massa das 20 esferas de alginato de cálcio e das 20 esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana ao longo do tempo total dos ciclos de fermentação.

Através da análise dos resultados da **Tabela 81** e da **Figura 43**, observa-se que o aumento da massa das 20 esferas de alginato de cálcio e das 20 esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana ao longo das fermentações é pequeno. Ao final do oitavo ciclo de fermentação, ou seja, após 94 horas de fermentação, o aumento das 20 esferas de alginato de cálcio foi de 2,7% e o aumento das 20 esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana foi de 2,5%. O aumento da massa celular deve-se não somente à multiplicação celular, mas também à absorção de água pelas esferas durante a fermentação.
4.5.2.2.4 Fermentação das células imobilizadas utilizando a glicose como fonte de carbono durante três ciclos de fermentação de 2 horas

4.5.2.2.4.1 Fermentação das células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio

Tabela 82: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicosedurante a evolução da fermentação durante 2 horas com células imobilizadas emesferas de alginato de cálcio para o primeiro ciclo de fermentação:

tempo	Concentração de glicose	Glicose
(h)	(g/L)	(%)
0	84,5	8,4
0,5	55,8	5,6
1	49,9	5,0
1,5	29,6	3,0
2	6,5	0,6

Tabela 83: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação durante 2 horas com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o primeiro ciclo de fermentação:

tempo	Concentração de etanol	Etanol
(h)	(g/L)	(%)
0	0	0
0,5	4,7	0,5
1	10,3	1,0
1,5	12,8	1,3
2	10,4	1,0

Tabela 84: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o segundo ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de glicose (g/L)	Glicose (%)
0	84,5	8,4
0,5	51,2	5,1
1	35,7	3,6
1,5	24,1	2,4
2	3,7	0,4

Tabela 85: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanoldurante a evolução da fermentação durante 2 horas com células imobilizadas emesferas de alginato de cálcio para o segundo ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,5	11,0	1,1
1	19,5	1,9
1,5	26,1	2,6
2	25,5	2,6

Tabela 86: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação durante 2 horas com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o terceiro ciclo de fermentação:

tempo	Concentração de glicose	Glicose
(h)	(g/L)	(%)
0	84,5	8,4
0,5	68,7	6,9
1	51,5	5,2
1,5	13,4	1,3
2	27,4	2,7

Tabela 87: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanoldurante a evolução da fermentação durante 2 horas com células imobilizadas emesferas de alginato de cálcio para o terceiro ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,5	11,3	1,1
1	17,3	1,7
1,5	27,9	2,8
2	23,5	2,4

A partir da **Figura 44** é possível observar que o consumo total de glicose pelas células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio ocorre rapidamente. Pode-se observar que no primeiro e no segundo ciclo, o consumo total da glicose ocorre em 2 horas, porém no terceiro ciclo a glicose não foi ainda totalmente consumida.



Figura 44: Gráfico apresentando o consumo de glicose durante 2 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio.

A partir da **Figura 45** observa-se claramente que no primeiro ciclo a produção de etanol é inferior ao segundo e terceiro ciclo, como dito anteriormente, isto se deve a uma adaptação das células ao microambiente onde estão imobilizadas e aos nutrientes disponíveis no meio de fermentação. Além disso, a multiplicação celular que ocorre durante a fermentação também contribui para o aumento da produção de etanol nos ciclos seguintes.



Figura 45: Gráfico apresentando a produção de etanol durante 2 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio.



Figura 46: Gráfico apresentando a produção de etanol obtida no final de 2horas de cada ciclo de fermentação (total de 3 ciclos), utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio.

Para o ajuste linear dos dados de fermentação de células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio foram utilizados os dados obtidos para o segundo e terceiro ciclo de fermentação e a equação 13. Não foi escolhido o primeiro ciclo, pois este pode representar uma fase de adaptação celular às novas condições de imobilização e fermentação. Os valores de m obtidos mediante o ajuste linear para o segundo e terceiro ciclo de fermentação foram 0,40 h⁻¹ e 0,35 h⁻¹, respectivamente. Os valores de manutenção são maiores que o valor típico descrito na literatura, 0,05 h⁻¹, e como dito anteriormente, possivelmente este aumento se deve ao estresse sofrido pelas células no processo de imobilização.

4.5.2.2.4.2 Fermentação das células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana

Tabela 88: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação durante 2 horas com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o primeiro ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de glicose (g/L)	Glicose (%)
0	84,5	8,4
0,5	60,7	6,1
1	62,8	6,3
1,5	63,4	6,3
2	53,7	5,4

Tabela 89: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação durante 2 horas com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o primeiro ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,5	1,9	0,2
1	10,6	1,1
1,5	12,1	1,2
2	3,0	0,3

Tabela 90: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação durante 2 horas com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o segundo ciclo de fermentação:

tempo	Concentração de glicose	Glicose
(h)	(g/L)	(%)
0	84,5	8,4
0,5	71,3	7,1
1	68,2	6,8
1,5	64,9	6,5
2	54,2	5,4

Tabela 91: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação durante 2 horas com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o segundo ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,5	6,6	0,7
1	8,4	0,8
1,5	9,7	1,0
2	11,7	1,2

Tabela 92: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de glicose durante a evolução da fermentação durante 2 horas com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o terceiro ciclo de fermentação:

tempo	Concentração de glicose	Glicose
(h)	(g/L)	(%)
0	84,5	8,4
0,5	63,3	6,3
1	62,4	6,2
1,5	55,8	5,6
2	48,0	4,8

Tabela 93: Resultados obtidos para concentração e porcentagem de etanol durante a evolução da fermentação durante 2 horas com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o terceiro ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de etanol (g/L)	Etanol (%)
0	0	0
0,5	9,0	0,9
1	11,2	1,1
1,5	10,7	1,1
2	15,2	1,5

A **Figura 47** apresenta o consumo de glicose pelas células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana. Diferentemente do observado na **Figura 44**, após 2 horas de fermentação, a glicose não foi totalmente consumida. Isto está de acordo com o esperado devido ao recobrimento das esferas com quitosana, a qual confere resistência à passagem do substrato até as células.



Figura 47: Gráfico apresentando o consumo de glicose durante 2 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.

A partir da **Figura 48** observa-se que o perfil de produção de etanol no primeiro, segundo e terceiro ciclo é semelhante. O decaimento da produção de etanol no primeiro ciclo provavelmente se deve a um erro na preparação da amostra para injeção em HPLC e não a uma real diminuição da produção de etanol.

Comparando esta figura com a **Figura 45**, observa-se que a produção de etanol para as esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana é mais lento, pois a média final de produção de etanol para as esferas de alginato de cálcio e para as esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana é 3,3% (33 g/L) e 3,1% (31 g/L), respectivamente, ou seja, a produção final é muito semelhante, no entanto até 2 horas de fermentação, as células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio produziram em média 1,98% (19,8 g/L) de etanol, enquanto que as células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana produziram em média 0,99% (9,9 g/L) de etanol.



Figura 48: Gráfico apresentando a produção de etanol durante 2 horas de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.



Figura 49: Gráfico apresentando a produção de etanol obtida no final de 2 horas de cada ciclo de fermentação (total de 3 ciclos), utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.

Para o ajuste linear dos dados de fermentação de células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana foram utilizados os dados obtidos para o segundo e terceiro ciclo de fermentação e a equação 13.

Os valores de m obtidos mediante o ajuste linear para o segundo e terceiro ciclo de fermentação foram 0,14 h⁻¹ e 0,16 h⁻¹, respectivamente. Os valores de manutenção aqui são menores que os obtidos anteriormente, porém ainda são aproximadamente 3 vezes maior que o valor típico descrito na literatura, 0,05 h⁻¹, possivelmente as células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana utilizando a glicose como fonte de carbono sofreram menor estresse com a imobilização e por isso o valor de manutenção celular foi menor do que os obtidos nos outros estudos de fermentação.

4.6 Análises em Espectrofotômetro

4.6.1 Construção da curva de calibração de S. cerevisiae

A **Tabela 94** apresenta os valores de absorbância obtidos para diferentes concentrações de suspensões de *S. cerevisiae*, cepa JAY 270, usados para a construção da curva de calibração.

Tabela 94: Valores de absorbância obtidos para diferentes concentrações de suspensões de *S. cerevisiae*.

Concentração de células (g/L)	Absorbância (nm)
0,47	0,92336
0,35	0,71196
0,23	0,48081
0,12	0,25011
0,06	0,14443
0,02	7,70E-02
0,01	5,25E-02

A partir dos valores da **Tabela 94** foi possível construir a curva de calibração absorbância versus concentração da *S. cerevisiae*.



Figura 50: Curva de calibração obtida para a *S. cerevisiae*.

A equação de reta obtida a partir desta curva e que foi utilizada nos cálculos de concentração de *S. cerevisiae* nas fermentações é a equação:

$$y = 1,911x + 0,0332$$
 (Equação 14)

4.6.2 Análise das amostras das fermentações

4.6.2.1 Análise das fermentações para células livres

4.6.2.1.1 Fermentação das células livres utilizando a glicose como fonte de carbono

Utilizando a equação 14, foi possível calcular a concentração celular das amostras coletadas ao longo da fermentação.

Tempo	Concentração de células
(h)	(g/L)
0	36,44
0,5	36,22
1	26,19
1,5	38,99
2	43,00
4	45,16
6	53,52
8	52,00
10	53,90

Tabela 95: Valores de concentração celular para as amostras coletadas aolongo da fermentação.

A partir dos valores da **Tabela 95** foi possível construir o gráfico de concentração celular versus tempo.

Analisando a **Figura 51**, é possível observar o crescimento celular ao longo das 10 horas de fermentação utilizando a glicose como fonte de carbono. Ao longo deste período o crescimento celular foi de 48,5% (17,6 g/L).



Figura 51: Curva de crescimento celular para células livres. Fonte de carbono:

glicose.

4.6.2.1.2 Fermentação das células livres utilizando a sacarose como fonte de carbono

Utilizando a equação 14, foi possível calcular a concentração celular das amostras coletadas ao longo da fermentação.

Tabela 96: Valores de concentração celular para as amostras coletadas aolongo da fermentação.

Tempo	Concentração de células
(h)	(g/L)
0	34,84
0,5	34,84
1	41,47
1,5	45,16
2	45,07
4	44,25
6	49,14
8	46,82
10	50,56

A partir dos valores da **Tabela 96** foi possível construir o gráfico de concentração celular versus tempo.

Analisando a **Figura 52**, é possível observar o crescimento celular ao longo das 10 horas de fermentação utilizando a sacarose como fonte de carbono. Ao longo deste período o crescimento celular foi de 44,7% (15,6 g/L), 3,8% menor do que o crescimento das células livres utilizando a glicose como fonte de carbono.



Figura 52: Curva de crescimento celular para células livres. Fonte de carbono:

sacarose.

4.6.2.2 Análise das fermentações para células imobilizadas

4.6.2.2.1 Fermentação das células imobilizadas utilizando a glicose como fonte de carbono durante oito ciclos de fermentação de 10 horas cada

4.6.2.2.1.1 Fermentação das células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio

Tabela 97: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o primeiro ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de células (g/L)
0	0
2	0
4	0,02
6	0,004
8	0,01
10	0,02

Tabela 98: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o segundo ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de células (g/L)
0	0
13	0,15

Tabela 99: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o terceiro ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de células (g/L)
0	0
2	0.05
- 4	0.15
6	0 19
8	0.20
10	0.13

Tabela 100: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o quarto ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de células (g/L)
0	0
14	0,21

Tabela 101: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o quinto ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de células (g/L)
0	0,03
2	0,11
4	0,13
6	0,16
8	0,32
10	0,34

Tabela 102: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o sexto ciclo de fermentação:

tempo	Concentração de células
(h)	(g/L)
0	0,02
14	0,37

Tabela 103: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o sétimo ciclo de fermentação:

tempo	Concentração de células
(h)	(g/L)
0	0,07
9	0,11

Tabela 104: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o oitavo ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de células (g/L)
0	0,10
16	0,20

Analisando a **Figura 53**, é possível observar o crescimento celular das células livres que lixiviaram das esferas de alginato de cálcio ao longo das 10 horas de fermentação utilizando a glicose como fonte de carbono. Ao longo deste período o crescimento celular médio foi de 0,163 g/L.



Figura 53: Curvas de crescimento celular para as células livres que lixiviaram das esferas de alginato de cálcio.

4.6.2.2.1.2 Fermentação das células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana

Tabela 105: Valores de concentração celular para as amostras coletadasdurante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato decálcio revestidas com quitosana para o primeiro ciclo de fermentação:

tempo	Concentração de células
(h)	(g/L)
0	0
2	0
4	0
6	0
8	0
10	0

Tabela 106: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o segundo ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de células (g/L)
0	0
13	0,06

Tabela 107: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o terceiro ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentação de células (g/L)
0	0
2	0,03
4	0,11
6	0,19
8	0,22
10	0,09

Tabela 108: Valores de concentração celular para as amostras coletadasdurante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato decálcio revestidas com quitosana para o quarto ciclo de fermentação:

tempo	Concentração de células
(h)	(g/L)
0	0
14	0,15

Tabela 109: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o quinto ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de células (g/L)
	0.01
U	0,01
2	0,02
4	0,04
6	0,07
8	0,08
10	0,11

Tabela 110: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o sexto ciclo de fermentação:

tempo	Concentração de células
(h)	(g/L)
0	0,03
14	0,14

Tabela 111: Valores de concentração celular para as amostras coletadasdurante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato decálcio revestidas com quitosana para o sétimo ciclo de fermentação:

tempo	Concentração de células
<u>(h)</u>	(g/L)
0	0,08
9	0,12

Tabela 112: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o oitavo ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de células (g/L)
0	0,16
16	0,03

Analisando a **Figura 54**, é possível observar o crescimento celular das células livres que lixiviaram das esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana ao longo das 10 horas de fermentação utilizando a glicose como fonte de carbono. Ao longo deste período o crescimento celular livre médio foi de 0,053 g/L. Este crescimento celular livre foi inferior ao encontrado quando a fermentação foi realizada com imobilização em esferas de alginato de cálcio. Este resultado era esperado uma vez que a quitosana confere resistência à entrada e saída de substância da esfera de alginato de cálcio. Com a diminuição dos poros do alginato de cálcio na esfera e com a barreira física, ambos proporcionados pela quitosana, houve menor desprendimento celular e, portanto, menor crescimento celular em meio líquido para os experimentos de fermentação utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.



Figura 54: Curvas de crescimento celular para células imobilizadas em esferas

de alginato de cálcio revestidas com quitosana.

4.6.2.2.2 Fermentação das células imobilizadas utilizando a sacarose como fonte de carbono durante oito ciclos de fermentação de 10 horas cada

4.6.2.2.2.1 Fermentação das células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio

Tabela 113: Valores de concentração celular para as amostras coletadasdurante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato decálcio para o primeiro ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de células (g/L)
0	0
2	0
6	0
8	0
10	0

Tabela 114: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o segundo ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de células (g/L)
0	0,002
13	0,23

Tabela 115: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o terceiro ciclo de fermentação:

tempo	Concentração de células
(h)	(g/L)
0	0,007
2	0,10
4	0,18
8	0,29
10	0,37

Tabela 116: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o quarto ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de células
0	0,02
14	0,32

Tabela 117: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o quinto ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de células (g/L)
0	0
4	0,19
6	0,20
8	0,30
10	0,17

Tabela 118: Valores de concentração celular para as amostras coletadasdurante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato decálcio para o sexto ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de células (g/L)
0	0
13	1,26

Tabela 119: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o sétimo ciclo de fermentação:

tempo	Concentração de células				
(h)	(g/L)				
0	0,01				
9	0,39				

Tabela 120: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio para o oitavo ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de células (g/L)				
0	0,03				
15	0,49				

Analisando a **Figura 55**, é possível observar o crescimento celular livre das células que lixiviaram das esferas de alginato de cálcio ao longo das 10 horas de fermentação utilizando a sacarose como fonte de carbono. Ao longo deste período o crescimento celular livre médio foi de 0,391 g/L.



Figura 55: Curvas de crescimento celular para células imobilizadas em esferas

de alginato de cálcio.

4.6.2.2.2.2 Fermentação das células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana

Tabela 121: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o primeiro ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de células (g/L)
0	0
2	0
6	0
8	0
10	0

Tabela 122: Valores de concentração celular para as amostras coletadasdurante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato decálcio revestidas com quitosana para o segundo ciclo de fermentação:

(h)	concentração de celulas (g/L)
0	0
13	0,03

Tabela 123: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o terceiro ciclo de fermentação:

tempo	Concentração celular		
(h)	(g/L)		
0	0		
2	0		
4	0,02		
8	0,04		
10	0,05		

Tabela 124: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o quarto ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de células (g/L)
0	0
14	0,29

Tabela 125: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o quinto ciclo de fermentação:

tempo	Concentração de células			
(h)	(g/L)			
0	0			
4	0,14			
6	0,14			
8	0,19			
10	0,16			

Tabela 126: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o sexto ciclo de fermentação:

tempo	Concentração de células				
(h)	(g/L)				
0	0,01				
13	0,84				

Tabela 127: Valores de concentração celular para as amostras coletadas durante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana para o sétimo ciclo de fermentação:

tempo (h)	Concentração de células (g/L)
0	0,04
9	0,17
	0,11

Tabela 128: Valores de concentração celular para as amostras coletadasdurante a evolução da fermentação com células imobilizadas em esferas de alginato decálcio revestidas com quitosana para o oitavo ciclo de fermentação:

tempo	Concentração de células				
(h)	(g/L)				
0	0,06				
15	0,57				
0 15	0,06 0,57				

Analisando a **Figura 56**, é possível observar o crescimento celular das células livres que lixiviaram das esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana ao longo das 10 horas de fermentação utilizando a sacarose como fonte de carbono. Ao longo deste período o crescimento celular livre médio foi de 0,249 g/L. Assim como ocorreu para os experimentos que utilizaram a glicose como fonte de carbono, o crescimento celular livre foi inferior ao encontrado para as células livres quando a fermentação foi realizada com imobilização em esferas de alginato de cálcio. Como dito anteriormente a quitosana oferece resistência à passagem de substâncias, portanto, diminui também a lixiviação celular. No entanto, comparando o crescimento celular em meio líquido para as fermentações utilizando a glicose e a sacarose como fontes de carbono, observa-se que tanto para as fermentações utilizando esferas de alginato de cálcio como para as fermentações utilizando esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana, o crescimento celular foi maior quando a sacarose foi utilizada como fonte de carbono.



Figura 56: Curvas de crescimento celular para células imobilizadas em esferas

de alginato de cálcio revestidas com quitosana.

A **Tabela 129** mostra comparativamente os resultados das fermentações para células livres e células imobilizadas utilizando a glicose e a sacarose como fontes de carbono.

Tabela 129: Dados de produção de etanol, rendimento e crescimento celular livre para os estudos de fermentação com células livres e células imobilizadas utilizando a glicose e a sacarose como fontes de carbono.

	Células livres		Células ir	nobilizadas	Células im	obilizadas
			EAC		EACRQ	
	glicose	sacarose	glicose	sacarose	glicose	sacarose
Produção de	40	40	33	33	31	32
etanol (g/L)	-	-			-	-
Rendimento	78	74,3	64,6	61,3	60,7	59,5
(%)			,	,	,	,
Crescimento celular (g/L)*	17,6	15,6	0,163	0,391	0,053	0,249

Legenda:

EAC: Esferas de alginato de cálcio

EACRQ: Esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana

(*): Crescimento celular em meio líquido – células livres ou lixiviadas das esferas.

Através da análise da **Tabela 129** vemos que a produção de etanol e o rendimento são maiores para as células livres quando comparados a produção de etanol e rendimento (valores médios calculados para os oito ciclos de fermentação) para as células imobilizadas, utilizando a glicose ou a sacarose como fontes de carbono. Ao compararmos os valores de crescimento celular em meio líquido para os

experimentos utilizando células imobilizadas, ou seja, as células que lixiviaram das esferas e se multiplicaram no meio líquido, vemos que para os experimentos realizados com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana o crescimento celular foi menor do que aquele obtido para os experimentos realizados com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio. Isso se deve ao recobrimento com quitosana, que além de conferir resistência mecânica as esferas, também diminuiu a lixiviação celular.

5. Considerações finais

As fermentações foram todas realizadas por um período de 10 horas, pois como os ciclos foram realizados um em sequência do outro, e as análises em HPLC apenas ao final de todos os ciclos, não foi possível determinar se cada ciclo de fermentação estava sendo concluído mas rapidamente ou mais vagarosamente que o ciclo anterior. É possível que se o tempo de cada ciclo de fermentação fosse reduzido para aproximadamente 6 horas, com exceção do primeiro ciclo, pois este é mais longo, seria possível aumentar o número de ciclos de fermentação. As esferas sofreram agitação mecânica desnecessária após o consumo total de substrato e produção máxima de etanol, além disso, as células ficaram longos períodos em um meio de fermentação pobre em nutrientes. Por outro lado, mesmo após o substrato ser totalmente consumido do meio líquido, ele ainda pode estar presente no interior das esferas se difundindo até as células, da mesma forma o etanol produzido pode estar se difundido para sair das esferas, então se ao longo dos ciclos de fermentação esse processo fosse ficando cada vez mais lento, ciclos de fermentação com duração superior ao tempo de consumo de substrato livre no meio também permitiriam esta análise. No entanto, o que se observou foi que ao longo dos ciclos, o consumo de substrato e produção de etanol aconteceu mais rapidamente ciclo após o primeiro ciclo de fermentação, sugerindo um processo de adaptação celular às condições de imobilização, microambiente e fermentação. Após o consumo total de substrato livre no meio líquido, o aumento da concentração de etanol foi observada, indicando a presença de um processo difusivo ocorrendo no interior das esferas.

A produção máxima de etanol observada para as células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio e em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana utilizando a glicose como fonte de carbono, foi atingida em aproximadamente 4 e 6 horas, respectivamente, de acordo com as Figuras 28 e 32 para o terceiro e o quinto ciclo de fermentação. Analisando as Figuras 53 e 54, observa-se que a concentração celular das células que lixiviaram das esferas e se multiplicaram livres no meio de fermentação é desprezível. Quando a produção máxima de etanol é atingida, ou seja, em aproximadamente 4 horas, para imobilização em esferas de alginato de cálcio, a Figura 53 mostra que para o terceiro ciclo, a concentração celular é de 0,15 g/L e para o quinto ciclo a concentração celular é de 0,13 g/L. E para a imobilização em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana, quando a produção máxima de etanol é atingida, ou seja, em aproximadamente 6 horas, a **Figura 54** mostra que para o terceiro ciclo, a concentração celular é de 0,19 g/L e para o quinto ciclo a concentração celular é de 0,07 g/L.

Utilizando a sacarose como fonte de carbono, a produção máxima de etanol para as células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio e em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana, foi atingida em aproximadamente 2 e 4 horas, respectivamente, de acordo com as Figuras 36 e 40 para o terceiro e quinto ciclo de fermentação. Analisando as **Figuras 55** e **56**, observa-se que a concentração celular das células que lixiviaram das esferas e se multiplicaram livres no meio de fermentação, assim como no caso anterior é desprezível. Para imobilização em esferas de alginato de cálcio, quando a produção máxima de etanol é atingida, ou seja, em aproximadamente 2 horas, a Figura 55 mostra que para o terceiro ciclo, a concentração celular é de 0,10 g/L e para o quinto ciclo a concentração celular é inferior a de 0,19 g/L. E para imobilização em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana, quando a produção máxima de etanol é atingida, ou seja, em aproximadamente 4 horas, a Figura 56 mostra que para o terceiro ciclo, a concentração celular é de 0,02 g/L e para o quinto ciclo a concentração celular é de 0,14 g/L.

A partir destes resultados pode-se dizer que a produção de etanol é devida às células imobilizadas nas esferas e não às esferas livres no meio, pois sua concentração é desprezível quando comparada a concentração celular total no interior das esferas que é de aproximadamente 60 g/L.

A literatura apresenta a imobilização da enzima álcool desidrogenase em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana. No trabalho de Zhou, Li & Li (2010), a enzima álcool desidrogenase de *S. cerevisiae* foi imobilizada em esferas contendo 3,0% de alginato de sódio, 0,5% de quitosana, 2,0% de CaCl₂, 0,5% de

glutaraldeído e curaram durante 6 horas. A cura das esferas apresentada neste trabalho de dissertação de mestrado foi realizada por 1 hora em solução de CaCl₂ e depois por 30 minutos em solução ácida de quitosana O trabalho de de Zhou, Li & Li (2010) relata algumas vantagens desta imobilização como a maior estabilidade térmica e operacional, porém não é relatado se as esferas foram reutilizadas ou se houve ciclos sucessivos, o estudo concentra-se na investigação do tempo de imobilização, na concentração de quitosana, alginato de sódio, CaCl₂ e glutaraldeído. Comparando o trabalho de Zhou, Li & Li (2010) com o estudo apresentado nesta dissertação de mestrado, o glutaraldeído, que confere enrijecimento às esferas de alginato de cálcio, não foi utilizado por ser tóxico para as células de S. cerevisiae. Zhou, Li & Li (2010) trabalharam com a enzima isolada, por isso não tiveram este problema. Outra importante diferença é que no trabalho de Zhou, Li & Li (2010) a solução ácida de quitosana foi adicionada à solução de CaCl₂ enquanto que nesta dissertação de mestrado, o revestimento com quitosana foi feito em uma segunda etapa após a cura em solução de CaCl₂.

No trabalho de Najafpour, Younesi & Ismail (2004) a cepa ATCC 24860 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) de *S. cerevisiae* foi imobilizada em esferas de alginato de cálcio para o estudo da fermentação de glicose para produção de etanol. Neste trabalho a fermentação foi conduzida em regime contínuo através de uma coluna tubular empacotada com células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio, enquanto que neste trabalho de dissertação de mestrado o regime de fermentação utilizado foi em batelada por um período de aproximadamente 10 horas cada ciclo. Najafpour, Younesi & Ismail (2004) relatam que o consumo de 176
glicose e a produção de etanol foram de 88,2% e 16,7% v/v, respectivamente, para o tempo de retenção de 6 horas. Para a concentração de 150 g/L de glicose, foi obtida uma produção de 47 g/L de etanol para o tempo de retenção de 7 horas. Para esta concentração de glicose, o rendimento foi de 38%. Para o estudo de fermentação apresentado nesta dissertação de mestrado, utilizando células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio, com uma concentração inicial de 100 g/L de glicose, foi possível obter uma produção de etanol de 33 g/L e rendimento de 64,6%. No trabalho de Najafpour, Younesi & Ismail (2004) as esferas foram preparadas a partir de uma cultura celular crescida por 16 horas e misturada com alginato de sódio 2%, esta mistura foi gotejada em uma solução de CaCl₂ 6%. As esferas de alginato de cálcio empacotadas em reator tubular foram usadas por 10 dias. O volume de esferas utilizado foi de 740 mL. Para o trabalho descrito nesta dissertação de mestrado, a cultura celular foi crescida por 24 horas e a solução de CaCl₂ utilizada foi de 2%. A concentração de solução de CaCl₂ maior pode conferir maior resistência mecânica às esferas através do aumento das ligações cruzadas entre as cadeias de alginato e o cálcio. O tempo de uso das esferas foi de oito ciclos de fermentação, sendo aproximadamente de 96 horas no total e o volume utilizado foi de aproximadamente 100 mL.

Birol *et al.* (1998), descrevem a fermentação utilizando células de *S. cerevisiae*, cepa ATCC 9763, imobilizadas em esferas de alginato de cálcio. Neste trabalho a fermentação foi conduzida em batelada durante 17 horas em frascos de 1 L contendo 500 mL de meio nutriente com 50-60 cm³ de esferas (para o volume total do frasco) a 30°C e 70 rpm em shaker orbital. Comparando o estudo desta dissertação de mestrado com o apresentado por Birol et al. (1998) vemos que as condições de fermentação são bastante diferentes, o tempo de fermentação para o regime batelada é superior, 17 horas contra 10 horas, a velocidade de agitação utilizada foi muito menor, Birol et al. (1998) utilizaram apenas 70 rpm contra 200 rpm, a menor agitação pode ter causado menor atrito mecânico entre as esferas e pode ter oferecido um processo fermentativo mais lento, justificando o perído de 17 horas. O volume de meio nutriente foi maior e o volume das esferas utilizado foi menor em comparação com o trabalho apresentado nesta dissertação de mestrado. As esferas foram preparadas utilizando uma pré-cultura celular de 20 mL, crescida durante 16 horas a 30°C, centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos e resuspendidas em NaCl 0,1% e misturadas com alginato de sódio para obtenção de uma mistura de 150 mL contendo 2 % de alginato de sódio. A concentração de CaCl₂ foi de 2% e tempo de cura das esferas de 20 minutos, menor que o tempo de cura de 1 hora estudado nesta dissertação. Dentre as concentrações de glicose estudadas, para a concentração de 100 g/L, a produção de etanol apresentou a maior concentração, 41 g/L, enquanto que a produção de etanol média para os 8 ciclos de fermentação utilizando 100 g/L de glicose e esferas de alginato de cálcio apresentadas nesta dissertação foi de 33 g/L.

Roca *et al.* (1996) apresentam em seu trabalho a imobilização de células de *S. cerevisiae*, cepa κ -λ 3 (Department of Microbiology, University of Santiago de Compostela), imobilizadas em esferas de alginato de cálcio enrijecidas com íon trivalente (Al³⁺). As esferas foram preparadas misturando uma suspensão celular de 10 g/L (peso seco) com uma solução de alginato de sódio para uma concentração final 2%. Essa mistura foi gotejada em uma solução de CaCl₂ 2% e curada por 30 minutos e

então lavadas com uma solução de NaCl 9 g/L. No trabalho apresentado nesta dissertação de mestrado, as esferas curaram por 1 hora em solução de CaCl₂ 2% e foram lavadas com porções de água destilada. Essas esferas foram tratadas com Al³⁺ (Al(NO₃)₃). A fermentação foi conduzida em repetidas bateladas utilizando erlenmeyer de 250 mL, 100 mL de meio de fermentação com 12,5 g de esferas, agitadas em shaker orbital a 150 rpm e 30°C, enquanto que no trabalho apresentado nesta dissertação o volume de meio de fermentação foi de 200 mL e aproximadamente 100 g de esferas, agitadas em shker orbital a 200 rpm e também 30 °C. O experimento foi parado quando pelo menos 90% do substrato foi consumido e as esferas foram lavadas com NaCl 9 g/L e o experimento de batelada foi repetido com um novo meio de fermentação. Foram realizados 5 ou 6 experimentos de batelada desta forma, ou seja, foi obtida menor reutilização das esferas do que o total de 8 experimentos conseguido nesta dissertação de mestrado. O tratamento com Al3+ diminuiu a lixiviação celular. Quando comparado com as esferas sem tratamento com Al³⁺, a lixiviação celular é 2,5 vezes menor que para as esferas tratadas por longo período com Al³⁺. O tratamento com Al³⁺ proporcionou um comportamento semelhante ao oferecido pela quitosana nos estudos de imobilização em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana, ou seja, o enrijecimento com Al³⁺, além de oferecer maior resistência mecânica às esferas de alginato de cálcio, assim como a quitosana, diminuiu a lixiviação celular.

6. Conclusões e sugestões para próximos trabalhos

A imobilização das células de *S. cerevisiae* em esferas de alginato de cálcio e em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana mostrou-se uma alternativa interessante para a produção de etanol. A imobilização permitiu o reuso das esferas durante 8 ciclos de fermentação. Esta é uma vantagem importante, pois além de se utilizar as mesmas esferas, permite uma fácil separação do meio líquido.

A produção final de etanol ao final de cada ciclo foi bastante semelhante, mostrando que mesmo após 8 ciclos de fermentação, as células têm capacidade de produzir etanol com alto rendimento. Isto foi observado tanto para as células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio como para as células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana.

Durante os ciclos de fermentação não foi adicionado antibiótico ao meio de fermentação e não foi observada nenhuma contaminação por fungos ou bactérias ao longo dos ciclos, mostrando que os cuidados de assepsia foram realizados adequadamente.

As células livres produziram 40 g/L de etanol utilizando a glicose ou a sacarose como fonte de carbono. O rendimento da reação foi de 78% e 74,3% utilizando a glicose e a sacarose, respectivamente.

As células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio produziram em média para cada ciclo de fermentação 33 g/L utilizando a glicose ou a sacarose. O rendimento médio da reação utilizando a glicose como fonte de carbono foi de 64,6% e de 61,3% utilizando a sacarose como fonte de carbono. As células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana produziram em média para cada ciclo de fermentação 31 g/L e 32 g/L, utilizando glicose e sacarose, respectivamente. O rendimento médio da reação utilizando a glicose como fonte de carbono foi de 60,7% e de 59,5% utilizando a sacarose como fonte de carbono.

O crescimento celular para células livres foi de 17,6 g/L e 15,6 g/L utilizando glicose e sacarose, respectivamente. Para as células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio, o crescimento celular médio em meio líquido foi de 0,163 g/L e 0,391 g/L utilizando a glicose e sacarose, respectivamente. Para as células imobilizadas em esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana, o crescimento celular médio em meio líquido a glicose e sacarose, respectivamente.

As esferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana apresentaram-se menos frágeis e romperam em menor quantidade que as esferas de alginato de cálcio, além disso, a quitosana exerceu uma barreira física à passagem de substâncias e por este motivo, o consumo de substrato e produção de produto foi mais lento para estas esferas, assim como a lixiviação celular para o meio líquido foi menor.

Seria interessante verificar se é possível o aumento do número de ciclos de fermentação com as mesmas esferas estudando alguns parâmetros como a diminuição do tempo de fermentação, pois os resultados mostraram que com aproximadamente 6 horas de fermentação a produção de etanol é máxima e após o primeiro ciclo de fermentação, a glicose ou sacarose é totalmente consumida após 2-4 horas de fermentação para as células imobilizadas. Outro parâmetro para ser estudado seria a concentração e o tempo de cura da quitosana como revestimento para as esferas de alginato de cálcio. Um aumento na concentração e/ou no tempo de cura da quitosana poderia conferir maior resistência mecânica às esferas, porém, por outro lado poderia dificultar a entrada de substratos e saída de produtos da esfera tornando o processo mais lento e inviável, portanto um estudo de otimização da concentração e tempo de cura da quitosana seriam interessantes. Além destes, poderia ser estudada a velocidade de agitação em shaker orbital, a diminuição da velocidade de agitação diminuiria o atrito mecânico entre as esferas, portanto, elas poderiam permanecer íntegras por mais tempo, por outro lado, a diminuição da velocidade de agitação poderia dificultar a chegada de substratos até as esferas de modo que o processo fermentativo poderia se tornar mais longo e o acúmulo de produtos nas proximidades da esfera poderia não ser interessante, pois no caso do etanol, ele passa a ser tóxico para as células quando em altas concentrações (BAI, ANDERSON & MOO-YOUNG, 2008). Outra forma de minimizar o atrito mecânico seria utilizar o borbulhamento de gás para promover a agitação adequada ao meio de fermentação ao invés de se utilizar impelidores.

De modo a minimizar os efeitos negativos do atrito mecânico proporcionado pela agitação em shaker orbital, o estudo da fermentação em reator de leito contínuo seria uma opção interessante, pois nele seria passado um fluxo de meio rico em nutrientes, a uma vazão estabelecida e constante, de forma que o atrito mecânico poderia ser diminuído. O tempo de uso das esferas para este tipo de reator teria que ser avaliado assim como o empacotamento das esferas. Não foi possível a imobilização de células de *S. cerevisiae* em óxido de zircônio e em montmorilonita K 10. Os experimentos que avaliaram a absorbância dos sistemas óxido de zircônio + células de *S. cerevisiae* e montmorilonita K 10 + células de *S. cerevisiae* ao longo do tempo, mostraram que não houve a imobilização das células nestes materiais, pois não foi observada a diminuição da absorbância nestes sistemas, o que permite dizer que não ocorreu imobilização celular.

Foi estudada a modificação do potencial zeta (ζ) negativo, -23,3 mV, da superfície do óxido de zircônio, pois a *S. cerevisiae* também apresenta potencial zeta (ζ) negativo, que pode variar de -17,5 mV a -16,1 mV (BOWEN, LOVITT & WRIGHT, 2001). Com a modificação do potencial zeta (ζ) da superfície do óxido de zircônio, obteve-se um potencial zeta (ζ) positivo de 38,7 mV, no entanto os experimentos demonstraram que não houve a imobilização das células de *S. cerevisiae* em óxido de zircônio modificado, indicando que algum parâmetro apresenta maior influência que a atração eletrostática neste tipo de imobilização.

7. Referências bibliográficas

ALBARGHOUTHI, M.; FARA, D.A.; SALEEM, M.; EL-THAHER, T.; MATALKA, K. & BADWAN, A., Immobilization of antibodies on alginate-chitosan beads, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 206, p. 23–34, 2000.

ANAL, A.K. & STEVENS, W.F., Chitosan–alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 290, p. 45–54, 2005.

ANDRADE, R. R., Procedimento para o desenvolvimento de um modelo matemático robusto para o processo de fermentação alcoólica. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

AIBA, S. & SHODA, M., Reassessment of production inhibition in alcohol fermentation. *Journal of. Fermentation Technology*, v. 47, p.790-794, 1969.

ALCOOLBRÁS, 2006. Revista Alcoolbrás, n. 101. Abril, 2006.

ANDRIETTA, S.R.; STECKELBERG, C. & ANDRIETTA, M.G.S., Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. *Multiciência*, Universidade de Campinas, 2006.

ARGUESO, J.L.; CARAZZOLLE, M.F.; MIECZKOWSKI, P.A., *et al.*, Genome structure of a Saccharomyces cerevisiae strain widely used in bioethanol production, *Genome Research*, v. 19, p. 2258-2270, 2009.

ATALA, D.I.P.; COSTA, A.C.; MACIEL FILHO, R. & MAUGERI FILHO, F., Fermentação alcoólica com alta densidade celular: Modelagem cinética e convalidação de parâmetros, *Livro de resumos do XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, 2000.

BAI, F.W.; ANDERSON, W.A. & MOO-YOUNG, M., Ethanol fermentation Technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnoogy. Advances*, v. 26, p. 89–105, 2008.

BAILAR, J.C., Comprehensive Inorganic Chemistry. Elmsford, N.G. 1973.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A. & GURNY, R., Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications – a review, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, p. 19–34, 2004.

BIROL, G.; DORUKER, P.; KIRDAR, B.; ÖNSAN, Z.I. & ÜLGEN, K., Mathematical description of ethanol fermentation by immobilized Saccharomyces cerevisiae. *Process Biochemistry*, v. 33, n. 7, p. 763-771, 1998.

BONOMI, A. & SCHMIDELL, W., Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In: BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial*, v. 2, editora Edgard Blücher, São Paulo, p.123-178, 2001.

BORGES, P. C. S., Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo em batelada alimentada. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

BORZANI, W. et al., *Biotecnologia industrial – Fundamentos*. In: Borzani, W. Cinética de reações enzimáticas. São Paulo: Editora Blucher, vol. 1, cap. 7, p. 197-216, 2001.

BOWEN, W.R.; LOVITT, R.W. & WRIGHT, C.J., Atomic force microscopy study on the adhesion of *Saccharomyces cerevisiae, Journal. of Colloid and Interface Science*, v. 237, p. 54-51, 2001.

BURLESON, D.J.; ROBERTS, J.T.; GLADFELTER, W.L.; CAMPBELL, S.A. & SMITH, R.C., A Study of CVD Growth Kinetics and Film Microstructure of Zirconium Dioxide from Zirconium Tetra-tert-Butoxide, *Chemistry.of Materials*, v. 14, p. 1269-1276, 2002.

CABRAL, J.M.S., Engenharia Enzimática. Lisboa: Lidel, 2003, p.125

CAMACHO, A.P.M.; ROCHA, M.O.C.; BRAUER, J.M.E.; VERDUGO, A.Z.G.; FÉLIX, F.R.; ORTEGA, M.M.C.; GÓMEZ, M.S.Y. & JATOMEA, M.P., Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties, *Carbohydrate Polymers*, v. 82, p. 305–315, 2010.

CARVALHO, J. C. M. & SATO, S., Fermentação descontínua. In: LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica.* São Paulo, Edgard Blücher, v. 2, p. 193-199, 2001 a.

CARVALHO, J. C. M. & SATO, S., Fermentação descontínua alimentada. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo, Edgard Blücher, v.2, p. 193-204, 2001 b.

CARVALHO, J. C. M. & SATO, S., Fermentação descontínua alimentada. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo, Edgard Blücher, v.2 p. 205-222, 2001 c.

CARVALHO, P. O. et al., Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lípases microbianas, *Química Nova*, v. 28, n. 4, p. 614-621, 2005.

CONTI, R. de; RODRIGUES, J. A. R. & MORAN, P. J. S., Biocatálise: avanços recentes. *Química Nova*. V. 24, N. 5, p.672-675, 2001.

COVIELLO, T.; MATRICARDI, P.; MARIANECCI, C. & ALHAIQUE, F., Polysaccharide hydrogels for modified release formulations, a review, *Journal of Controlled Release*, v. 119, p. 5–24, 2007.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R.M. & CHIELLINI, E., Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Progress in Polymer Science*, v. 36, p. 981–1014, 2011.

DE, S. & ROBINSON, D., Polymer relationships during preparation of chitosanalginateand poly-l-lysine–alginate nanospheres, *Journal of Controlled Release*, v. 89, p. 101–112, 2003.

DORDIK, J. S. & CLARK, D.S., Biocatalysis and biotransformation. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 6, p. 123–124, 2002.

FACCIOTTI, M.C.R., In: SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo, Edgard Blücher, v.2, Edgard Blücher, São Paulo, p. 223-225, 2001.

FOGLER, H. S. Elements of chemical reaction engineering. 4. ed. Prentice Hall - NY, 2006. Cap. 7: Reaction Mechanisms, Pathways, Bioreactions, and Bioreactors, p. 427, 431–433.

FREGONESI, A., Adesão de células de Saccharomyces sp. em materiais inorgânicos para produção de etanol. 1998. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

FURTADO, T.A. & SCANDIFFIO, M.G., Álcool no Brasil – Uma longa história. *Scientific American Brazil*, n. 53, p.66-71, Outubro, 2006.

GEORGE, M. & ABRAHAM, T.E., Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review, *Journal of Controlled Release*, v. 114, p. 1–14, 2006.

GOMBOTZ, W.R. & WEE, S.F., Protein release from alginate matrices, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 31, p. 267–285, 1998.

GONG, R.; LI, C.; ZHU, S.; ZHANG, Y.; DU, Y. & JIANG, J., A novel pH-sensitive hydrogel based on dual crosslinked alginate/N-α-glutaric acid chitosan for oral delivery of protein, *Carbohydrate Polymers*, v. 85, p. 869–874, 2011.

GUIBAL, E., Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: a review, *Progress in Polymer Sci*ence, v. 30, p. 71–109, 2005.

HAN, K. & LEVENSPIEL, O., Extended Monod kinetics for substrate, product, and cell inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 32, p. 430-437, 1988.

HANAWALT, J.D.; RINN, H.W. & FREVEL, L.K., Chemical Analysis by X-Ray Diffraction – Classification and use of x-ray diffracton patterns, *Industrial and Engeneering Chemistry – Analytical Ed.*, v, 10, n. 9, p. 457-512, 1938.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI,

W., SCHMIDELL, W., *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo, Edgard Blücher, v.2, p. 93-122, 2001.

INGLEDEW, WM., Alcohol production by Saccharomyces cerevisiae: a yeast primer, in the alcohol textbook. 3rd ed. UK: Nottingham University Press; 1999.

INLOES, D.S. et al., Ethanol production by S. cerevisiae immobilized in hollow-fiber membrane bioreactors. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 46, p. 264-278, 1983.

JOEKES, I. *et al,*. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized onto chrisotyle for ethanol production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology.*, v. 73, p. 54-58, 1998.

KOURKOUTAS, Y., *et al.*, Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*. V.21, p.377-397, 2004.

LABES, J. R. & WENDHAUSEN, R., Seleção de microrganismos com ação sobre compostos carbonilados gerando alcoóis quirais, *Dynamis revista tecno-científica ISSN-1982-4866*, v. 1, n. 14, p. 73-79, jan. – mar., 2008.

LEMES, M.J.L.; FILHO, P.M.F. & PIRES, M.A.F., Influência da mineralogia dos sedimentos das bacias hidrográficas dos rios mogi-guaçu e pardo na composição química das águas de abastecimento público, *Química Nova*, v. 26, n. 1, p. 13-20, 2003

LEONARD, M.; BOISSESON, M.R. de; HUBERT, P.; DALENÇON, F. & DELLACHERIE, E., Hydrophobically modified alginate hydrogels as protein carriers with specific controlled release properties, *Journal of Controlled Release*, v. 98, p. 395–405, 2004.

LIN, Y. & TANAKA, S., Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.69, p. 627-642, 2006.

LIU, C., WANG, F. & OU-YANG, F., Ethanol fermentation in a magnetically fluidized bed reactor with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in magnetic particles. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 878-882, 2009.

McNEIL, B. & HARVEY, L.M., Fermentation - a practical approach. 1st ed. IRL PRESS at Oxford University Press, 1990.

MERCERA, P.D.L., VAN OMMEN, J.G., DOESBURG, E.B.M., BURGGRAAF, A.J. & ROSS, J.R.H., *Applied Catalysis*, v. 78, p. 79-96, 1991.

MLADENOVSKA, K.; CRUAUD, O.; RICHOMME, P.; BELAMIE, E.; RAICKI, R.S.; JULIENNE, M.C.V.; POPOVISKI, E.; BENOIT, J.P. & GORACINOVA, K., 5-ASA loaded chitosan–Caalginate microparticles: Preparation and physicochemical characterization, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 345, p. 59–69, 2007.

MONOD, J. Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes. *Hermann & Cie*. Paris, 1942.

MOSER, A. *Kinetics of batch fermentation*. In: Rehm, H. J., Reed, G. Volume Editor: Brauer, H. *Biotechnology – A comprehensive treatise in 8 volumes*. Weinheim, V. C. H. Verlagsgesellschaft, v.2, p. 243 – 283, 1985.

MURATA, Y.; TONIWA, S.; MIYAMOTO, E. & KAWASHIMA, S., Preparation of alginate gel beads containing chitosan salt and their function, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 176 p. 265–268, 1999.

NAJAFPOUR, G., YOUNESI, H. & ISMAIL, K. S. K., Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, v. 92, p. 251-260, 2004.

NASCIMENTO, M. G. *et al.,* Estudos de proteção da célula de *Saccharomyces cerevisiae* para utilização em reações de redução em meio orgânico. *Química Nova*, v. 25, n. 4, p. 567-571, 2002.

NGAH, W.S.W. & FATINATHAN, S., Adsorption of Cu(II) ions in aqueous solution using chitosan beads, chitosan–GLA beads and chitosan–alginate beads, *Chemical Engineering Journal*, v. 143, p. 62–72, 2008.

190

NIKOLIC, S. *et al.*, Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. ellipsoiseus. *Biomass and Bioenergy*, v.34, p. 1449-1456, 2010.

ORIVE, G.; PONCE, S.; HERNÁNDEZ, R.M.; GASCÓN, A.R.; IGARTUA, M. & PEDRAZ, J.L., Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates, *Biomaterials*, v.23, p. 3825 – 3831, 2002.

ÖZTOP, H. N., *et al.*, Immobilization of Saccharomyces cerevisiae on to acrylamidesodium acrylate hydrogels for production of ethyl alcohol. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, p.114-119, 2003.

ÖZTOP, H. N., *et al.*, Immobilization of Saccharomyces cerevisiae on to radiation crosslinked HEMA/AAm hydrogels for production of ethyl alcohol. *Process Biochemistry*, v. 37, p.651-657, 2002.

PACHECO, T. F., Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG.

PARK, J.K. & CHANG, H.N., Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology Advances*, v.18, p. 303-319, 2000.

PASPARAKIS, G. & BOUROPOULOS, N., Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate–chitosan beads, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 323, p. 34–42, 2006.

PURWADI, R. & TAHERZADEH, M. J., The performance of serial bioreactors in rapid continuous production of ethanol from dilute-acid hydrolyzates using immobilized cells. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 2226-2233, 2008.

PIRT, S. J., The maintenance requeriment of bacteria in growing cultures. *Proceedings of the. Royal Society, London*, v.b.163, p. 224-231, 1966.

PLESSAS, S. *et al.*, Use of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on orange peel as biocatalyst for alcoholic fermentation. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 860-865, 2007. ROCA, E.; MEINANDER, N.; NÚÑEZ, M.J.; HAHN-HÄGERDAL, B. & LEMA, J.M., Continuous fermentation by conventional and recombinant *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in Ca-alginate beads hardened with trivalent ion, In *Progress in Biotechnology* - Immobilized Cells - Basics and Applications, Proceedings of an International Symposium organized under auspices of The Working Party on Applied Biocatalysis of the European Federation of Biotechnology Noordwijkerhout, The Netherlends, November 26-29, 1995, v. 11, p. 173-180, 1996.

RODRIGUES, A.P., Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

SANTOS, P. S., "Tecnologia das argilas". Edgard Blucher Ltda., v. 2, 1975.

SCHMIDELL, W. & FACCIOTTI, M.C.R., Biorreatores e Processos Fermentativos. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo, Edgard Blücher, p. 179-192. (Biotecnologia Industrial, v.2), 2001.

SINHA, V.R.; SINGLA, A.K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; BANSAL, K. & DHAWAN, S., Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs: a review, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 274, p. 1–33, 2004.

SHU, X.Z. & ZHU, K.J., The release behavior of brilliant blue from calcium–alginate gel beads coated by chitosan: the preparation method effect, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 53, p. 193–201, 2002.

THATIPAMALA, R.; ROHANI, S. & HILL, G.A., Effects of high product and substrate inhibitions on the kinetics in biomass and product yields during ethanol batch fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, v.40, n. 2, p. 289-297, 1992.

VIEGAS, M. C., Otimização de sistema de fermentação alcoólica contínua utilizando reatores tipo torre e leveduras com características floculantes. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. 150p., 2003.

VIEIRA, M. R., Estudo da biorredução de compostos carbonílicos por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae sp.* 2006. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Regional de Blumenau - FURB, Blumenau, SC.

VOET, D., VOET, J. G. & PRATT, C. W., *"Fundamentos de bioquímica"*, Artmed Editora, Porto Alegre, 2000, p. 288-290.

Web site: http://www.microbiologybytes.com/video/Scerevisiae.html, consulta em 04 de agosto de 2011 às 14:26h.

WENDHAUSEN, R. *et al.*, Continuous fermentation of sugar cane syrup using immobilized yeast cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.91, n.1, p. 48-52, 2001.

WENDHAUSEN, R., Estudo sobre utilização de crisotila como suporte de células de *Saccharomyces cerevisiae* para uso em processo contínuo de fermentação alcoólica e

biorreduções. 1998. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

XU, T.J.; ZHAO, X.Q. & BAI, F.W., Continuos ethanol production using self-flocculating yeast in a cascade of fermentors. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, p. 634-640, 2005.

XU, Y.; ZHAN, C.; FAN, L.; WANG, L. & ZHENG, H., Preparation of dual crosslinked alginate–chitosan blend gel beads and in vitro controlled release in oral site-specific drug delivery system, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 336, p. 329–337, 2007. YANG, J.; XIE, Y. & HE, W., Research progress on chemical modification of alginate: A review, *Carbohydrate Polymers*, v. 84, p. 33–39, 2011.

YU, J. *et al.*, Immobilization of Saccharomyces cerevisiae to modified bagasse for ethanol production. *Renewable Energy*, v. 35, p.1130-1134, 2010.

ZHOU, Z.; LI, G. & LI, Y., Immobilization of Saccharomyces cerevisiae alcohol dehydrogenase on hybrid alginate-chitosan beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 47, p.21-26, 2010.