

**Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química**

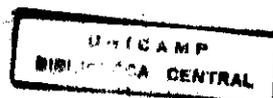
**DESENVOLVIMENTO DE LEITOS FIXOS A BASE DE
CRISOTILA PARA REATORES CONTÍNUOS**

Dissertação de Mestrado

Luis Melchert Faber Schmutzler

Orientadora: Profa. Dra. Inés Joeques

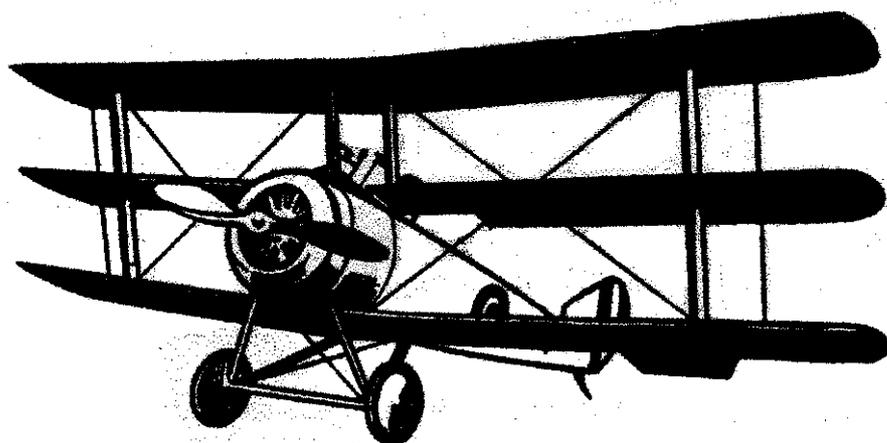
Novembro 1998



*Não fique
triste nas despedidas.
Uma despedida é necessária antes
de vocês poderem se encontrar
outra vez.*

*E se encontrar de novo,
depois de momentos ou
de vidas, é certo para
os que são
amigos.*

Richard Bach Ilusões



**Dedico esta humilde obra à memória de meu irmão,
O Piloto André Melchert Faber Schmutzler,
Que conheceu o limite do Idealismo.**

Os Primogênitos

Vamos chamá-los de Primogênitos. Embora não fossem nem remotamente humanos, eram de carne e osso e, quando fitavam as profundezas do espaço, sentiam reverência e assombro assim como solidão. Tão logo lhes foi possível, começaram a procurar companhia entre as estrelas.

Em suas explorações, depararam com a vida sob muitas formas e observaram o funcionamento da evolução em mil mundos. Viram com que frequência os primeiros e tênues lampejos de inteligência cintilavam e morriam na noite cósmica.

E como, em toda a Galáxia, não descobriram nada mais precioso do que a Mente, incentivaram seu alvorecer por toda parte. Tornaram-se lavradores nos campos de estrelas; semearam e, vez por outra, colheram.

E ocasionalmente, de um modo desapaixonado, tiveram de ceifar as ervas daninhas.

Fazia muito tempo que os grandes dinossauros haviam desaparecido, com sua promessa de futuro aniquilada por uma martelada aleatória vinda do espaço, quando a nave de inspeção penetrou no Sistema Solar, após uma viagem que já durava mil anos.

Ela passou velozmente pelos planetas externos congelados, fez uma breve pausa acima dos desertos de Marte agonizante e, por fim, olhou a Terra lá embaixo.

Estendendo-se abaixo deles, os exploradores viram um mundo fervilhante de vida.

Durante anos, estudaram, coletaram, catalogaram. Depois de aprenderem tudo o que podiam, começaram a fazer mudanças. Brincaram com o destino de muitas espécies, na terra e nos mares. Mas qual de seus experimentos daria frutos, isso eles só saberiam dentro de um milênio.

Eles eram pacientes, mas ainda não imortais. Havia muito que fazer naquele universo de um bilhão de sois e outros mundos os chamavam. Assim, partiram mais uma vez para o abismo, sabendo que nunca mais tornariam a passar por ali. Nem era preciso: os criados que eles tinham deixado se encarregariam do resto.

Na Terra, as glaciações vieram e se foram, enquanto, pairando acima delas, a Lua imutável continuava a guardar seu segredo vindo das estrelas. Num ritmo ainda mais lento que o do gelo polar, as marés de civilização subiram e fluíram por toda a Galáxia. Impérios estranhos, belos e terríveis tiveram sua ascensão e queda e transmitiram seu saber a seus sucessores.

E agora, lá em meio às estrelas, a evolução rumava para novas conquistas. Fazia muito que os primeiros exploradores da Terra haviam atingido os limites da carne e osso; tão logo suas máquinas ficaram melhores do que seus corpos, chegou a hora de mudar. Primeiro transferiram seus cérebros, e depois apenas seus pensamentos, para novas e reluzentes moradias de metal e pedras preciosas. Nestas percorreram a Galáxia. Já não construíam naves espaciais. Eles eram as naves espaciais.

Mas a era das Entidades Mecânicas passou depressa. Em sua experimentação incessante, eles haviam aprendido a armazenar conhecimentos na estrutura do próprio espaço e a preservar suas idéias por toda a eternidade em arranjos de luz congelados.

Em pura energia, portanto, acabaram se transformando, e em milhares de mundos, as conchas vazias que eles haviam descartado contorceram-se por algum tempo, numa negligente dança da morte, até se desfazerem em pó.

Agora, eles eram os Senhores da Galáxia e podiam vaguear à vontade por entre as estrelas, ou mergulhar qual bruma sutil pelos próprios interstícios do espaço. Embora estivessem finalmente livres da tirania da matéria, não haviam esquecido por completo suas origens no limo tépido de um mar desaparecido. E seus instrumentos maravilhosos ainda continuavam a funcionar, vigiando os experimentos iniciados tantas eras antes.

Mas estes já nem sempre obedeciam às ordens de seus criadores, como todas as coisas materiais, não eram imunes à corrupção do Tempo e de sua serva paciente e insone, a Entropia. E, vez por outra, descobriam e iam em busca de seus próprios objetivos.

Arthur C. Clarke

AGRADECIMENTOS

- À *Inés*, pela sua paciência,
- *In memorium* a minha avó Irene, que me cedeu por 11 anos sua garagem para que lá eu pudesse ter minha oficina – laboratório,
- À minha avó Leticia pelo apoio que sempre me deu,
- À Ercília pelo apoio e honestidade sempre que foi preciso,
- Ao pessoal técnico do Instituto pelo apoio, em especial a Joice, a Claudia, ao pessoal das oficinas de manutenção, mecânica, e vidraria, em especial ao Sr. Valtão, sempre contribuindo com o bom humor,
- Ao Prof. Célio Pasquini pelo empurrão na parte de interfaceamento,
- Aos colegas e amigos do grupo que colaboraram,
- Ao amigo Osvaldinho,
- Ao Cnpq pelo apoio financeiro,
- Ao Sr Waldemar Marinheiro pelo apoio dado com peças em inox,
- Ao IQ-UNICAMP pela oportunidade,
- Aos amigos, Euler, Silvio Puga, Ariovaldo dos Santos, Celso Arruda, ao Promotor e Deputado Carlos Sampaio, e ao Dr Silvio Saidenberg ; pelo apoio na hora difícil,
- Aos meus Pais,
- E a Laura, que vem tornando meus dias mais alegres.

DESENVOLVIMENTO DE LEITOS FIXOS A BASE DE CRISOTILA PARA REATORES CONTÍNUOS

Autor: Luís Melchert Faber Schmutzler

Orientadora: Profa. Dra. Inés Joekes

Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas

CEP 13083-970, C.P. 6154, Campinas S.P.

RESUMO

Neste trabalho foram obtidos leitos fixos de crisotila ativada, com a adição do inerte fibra de vidro. O efeito da adição em relação a fluxos aquosos e gasosos foi estudado; bons resultados foram alcançados em relação à estabilidade mecânica, à perda de carga e à retenção de CO₂.

Foi investigada a capacidade de oxidação do óxido de manganês e do óxido de titânio imobilizados em crisotila ativada, em leito fixo com fibra de vidro em reatores contínuos em fase gasosa. Foram usados metanol, etanol, *n*-propanol, *i*-propanol, *n*-butanol, e 2-butanol. Não foi observado o aparecimento de produto. Verificamos que os leitos se mantiveram geometricamente intactos. Fatores de Fanning diferentes para cada álcool foram obtidos.

Foi construído um sistema computadorizado de coleta de dados térmicos, com 12 sensores dentro do leito, um na entrada, um na saída, e um no banho termostático. Foi feita uma série experimentos para determinação da qualidade dos dados térmicos obtidos pelo sistema computadorizado.

Em experimentos de fermentação de sacarose, foram produzidos dois núcleos para leitos fixos de crisotila (a 5 e 10%) e fibra de vidro (95 e 90%), aos que foram aderidos 14,7 e 32,8 g (base úmida) de células de fermento de pão. Ambos foram monitorados pelo sistema computadorizado. O volume de vazios dentro do reator foi de 120 mL., Foram variadas a vazão de alimentação, a concentração de sacarose, e a temperatura, sendo que a máxima produtividade alcançada foi 12,3 g.L⁻¹.h⁻¹, tendo como base de cálculo o volume total de 538 mL. O ensaio de eficácia volumétrica demonstrou que uma parte grande do reator não estava participando da reação.

Mesmo com os problemas de dispersão axial e canais preferenciais, a adição de fibra de vidro a crisotila ativada em reatores de fermentação contínua demonstrou reduzir drasticamente a perda de carga ao longo do leito, formar arranjos estáveis sem desprendimento de fibras, facilitar a exposição das células ao fluxo, e retenção muito baixa do CO₂ produzido. O sistema eletrônico de aquisição de dados permitiu que se observasse em tempo real e gravasse, importantes detalhes do comportamento térmico interno do leito, assim como a heterogeneidade da reação no volume do reator.

DEVELOPMENT OF PACKED-BEDS FOR CONTINUOUS REACTORS WITH CHRYSOTILE

By: Luis Melchert Faber Schmutzler

Advisor: Prof. Inés Joeques

Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas

CEP 13083-970, C.P. 6154, Campinas S.P., Brazil

ABSTRACT

The addition of fiber glass, admixed with activated chrysotile improves the structural properties of packed-beds, resulting in highly stable bases for use as continuous reactor nucleus.

The oxidizing capacity of MnO_2 and TiO_2 immobilized onto chrysotile in continuous reactors stabilized with fiber glass was investigated. Methanol, ethanol, n-propanol, i-propanol, n-butanol, 2-butanol, were tested. No oxidation was detected. However, the fixed bed remained intact despite of the gas flow. Different values of the Fanning friction factor were found for the different alcohols.

A computerized system was built to measure the temperature in 14 points inside the reactor, and 1 in the bath. A series of experiments were done to evaluate the quality of the data acquired by the system.

Two packed-bed nucleus for two main series of sucrose fermentation experiments were made, one with 5% chrysotile / fiber glass w/w, and other with 10% w/w. Both had 538 mL of total volume, and 120 mL of void volume. The yeast cells were immobilized after complete assembling of the reactor. Different temperature, feed flow rate, and sucrose concentration were applied. A maximum volumetric productivity of $12.3 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ was obtained. The gas hold up was nearly zero, and the head loss was less than 5 mmHg. A volumetric effectiveness experiments runned with red grape juice showed that a part of the reactor was not participating of the reactions.

Despite of the problems of axial dispersion and preferential flow ways, the admixture of fiber glass to chrysotile for yeast immobilized continuous fermentation reactors showed advances optimizing the CO_2 flow and the head loss through the fixed bed, with low loss of fibers and cells. The resolution of the electronic data acquisition system allowed the measure of heterogeneities in the heat profiles of the reaction in the inner space of the reactor.

ÍNDICE

I-INTRODUÇÃO	1
1.1-A crisotila	1
1.1.1-Origem , e obtenção	1
1.1.2- Estrutura.....	1
1.1.3- Propriedades.....	2
1.1.4- Toxicidade	2
1.2- Configuração de reatores.....	3
1.2.1- Reator tanque	3
1.2.2- Reator tubular.....	3
1.3- O problema do fluxo	4
1.4- Aplicações consideradas	4
1.4.1- Oxidações de álcoois	4
a- Tecnologias existentes	4
b- Neste trabalho	5
1.4.2- Fermentação alcoólica	5
a- Um pouco de história.....	5
b- Alguns avanços	6
c- Como é esta célula	6
d- Limites importantes e fatores inibidores	6
e- Relação entre metabolismos.....	10
1.5- O etanol	10
1.5.1- O álcool no Brasil e o Proalcool	10
1.5.2- Outras fontes para o álcool	11
1.5.3- Outras aplicações em torno do álcool.....	12
1.5.4- Ecologia e tendências	13
1.6- Métodos de imobilização	15
1.6.1- Métodos oclusivos.....	17
1.6.2- Métodos expositivos.....	17
1.7- Os principais tipos de reatores de fermentação	17
1.7.1- Vantagens e desvantagens de biocatalisadores	17
1.7.2- Reatores com células livres.....	18
1.7.3- Vantagens e desvantagens das células imobilizadas	20
1.7.4- Reatores com células imobilizadas.....	21
1.7.5- O reator de eficiência orgânica	23
1.8- O efeito térmico	23
1.8.1- A inibição do crescimento e morte celular	25
1.8.2- O ponto de operação.....	25
1.9- Teoria aplicada ao sistema de acompanhamento da temperatura.....	25
1.10- Considerações.....	26
1.11- Objetivo.....	27
II- EXPERIMENTAL	28
2.1 – Materiais	28
2.1.1- Crisotila.....	28
2.1.2- TiO ₂	28
2.1.3- MnO ₂	28
2.1.4- Reagentes	28
2.1.5- Leveduras.....	28
2.1.6- Solução nutriente.....	29

2.1.7- Fibra de vidro	29
2.2- Equipamentos	29
2.3- Estudo de oxidação de álcoois	30
2.3.1- Montagem utilizada	30
2.3.2- Preparação do núcleo	30
2.3.3- Experimento	30
2.4- Estudo de Fermentação livre	31
2.4.1- Montagem utilizada	31
2.4.2- Experimentos	31
2.5- Estudo de fermentação imobilizada com variação de temperatura, e monitoração de vazão de CO ₂	32
2.5.1- Montagem utilizada	32
2.5.2- Preparação do núcleo do reator	33
2.5.3- Experimento	33
2.6- Construção de um sistema computadorizado para monitoração em tempo real da temperatura dentro do núcleo do reator	33
2.6.1- Descrição do sistema de aquisição de dados térmicos	34
2.6.2- Experimento de aferição dos instrumentos	36
2.7- Estudo de fermentação com leveduras imobilizadas em núcleo com 5 % de crisotila	36
2.7.1- Montagem utilizada	37
2.7.2- A imobilização das leveduras	37
2.7.3- Experimento	37
2.8- Estudo de fermentação com leveduras imobilizadas em núcleo com 10 % de crisotila	38
2.8.1- Montagem utilizada	38
2.8.2- A imobilização das leveduras	38
2.8.3- Experimento	38
2.9- Estudo de eficácia volumétrica	39
2.9.1- Montagem	39
2.9.2- Experimento	39
2.10- Cálculo da Produtividade dos Experimentos com Fermentação	39
III- RESULTADOS.....	40
3.1-Resultados dos estudos de oxidações da álcoois	40
3.1.1- Reações	40
3.1.2- Outros	40
3.2- Resultados do estudo de fermentação livre	40
3.2.1-Crescimento da biomassa, e angulo de polarização da luz versos tempo	40
3.2.2-Taxa de produção de CO ₂ versos tempo	41
3.3- Resultados do estudo de fermentação imobilizada com variação de temperatura, e monitoração de vazão de CO ₂	42
3.3.1-Desenvolvimento do núcleo	42
3.3.2-Resposta a variações de temperatura	42
3.3.3-Outros	43
3.4.-Resultados do ensaio de aferição da instrumentação	44
3.4.1- Todos os pontos, exibidos pelo programa Graftot	44
3.4.2- Curvas com maiores dispersões e suas médias calculados pelo programa Grafpmnd	45
3.4.3-Quatro telas de perfis capturadas ao longo do ensaio exibidas	

pelo programa Anigraf.....	45
3.4.4- Quatro telas de perfis com sobreposição e médias capturadas pelo programa Grafpm.....	46
3.5- Resultados dos estudos de fermentação com núcleo com 5% de crisotila	47
3.5.1- Imobilização das leveduras.....	47
3.5.2- Período de desenvolvimento.....	47
3.5.3- Curvas de resultados da grade de experimentos.....	49
3.6- Resultados dos estudos de fermentação com núcleo com 10% de crisotila..	49
3.6.1- Imobilização de leveduras.....	50
3.6.2- Período de desenvolvimento.....	51
3.6.3- Curvas de resultados da grade de experimentos.....	52
3.6.4- Perfis térmicos em pontos da grade de experimentos.....	52
3.7- Resultados do estudo de eficácia volumétrica	53
3.7.1- Produtividade.....	54
3.8- Aproveitamento obtido pelo sistema eletrônico	54
IV- DISCUSSÃO.....	55
4.1- O efeito da mistura da fibra de vidro.....	55
4.2- A oxidação de álcoois.....	55
4.3- Os núcleos e seus efeitos no escoamento na fermentação.....	56
4.4- A resolução do sistema eletrônico e a fermentação	56
4.5- O efeito da temperatura	59
4.6- O efeito dos nutrientes.....	59
4.7- Produtividades.....	60
4.8- O ensaio de eficácia volumétrica	60
V- CONCLUSÕES.....	61
VI- REFERÊNCIAS	63

I-INTRODUÇÃO

Esta tese trata do desenvolvimento de leitos fixos a base de crisotila para a utilização em reatores contínuos, dos problemas de fluxo de fluidos através de uma porção da fibra, bem como das configurações básicas de reatores e de como adaptar um ao outro para formar a primeira parte do trabalho.

A oxidação de álcoois é um assunto de grande importância econômica que já vem sendo estudado em nosso grupo por Zucchetti [1], e que é abordado de uma forma diferente neste trabalho, tentando transpor-lo a uma forma contínua.

Outra aplicação, porém esta de importância muito mais relevante, e também assunto em pauta de nosso grupo, Parizotto [2], é a imobilização de células de leveduras sobre crisotila para a produção de álcool, tratando este trabalho da criação de uma tecnologia para reatores de fermentação contínua da sacarose.

1.1-A crisotila.

Amianto e Asbestos são as denominações comerciais aplicadas aos silicatos de hábito fibroso encontrados na natureza. Seus nomes são derivados da língua de seus primeiros utilizadores, gregos e egípcios, e significam algo como incombustível, ou incorruptível.

Os asbestos são divididos em duas classes principais, de acordo com tipo de suas estruturas cristalinas, os Anfibólios e as Serpentininas.

Dentre os Anfibólios temos crocidolita, amosita, antofilita, tremolita, e actinolita.

Das serpentininas, lizardita, antigorita, e a crisotila.

A fórmula geral da crisotila é: $Mg_3Si_2O_5(OH)_4$

1.1.1-Origem e Obtenção.

Ainda hoje, a formação e ocorrência de minerais asbestiformes é objeto de pesquisas petrológicas e geológicas, existindo duas principais fontes de ocorrências, as originárias de calcários dolomíticos, e as de rochas ultra-básicas, provavelmente resultando de duas transformações metamórficas que ocorreram separadamente.

Segundo Zucchetti [1], a crisotila corresponde a 96% dos asbestos explorados no mundo, sendo que em 1991 o Brasil era o terceiro maior produtor mundial de crisotila beneficiada com 9% da produção, com apenas uma mina em funcionamento, Cana Brava, no município de Uruaçu GO.

Este complexo da SAMA, segundo Prizotto [2], contém cerca de 3 milhões de toneladas de amianto, sendo o teor no minério de 9 a 10%. A mina em céu aberto processa cerca de 3000 ton. de minério por dia em uma instalação de 925 m² de área construída.

O processamento se dá a seco, e o produto segue a norma de classificação canadense.

Neste estudo, será utilizada a crisotila denominada 5R.

1.1.2-Estrutura.

A crisotila é um mineral fibroso, com fibras compostas de fibrilas empacotadas.

As fibrilas são compostas de dois tipos de camadas: uma, a tridimita [Si_2O_4] tetraédrica, e a outra, a brucita [$Mg(OH)_2$] octoédrica, formando uma bicamada. Por haver um pequeno desemparelhamento entre os látices dos dois materiais, há uma tensão mecânica, que força o enrolamento das bicamadas como forma de minimizá-la.

Enrolando de 8 a 12 bicamadas, obtemos uma fibrila que pode ter de 15 a 50 nm de diâmetro externo, aproximadamente 7nm de diâmetro interno e paredes com a

espessura de 75 Å, o comprimento varia com a origem e o processamento na mina, a crisotila utilizada neste trabalho tem em média 50 nm de diâmetro, um esquema da estrutura cristalina da crisotila está na figura 1.1.2.a, Parizotto [2], Giongo [3], Zucchetti [1].

1.1.3-Propriedades

A crisotila possui notada resistência térmica, sendo que, abaixo de 250 °C, nada acontece, estando ela assim apta a todos os testes que pretendemos. Acima de 450 °C o hidróxido de magnésio se transforma irreversivelmente em óxido de magnésio, tornando a fibra quebradiça e perdendo boa parte de suas propriedades superficiais que são advindas das hidroxilas.

A camada externa da crisotila, composta de brucita octoédrica, está arranjada espacialmente de modo que suas hidroxilas fiquem apontadas para fora. Este detalhe estrutural confere à crisotila propriedades muito especiais, tais como o potencial zeta positivo para pH entre 3.0 e 11.8, sendo seu ponto isoelétrico em pH = 11.8, e o máximo em pH 3.0 onde zeta = +400mv, em pH 12.5, o potencial zeta = -100mv, a figura 1.1.3.a mostra o potencial zeta em função do Ph para a crisotila, segundo Parizotto [2].

O fato de o potencial zeta ser positivo e tão pronunciado já é uma primeira etapa de aproximação eletrostática com outras espécies, com potencial negativo, entre as quais se pretende ter algum tipo de adesão, Valerio *et alli* [4].

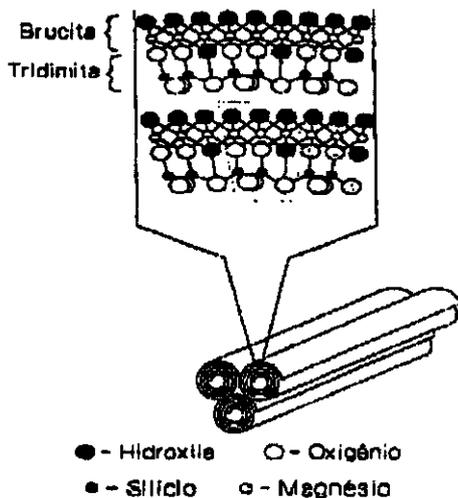


Figura 1.1.2.a -Estrutura das fibrilas de crisotila.

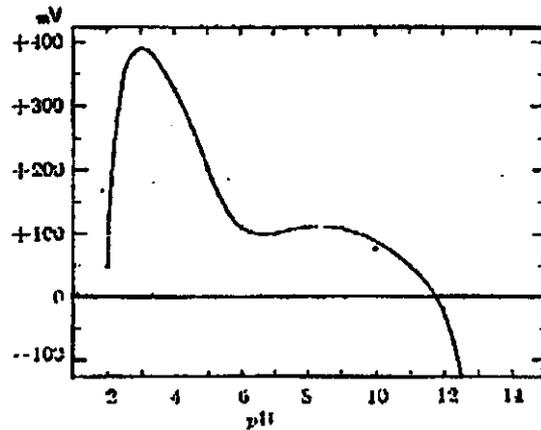


Figura 1.1.3.a- Curva do Potencial zeta em função do Ph.

1.1.4- Toxicidade

É de conhecimento geral, no meio médico que o amianto crisotila está associado a três graves doenças : Asbestose (uma pneumoconiose), o câncer de pulmão, e o mesotelioma. Apesar de tudo isso, é matéria prima de mais de 3000 utilizações.

A concentrações inferiores a 2 fibras/mL, segundo Mc Donald e colaboradores que acompanharam 11mil trabalhadores em uma mina no Canada entre 1966 e 1993, a crisotila é inofensiva.

Valerio *et alli* [4] salientam na introdução de seu artigo, que a presença da crisotila altera o perfil proteico dos Macrófagos, células neste caso atuando na defesa pulmonar.

Existem legislações trabalhistas que prevêem fiscalização e multas pesadas, Brito [5], cita uma ação indenizatória de R\$ 100.000,00, a um funcionário que supostamente foi contaminado com amianto e teve a saúde comprometida.

1.2-Configuração de Reatores

Para se obter uma reação química, é preciso haver um equipamento que garanta todas as condições de transporte necessárias para que esta aconteça: transporte de momentum, massa, e calor, para dentro e para fora do volume de controle. Esta máquina química é denominada reator.

São possíveis dois principais modelos de reatores, sendo que a grande variedade existente ou pertence, ou é uma combinação de alguns deles, são o tubo, e o tanque.

Segundo Hill [6], reatores podem ser descritos de uma forma simplificada como a seguir:

1.2.1- Reator Tanque

Os reatores tipo tanque podem ser operados de forma batelada, semi-contínua, e contínua. Em todas as hipóteses, presume-se que a agitação seja suficientemente eficiente para que as concentrações dos reagentes e produtos, bem como a temperatura, sejam perfeitamente homogêneas ao longo de todo o volume.

No sistema batelada simples, todos os elementos do volume terão a mesma composição, e esta varia com o tempo. Nos reatores operando em batelada é mais fácil se iniciar ou parar o processo do que em seus similares contínuos da mesma capacidade, além do fato de serem mais fáceis de serem higienizados, característica importante na indústria da fermentação. Esta configuração é denominada BSTR, "batch stirred tank reactor", ou seja, reator tanque agitado.

O atual processo de produção de álcool, o Melle-Binot, utiliza as Dornas, que são reatores tanque com agitação.

Os reatores tanque podem ser construídos de modo a operar de forma contínua em relação a um reagente limitante, ou no total, onde sempre a homogeneidade é garantida em todo o volume, e há duas correntes, uma entrando com reagentes, e outra saindo com produtos, como uma purga para manter o nível constante. Esta configuração é denominada CSTR, "continue stirred tank reactor", ou seja, reator tanque contínuo agitado.

Os trabalhos feitos por Williams *et alli* [7] que usaram um reator de fibras ocas, ou "hollow fiber bioreactor", ou por Siqueira Filho [8] e De Carvalho [9] que usaram reatores contínuos com reciclo de células, são alguns exemplos de reatores tanque contínuos.

A alimentação por etapas, proposta por XU *et alli* [10] para reduzir a inibição pelo substrato, seria um modelo de transição entre o batelada e o contínuo, pois ele é batelada em relação ao produto e ao ciclo das células, mas é semi contínuo em relação à alimentação.

1.2.2-Reator Tubular

São assim chamados por sua semelhança física com um tubo, que é tal que se diz que uma reação progrediu ao longo do comprimento deste.

O modelo idealizado prevê que um elemento de volume, em forma cilíndrica, de reagentes entra no tubo reator, desloca-se em seu interior, cobrindo toda a seção transversal sem se misturar com os elementos de volume à frente ou atrás, tendo todas as propriedades homogêneas dentro do elemento, o qual, conforme vai se deslocando, vai sofrendo a reação e se convertendo em produto à medida que se aproxima da saída do tubo. É um sistema contínuo estacionário, onde a reação ocorre ao longo do comprimento percorrido, e é denominado PFR, "Piston Flow Reactor", ou seja, reator tubular pistão.

Os PFRs, são indicados para alta produção, e seu comportamento equivale a uma seqüência de CSTRs, quando seu número tende ao infinito.

Praticamente todas as colunas de fermentação são reatores tubulares ; no entanto, existe o problema do backmixing, e da dispersão axial causados pelo CO₂ formado no processo, e que causam mistura entre os plugs, elementos de volume, e desviam o escoamento do comportamento pistão.

O desenvolvimento deste trabalho se dirige a este tipo de reator, e provavelmente também sofrerá este problema.

Roca *et alli* [11] construíram uma coluna de leito fixo com vazão de alimentação pulsante, e relatam entre outras vantagens, melhorias com o problema dos gases.

Hamanci *et alli* [12] desenvolveram um perfil cônico para sua coluna, de modo que conforme o volume do elemento de volume aumenta durante o percurso pela coluna, a área do corte transversal desta também aumenta, acompanhando o aumento do volume do elemento de volume, relatam redução no problema de mistura axial causado pelo CO₂.

1.3- O Problema do Fluxo

Apesar de suas notáveis propriedades de adsorção, da área superficial de 14m²/g, a crisotila tem também problemas, pode causar sérios danos à saúde dos operadores, e quando submetida a um fluxo de água, por estar dispersa e apoiada nesta, tende a ser carregada por esta, e a se aglomerar na grade de retenção do reator, formando entupimentos, o que inviabiliza reatores de leito fixo. Por outro lado, segundo Foust [13], leitos móveis têm perdas altas por lixiviação, e uma vez que os pontos de contato serão células, algumas seriam destruídas a cada toque. Em leitos fluidizados os toques são mais fortes, o que piora mais ainda o fator longevidade presumida, e que reforça o enfoque deste trabalho em tentar produzir um leito fixo.

Portanto, a saída é desenvolver uma mistura com algum inerte, que dê estabilidade mecânica e química, e possa ser utilizado com simplicidade. Wendhausen [14] utilizou esferas de vidro maciço de 0,5 cm de diâmetro para um sistema com leveduras imobilizadas em crisotila; no entanto, a queda de pressão em uma coluna de 50 cm chegava a 300 mmHg.

1.4-Aplicações consideradas

A crisotila tem, entre suas habilidades que serão abordadas neste trabalho, a de imobilizar células de leveduras, e óxidos metálicos.

1.4.1- Oxidação de álcoois

Segundo Yang [15], a oxidação ou a desidratação do etanol nos leva aos braços principais da árvore da indústria etanolquímica, que pode ser substituída de intermediários em diversos pontos da rede petroquímica.

Em 1978, quando este artigo foi escrito, a realidade do preço do Petróleo era outra; mas com a crescente força do argumento ecológico aliada ao preço futuro do óleo, que é altamente imprevisível, vemos que tecnologias são estratégicas, e um processo que hoje não é viável, amanhã pode ser competitivo.

a- Tecnologias existentes:

Biscaia Jr. *et alli* [16] relatam que na década de 1950 o processo de desidrogenação do etanol foi desenvolvido para competir com a hidratação do acetileno, e existem também os processos de oxidação do etanol, e a oxidação do eteno, em uso na época do artigo 1982. A desidrogenação do etanol ocorre a 275°C e 3 atm.

Maciel Filho *et alli* [17] relatam um processo de obtenção do acetaldeído com temperaturas entre 180 °C e 240 °C, a 1 atm utilizando catalisador de ferro-molibdênio.

A oxidação de álcoois; se for primário nos leva a aldeídos e posteriormente a ácido, se for secundário, a cetonas. Zucchetti [1] testou o desempenho de MnO₂ imobilizado em crisotila sob radiação de microondas na oxidação de álcool piperonílico, e benzidrol, obteve sucesso com o segundo, sendo este oxidado a benzofenona.

b- Neste trabalho,

São testadas as capacidades oxidativas de álcoois através do óxido de manganês sobre crisotila e do óxido de titânio sobre crisotila. Os reagentes de partida e os possíveis produtos pesquisados estão organizados na tabela 1.4.1.

Tabela 1.4.1-Reagentes e possíveis produtos de oxidação catalítica.

Reagentes de partida	Possíveis produtos
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \diagup \\ \text{C}=\text{O} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array}$
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \diagup \\ \text{H}-\text{C}-\text{C} \\ \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \text{O} \end{array}$
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \quad \diagup \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C} \\ \quad \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{O} \end{array}$
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{H} \\ \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{OH} \quad \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{H} \\ \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{O} \quad \text{H} \end{array}$
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \quad \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \quad \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \quad \quad \diagup \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C} \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{O} \end{array}$
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \quad \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{H} \\ \quad \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{OH} \quad \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \quad \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{H} \\ \quad \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{O} \quad \text{H} \end{array}$

1.4.2-Fermentação Alcoólica

São tratados neste trabalho, dois tipos de fermentação, ambas utilizando as células de levedura de pão, *Saccharomyces cerevisiae*, de um modo livres, de outro imobilizadas em crisotila ativada.

a- Um pouco de história:

Segundo o Smithsonian Institute, em 1998 foram achados os primeiros sinais de utilização de leveduras na história, que surgiram na Mesopotâmia, atual Iraque, em torno de 6000 A.C.. De acordo com Reed [18], cenas de padaria foram encontradas em sítios arqueológicos em Memphis, no Egito, datadas de 3000 A.C., e a primeira cervejaria foi fundada em 1383 D.C. em Munique. E entre 1857 e 1863 Pasteur prova que a fermentação se origina de micróbios e explica a sua natureza anaeróbica, e em

1984 Kreger Van Rij e um time internacional fazem a última, até agora, atualização da classificação de leveduras.

b- Alguns avanços:

Devido a esta longa história sem incidentes relatados, a levedura de pão, ou *Saccharomyces cerevisiae*, foi classificada como GRAS, "generally accepted as safety", ou seja, aceito geralmente como seguro.

Dada a facilidade e a segurança para se trabalhar, esta célula tem sido escolhida para vários desenvolvimentos em engenharia genética, Fieschko *et alli* [19] clonaram a espécie com genes que produzem γ -interferon, um imuno interferom humano, Carsen *et alli* [20] produziram um *S. cerevisiae* recombinante que produz Proteinase A, através de uma técnica que coloca no retículo endoplasmático uma proteína modificada, a qual quando copiada pelos ribossomos, origina o produto desejado. A proteína modificada passa de geração em geração, a cada divisão celular sendo recopiada com boa durabilidade.

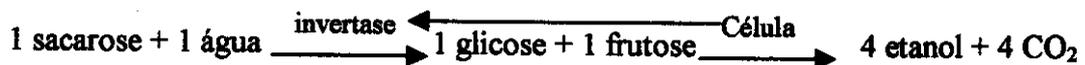
Inlow *et alli* [21] descrevem em seu trabalho, um *S. cerevisiae* que recebeu genes da gluco-amilase do *Aspergillus awamori*, e assim conseguiram uma levedura com alto rendimento na digestão de amido, sendo que entre 80 a 90% da atividade amidolítica é secretada no meio. É relatado que a célula se manteve estável por 800 gerações já observadas.

Neste trabalho só lidaremos com leveduras comuns de fabricação de pão.

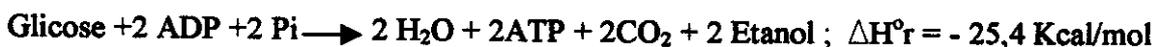
c- Como é esta célula:

Voet [22] mostra que as leveduras são células altamente organizadas, Eucariontes, com raios de 10 μm a 100 μm , pertencentes ao reino dos fungos. Um esquema simplificado de uma célula eucarionte é mostrado na figura 1.4.2.a, de McNally [23].

A estequiometria da fermentação alcoólica é a mesma em ambos os casos, livre e imobilizada, e é dada pela equação abaixo que nos leva ao rendimento teórico máximo de 0,51 g etanol / g Sacarose.



De acordo com Voet [4], Lehninger [22], o calor de reação ΔH°_r pode ser dado pela relação abaixo para a glicose:



Para a sacarose, que origina duas hexoses por mol para serem fermentadas, temos o dobro do calor de reação menos a energia gasta na inversão e no transporte, que pelo cálculo feito pelos calores da formação, ou de combustão, nos dá $\Delta H^\circ_r = -31,4 \text{ Kcal/mol}$.

d- Limites importantes e fatores inibidores:

Vitolo [24] mostra que a maior parte da enzima invertase produzida pela levedura atua fora da célula, sendo que essa absorve grande parte dos açúcares já na forma invertida, hexoses redutíveis, Voet [22] e Lehninger [25] descrevem as etapas do catabolismo da glicose na formação do piruvato, processo em que a presença de ions Mg^{++} segundo Walker *et alli* [26] é fundamental, pois em concentrações abaixo de 13 μM não há crescimento, e a partir de 500 μM , há um patamar na eficiência.

O piruvato, nas leveduras, conforme a tensão de oxigênio presente, pode tomar a via fermentativa anaeróbica ou a oxidativa aeróbica conforme mostra a figura 1.4.2.b, que descreve resumidamente a rota catabólica.

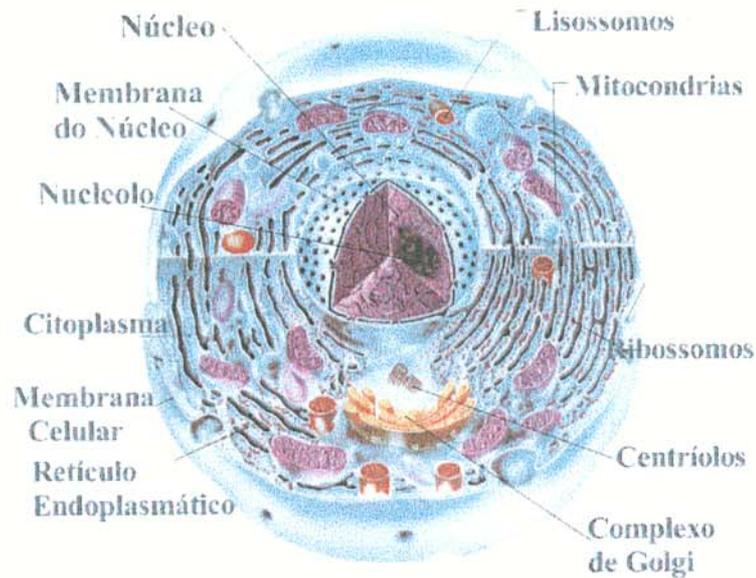


Figura 1.4.2.a- Célula Eucarionte de McNally [23].

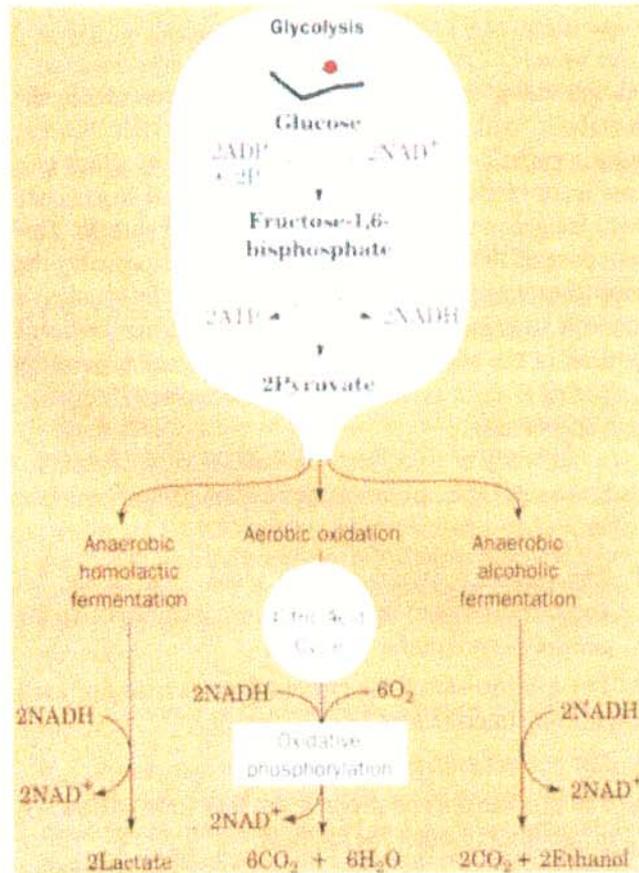


Figura 1.4.2.b- Rota catabólica da glicose extraído de Voet [22].

De acordo com Cyzewski *et alli* [27], uma pequena pressão parcial de O_2 , da ordem de 0,07 a 1,7 mmHg é necessária para que o metabolismo da célula consiga anabolizar lipídios insaturados para as membranas e proteínas de reposição. A partir de 1,7 mmHg a reprodução celular dispara, e próximo a 300 mmHg inicia-se uma inibição total do crescimento e da fermentação.

Beck [28] nos dá exemplos de componentes de biomenbranas que contêm ésteres de ácidos graxos insaturados, sphingomielina, na figura 1.4.2.c, e de como compõem a bicamada que é a estrutura básica das membranas celulares, na figura 1.4.2.d.

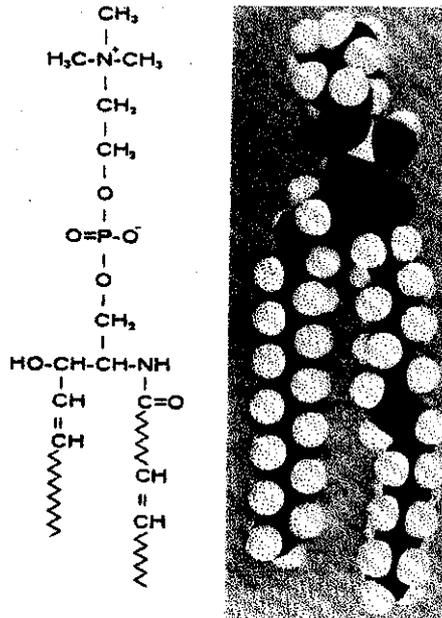


Figura 1.4.2.c-Fosfolipídio componente de membranas celulares, Beck [28].

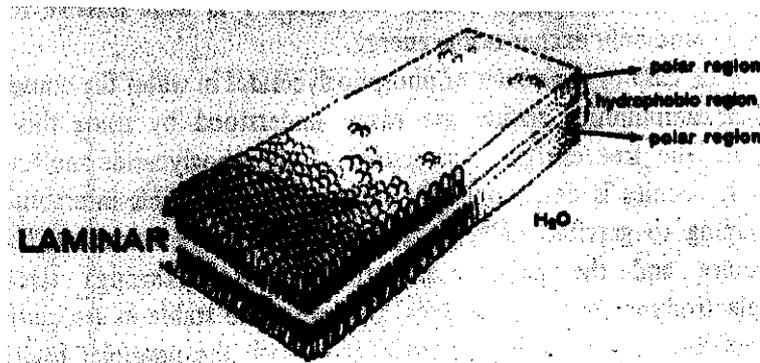


Figura 1.4.2.d- Arranjo típico de fosfolipídios em membranas celulares, Beck [28]

De acordo com Lehninger [29], as enzimas têm pontos ótimos de operação em relação ao pH, e à temperatura. A faixa de pH em que as leveduras funcionam é bastante ampla, não oferecendo problemas operacionais; já no caso da temperatura, a taxa de reação sobe à medida em que esta sobe atingindo um máximo próximo a 40 °C, quando ela começa a sofrer um processo de desnaturação irreversível.

D'Amore *et alli* [30] desenvolveram um trabalho de seleção de espécies para operar em temperaturas mais altas. Sua motivação foi a economia em energia conseguida, reduzindo os gastos com refrigeração na etapa de fermentação e com parte

do posterior aquecimento para a destilação. A 32°C, de 30 a 35% do custo com a etapa de fermentação é com refrigeração, já a 40°C, elimina-se esta parcela.

Moulin [31], determinou as curvas limite para crescimento celular para *S. cerevisiae* e *K. fragilis*, em função da concentração do álcool e da temperatura, muito útil para processos com células livres onde a renovação é fundamental. O gráfico da área de crescimento pode ser visto na figura 1.4.2.e.

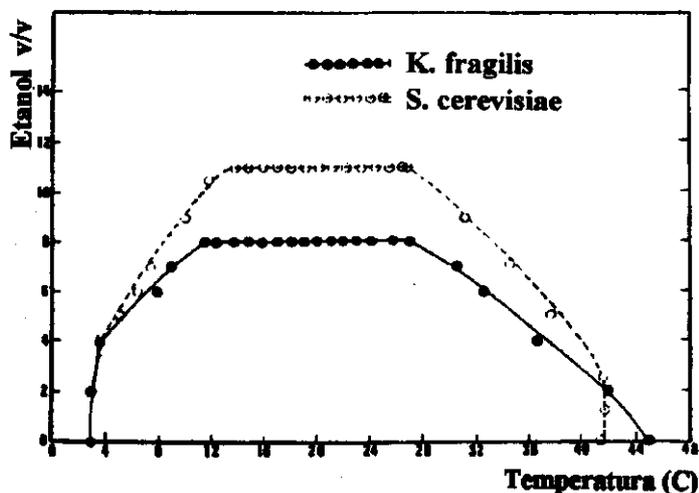


Figura 1.4.2.e- Limites de Tolerância para crescimento celular, Moulin [31]

Sá-Correia *et alli* [32] descreveram dois mecanismos: um de morte acentuada pelo etanol que age através da desnaturação de proteínas de estruturas macro-moleculares intra-mitochondrias; outro, morte de segunda ordem acentuada e induzida pelo etanol, onde há um desgaste acentuado dos lipídios das membranas, o que causa um desequilíbrio no transporte de íons que acaba acidulando o citoplasma e matando a célula.

Leão *et alli* [33] complementaram que o etanol age negativamente sobre a taxa específica de crescimento, a viabilidade, a taxa de fermentação, e o transporte de açúcares e amino ácidos. Concluíram também que quanto maior a cadeia do álcool e maior a solubilidade nos lipídios das membranas, mais sensível fica a célula agravando-se o problema da morte de segunda ordem acentuada e induzida pelo álcool.

Thatipamala *et alli* [34] compararam as inibições pelo substrato e pelo etanol, para concentrações altas de glicose, 15 a 25% p/v. A inibição pelo substrato dá-se por barreiras osmóticas e baixa atividade de água, o que atrapalha as enzimas catabólicas, sendo que a 40% p/v, o crescimento cessa. A inibição pelo substrato é mais tóxica que pelo produto, desativando enzimas catabólicas importantes.

O produto inibe o crescimento da biomassa, e o substrato inibe a própria biomassa.

A fase Lag, é um tempo de adaptação da célula às novas condições, e está associada à inibição por excesso de substrato.

Aboutbul *et alli* [35] nos mostram um sistema de equações que descrevem a fermentação batelada em torno de mecanismos de inibição pelo substrato e pelo produto, mas sem considerar efeitos de temperatura os de morte celular.

A queda na taxa específica de produção é tão expressiva ao final da fermentação, quando a célula tem que lutar contra a inibição do etanol para consumir o pouco dos açúcares que estão sobrando, que L'Italien *et alli* [36] testaram um sistema de remoção do etanol do meio de fermentação através do arraste por CO₂. O problema é que para remover uma quantidade de álcool que melhorasse o processo, era necessário utilizar 70 atm de CO₂, o que causava completa inibição da atividade celular, provavelmente por

causa de um forte desequilíbrio entre reagentes e produtos na etapa da enzima catabólica Piruvato descarboxilase, que tem como produtos o CO₂ e o acetaldeído.

Cysewsky *et alli* [37] realizaram fermentações a vácuo, 50 mmHg, obtendo produtividades quase 3 vezes maiores que aqueles em pressão atmosférica. Infelizmente a energia gasta para bombear o CO₂ produzido contra a atmosfera é muito maior que qualquer benefício obtido.

Stanley *et alli* [38] estudaram o efeito do acetaldeído sobre culturas de *S. cerevisiae*, e concluíram que, para concentrações menores que 0.1 g/L, há uma redução em até 60% no tempo da fase Lag para culturas que sofreram choques térmicos ou etílicos, e um aumento de até 58% na velocidade de crescimento na fase exponencial. O acetaldeído é um metabólito intermediário no metabolismo fermentativo, e tem a tendência a se difundir livremente pelas membranas celulares.

e- Relação entre metabolismos:

Em uma fermentação alcoólica para fins comerciais, um dos fatores que influenciam o custo final do produto é o índice de aproveitamento dos açúcares na sua produção, Aguilera *et alli* [39] desenvolveram um trabalho analisando o chamado parametro $Y_{p/x}$, que é a relação entre a massa de açúcares gastos para produzir produto e a biomassa e concluiu que para uma cultura em estado estacionário, o máximo rendimento é atingido quando os gastos com açúcares são apenas para reposição do metabolismo interno.

A relação entre os dois processos metabólicos, os que gastam energia para produzir álcool e os que gastam com crescimento, não é fixa, mas depende do sistema e das condições de operação, entre elas a concentração de O₂.

1.5- O Etanol

Segundo Morrison *et alli* [40] existem dois processos fundamentais para se obter álcool: a hidratação de alcenos, e a fermentação de hidratos de carbono. No Brasil, país de tradição agrícola, grande parte é obtida por agroindústrias através da fermentação de produtos da agricultura, principalmente a cana de açúcar.

1.5.1- O Álcool no Brasil e o Proalcool.

Segundo Bertelli [41], o Brasil tornou-se em 1975, com o lançamento do Programa Nacional do Álcool, (Proalcool) o primeiro país do mundo a desenvolver um programa energético em larga escala para buscar uma alternativa para a crise do preço do petróleo iniciada em 1973.

Até 1975 a produção nacional vinha estabilizada em torno de 500 milhões de litros anuais, a safra 1991/92, rendeu 12,7 bilhões de litros.

O investimento entre 1975 e 1989 foi de US\$ 10,5 bilhões, gerando uma multiplicidade de benefícios tecnológicos ambientais e sociais além de poupar, até 1991, cerca de US\$ 20 bilhões em importações de petróleo. Valores tendo como base o dólar de 1991.

A capacidade instalada no Brasil hoje 1998, é de cerca de 15 bilhões de litros por ano e, levando-se em conta o preço atual do litro a R\$ 0,58, (ou US\$ 0,48) vemos que qualquer 1% que se melhore no processo reflete em cerca de R\$ 87 milhões de economia.

O programa do álcool fez com que a absorção de mão de obra subisse de 28 mil em 1975 para 800 mil diretos e 250 mil indiretos em 1991. No final da década de 80, aproximadamente 95% da frota circulante de veículos leves era movida a álcool.

Outro benefício que não era esperado inicialmente, foi o da cogeração de energia elétrica, que em 1992 se todas as destilarias tivessem convertido suas sobras de bagaço em energia, teria sido de 24 milhões de Kwh, correspondente a 8% do consumo nacional anual

Dentro do Proalcool, houve também um programa de micro usinas, descrito em 1980 por Villen [42]. Infelizmente inviável, pois 2/3 da energia gasta no processo é para moer a cana, e esta força vinha de motores a Diesel.

1.5.2- Outras Fontes para o Alcool:

O álcool produzido no Brasil é obtido predominantemente pela fermentação do açúcar de cana pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto outras fontes têm sido pesquisadas, pois o tempo de operação de uma usina de 6 meses por ano é curto, e pode ser melhor aproveitado amortizando melhor os custos.

Santos [43], da Embrapa fez em 1980 um estudo comparativo entre o rendimento da cana de açúcar, da mandioca, e do sorgo sacarino, chegando aos valores de produtividade e rendimento energético em termos de energia obtida/gasta na produção e cultivo mostrados na tabela 1.5.2.

Tabela 1.5.2- Comparação entre culturas Embrapa 1980.

Espécie	Produtividade L. ha ⁻¹ .ano ⁻¹	Balanco energético
Cana	4 124	4.44
Mandioca	2 250	4.25
Sorgo sacarino	3 775	3.28

Day *et alli* [44] descrevem que dentro do período de maturação da planta há 40 dias de pico de açúcares sendo 5 dias o pico da sacarose; e concluem que a melhor cepa para fermentar caldo de sorgo não é a mesma para a melhor fermentação do caldo de cana. A fermentação vai melhor no começo do período de maturação da planta, porque ao maturar e aumentar os açúcares, também aumenta o ácido aconítico, que inibe as leveduras.

Matsuoka *et alli* [45] desenvolveram um estudo sobre fermentação de batata doce sem cozinhar. O processo consta de uma etapa de sacarificação com glucoamilase de *Rhizopus sp*, e uma fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*.

O cozimento consome cerca de 30 a 40% da energia do processo, e tentou-se substituí-lo por um agente bactericida, o piro-sulfato de potássio 0,02%, o qual elevou o rendimento por reduzir as perdas para outros micro organismos; no entanto o próprio bactericida mostrou ser tóxico para as leveduras em concentrações pouco maiores.

Azhar *et alli* [46] fizeram um estudo sobre a fermentação de madeira hidrolizada, e concluíram que produtos da decomposição da liguinina, o furfural, e o hidróxi metil furfural, HMF, são inibidores das leveduras. No entanto, foi conseguido um esquema de aclimatação em que as leveduras conseguem funcionar com 91% de sua performance em relação à solução limpa.

A álcool desidrogenase sofre inibição pelo furfural; no entanto existem referências de que estas células metabolizam furfural e HMF.

Banerjee *et alli* [47] acharam uma levedura que tem atividade amilolítica; já Inlow *et alli* [21] preferiram produzir um mutante genético a partir do *Saccharomyces cerevisiae* com todas as características que os interessavam, para produzir etanol a partir de milho.

Szczodrak [48] fez um estudo comparativo entre dois métodos de preparo da palha de trigo para um posterior processo de sacarificação simultânea a fermentação, melhores

resultados foram obtidos com o método que submetia a palha a um tratamento etanol-soda térmico.

Aboutboul *et alli* [49] desenvolveram um estudo em torno da mandioca, que sendo pré secada abaixo de 10% de umidade, pode ser armazenada por vários meses, vindo a suprir a usina nas longas paradas causadas pela entressafra da cana.

Utilizando amiloglicosidase pelo processo Park-Papini obtiveram soluções de açúcares redutores fermentáveis, e a partir disso desenvolveram um trabalho de cinética.

Queiroz *et alli* [50] desenvolveram um estudo projeto de um sistema para a utilização de matérias primas amiláceas, mandioca, milho, e batata, de modo que houvesse rotação de culturas, e melhor aproveitamento do solo e do tempo da usina. O processo químico era composto de uma etapa de sacarificação com amiloglicosidase e uma fermentação com *Saccharomyces cerevisiae*. O projeto visava complementar as usinas de álcool de cana.

Gibons *et alli* [51] desenvolveram um processo de fermentação contínua de cubos de beterraba pré esterilizados com ácido sulfúrico, em que a levedura ia crescendo nos cubos consumindo os açúcares e se incorporando a eles. A idéia era produzir álcool e cubos de beterraba enriquecidos com proteínas das leveduras, para ração animal.

O rendimento esperado é de 87 L etanol / ton. beterraba, sendo que a produtividade agrícola dada é de 57 ton/há. Temos uma produtividade final de 4959 L etanol/ ha safra. Competitivo com a cana.

Cysewsky *et alli* [27] propuseram um sistema para fermentar papéis usados em que estes passam por um processo enzimático de sacarificação, depois por uma fermentação anaeróbica com traços de oxigênio, e finalmente por um último estágio de fermentação completamente anaeróbico. Wilke *et alli* [52] fornecem um estudo de construção de uma planta para processar jornal velho, a custos nos EUA.

A proposta do grupo de Wilke e Cysewsky seria muito interessante para a cidade que tivesse um sistema de coleta de lixo seletiva, pois uma parte grande do lixo de nossa civilização é composta de papéis, e essa seria uma matéria prima a custo quase zero.

Kling *et alli* [53] em 1987 desenvolveram um processo em que a explosão a vapor era um pré-tratamento para uma posterior sacarificação do bagaço de cana; no entanto, serve também para outros resíduos agrícolas. Após a sacarificação, há uma fermentação convencional em instalações já existentes.

1.5.3- Outras Aplicações em torno do Etanol

Em 1981 a empresa Gefi & Retherm lançou no Brasil o equipamento de explosão a vapor para abrir mais as células e fibras da cana e extrair mais eficientemente o açúcar, [54].

O tratamento de efluentes é um problema sério, pode custar boa parte do preço do produto, e sua falha em alguns casos leva a multas pesadas. Yu *et alli* [55], desenvolveram um processo para o tratamento do Licor Sulfídico de uma indústria de papéis no Canadá, conseguiram transformar o poluente em álcool, um produto vendável. Para isso o processo utiliza uma etapa de "steam stripping", arraste a vapor, que eleva o pH eliminando 88% dos elementos tóxicos. Segue uma sacarificação de oligômeros, e a fermentação alcoólica propriamente dita.

Segundo a Seeger do Brasil [56], fabricante de equipamentos para transformar CO₂ em gelo seco, se todo o gás produzido no país naquele ano, 1981, por fermentação fosse recuperado e comercializado, o volume seria suficiente para abastecer todo o mercado interno, substituindo assim o CO₂ produzido pela queima de óleo, e ainda sobraria para exportação.

Matsuoka [57] descrevem em 1982 uma técnica segundo a qual, através da enzima chamada de Hi Cel, o bagaço de cana e o vinhoto formam ração para gado. Prática usada atualmente em grandes fazendas.

Oliveira Jr [58] propõe um sistema agro-industrial integrado do qual, a partir da atividade inicial da produção de álcool de cana, e de uma atividade de plantio de sementes para extração de óleos são obtidos álcool, glicerina, Diesel vegetal por transesterificação, termofosfato, óleo comestível, gado gordo, biogás, e eletricidade em um sistema onde nada parece ser rejeito e tudo é aproveitado.

Romano [59] nos apresenta os ésteres metílico e etílico de óleo de soja como substitutos diretos do óleo Diesel.

A reportagem [60] relata as experiências feitas pela Caterpillar do Brasil a partir de 1979, com 11000 horas de uso de óleos vegetais em máquinas de sua fabricação, autorizando, com garantia de fábrica, a mistura de até 30% de óleo vegetal degomado ao Diesel. Outros experimentos foram feitos com éster etílico de óleo de soja para substituição de 100% do Diesel, também com aprovação da empresa.

A aplicação do álcool etílico na fabricação de esteres de óleos vegetais é uma aplicação interessante do ponto de vista estratégico relativo a importações até os dias de hoje, pois boa parte do petróleo que importamos é para suprir a frota circulante a Diesel. Basta ver na Brasil Energia [61] a proporção entre álcool, gasolina e Diesel consumidos, sendo que a média diária em 1997 foi em mil barris por dia de: gasolina 344,21, Diesel 562,2, álcool 150,03.

A viabilidade de uma tecnologia de combustíveis na conjuntura mundial deste final de século, depende de muitos fatores políticos, e está intimamente ligada as guerras no Oriente Médio e Países Árabes. Na tabela 1.5.3 temos a evolução do preço do petróleo nos últimos 25 anos, e lembramos que o Proalcool foi criado no sufoco da crise em 1975.

Tabela 1.5.3- Preço internacional do petróleo nos últimos 25 anos.

Até 1973	US\$ 2,50 / barril
1973	US\$ 10,50 / barril
1974	US\$ 34,40 / barril
Atual	US\$ 13,00 / Barril
Futuro	?

1.5.4- Ecologia e Tendências:

Atualmente está havendo uma conscientização do impacto ambiental da atividade humana sobre nosso planeta. Existem diversas correntes no que diz respeito às causas, mas todas são unânimes em reconhecer um aquecimento global, e que as conseqüências deste, serão no mínimo sérias.

A tese mais aceita é, sem duvida, a do efeito estufa, causado pelo dióxido de carbono lançado na atmosfera.

O CO₂ é transparente para muitos comprimentos de onda da luz solar; ou seja, permite que a energia entre no sistema térmico do planeta mas absorve a energia nos comprimentos de onda do calor que seria perdido na re-irradiação, acumulando assim, de maneira lenta a energia que normalmente seria perdida.

É um dos fatores que tornam Vênus uma fornalha.

Na Terra, existe um delicadíssimo equilíbrio de carbono em circulação no ecossistema, sendo que a passagem pela atmosfera, se dá na forma de "CO₂".

Quando fazemos uso de fontes de carbono fósseis, sejam elas Petróleo ou carvão, estamos jogando na atmosfera quantidades muito grandes de dióxido de carbono, muito maiores do que aquela que o elo primário do ecossistema, os seres captadores que realizam foto-síntese, são capazes de absorver. Este excedente gera o Efeito Estufa, que tende a desequilibrar todo o sistema.

Se o CO₂ fosse introduzido muito lentamente no sistema, talvez o único efeito visível fosse o aumento de biomassa, inicialmente deslocado em direção ao elo primário. Mas como este está também sendo seriamente predado, a reversão da tendência pode ser mais difícil.

Em 1992, houve o segundo encontro das nações unidas, a ONU, e organizações não governamentais, ONGs, para debater o assunto Impacto Ambiental da Atividade Humana na Terra, a Rio 92, a qual surpreendentemente contou com a participação dos Países ricos, os que causam maiores impactos.

Em 1997 houve outro grande passo, a Conferência Mundial de Kyoto, sobre aquecimento global. Nela foi deliberado que cada nação teria uma cota de emissão de CO₂, e que as que ultrapassassem, pagariam impostos, que por sua vez serão usados para financiar projetos que favoreçam baixa emissão, nos Países Emergentes, de modo que estes não se tornem novos emissores pesados, o que aceleraria a degradação do meio ambiente. Por outro lado, os países que emitem menos que sua cota, podem negociar sua cota.

Atualmente, podemos estar vivendo um ponto de máximo, em termos de qualidade de vida. As melhorias alcançadas desde o início da revolução industrial, e principalmente nas últimas décadas, são muito impressionantes, mas agora, as conseqüências começam a ser vistas, tais como o Buraco na camada de ozônio, e o Aquecimento Global.

Dentro em breve, o preço do progresso pode se tornar caro demais, e nos conscientizaremos que estamos vivendo uma corrida entre a evolução de nossas tecnologias e o crescimento do impacto causado pelas nossas atividades. Se o progresso ocorrer na direção certa, e em tempo, o impacto poderá ser minorado, ou até revertido.

No Brasil, no final da década de 80, mais de 95% da frota leve circulante era movida a álcool, ecologicamente estávamos bastante avançados.

O etanol é uma fonte renovável, ou seja, consome de volta o CO₂ lançado na atmosfera para crescer a cana de açúcar usada para produzi-lo. E existem outras tecnologias disponíveis para outros combustíveis renováveis.

A conjuntura ecológica mundial, bem como as resoluções de Kyoto, apontam firmemente para a direção que faz da idéia do Proalcool não só uma saída ecologicamente correta, mas também economicamente vantajosa, e capaz de render lucros internacionais.

A declaração do Rio, onde as nações mais ricas admitem sua responsabilidade maior na conservação proteção e restauração ambiental, a Convenção do Clima, onde 153 países se comprometeram a reduzir a emissão de CO₂ para evitar o efeito estufa e a ameaça a produção de alimentos, e a Agenda 21, são documentos sobre deliberações internacionais que mostram que há simpatia e boa vontade a nível mundial por projetos no tema da energia renovável. O Mundo Depois da Rio 92 [62].

A tendência é adotar onde for possível e viável, o uso de recursos renováveis. Exemplos como os 22% de álcool na gasolina obrigatórios por lei no Brasil, ônibus na Suécia movidos a álcool, e o programa Norte Americano de álcool, que é muito importante, são responsáveis por aproximadamente 20% da emissão mundial de CO₂.

1.6- Métodos de Imobilização:

Existem muitas maneiras de se imobilizar células. Segundo Matiason [63] os principais métodos podem ser divididos e descritos como:

Acoplamento covalente, efetivamente promove-se ligações químicas entre o suporte e a célula; como exemplo temos a fixação na carboximetilcelulose com carbodiamida, ou então fixação na gelatina usando glutaraldeído, métodos caros e agressivos que danificam as células. Há também a possibilidade de se fixar a célula através de gelatinas de óxidos metálicos hidratados, tais como o de titânio, método mais ameno, e que forma flocos de células.

Afinidade, método pouco agressivo, sobre o qual citamos interações de *Saccharomyces cerevisiae* com Concanavalin-A Sepharose. No entanto as interações não são muito fortes.

Adsorção, é um método de fundamental importância. A princípio é reversível, e muito barato; como exemplo citamos *Saccharomyces cerevisiae* aderidos sobre serragem, ou vidro poroso.

Aprisionamento, existe uma vasta literatura sobre estes métodos, os quais podem ser divididos em dois sub grupos principais, aprisionamento em polímeros naturais, e sintéticos.

Os métodos com polímeros sintéticos são geralmente muito agressivos e danificam ou matam a célula, compensam ser usados quando se quer apenas uma etapa das que o micro organismo é capaz de fazer, como exemplo, temos a poli(acrilamida), e o poliuretano, sendo que a poli(acrilamida) pode ser usada para ligação cruzada com as células.

Os métodos com polímeros naturais, pouco agressivos, podem imobilizar células e mantê-las vivas, como exemplo temos o colágeno, que pode ser solubilizado a baixos pH, e reprecipitado em altos pH, Agar e Agarose, K-Carragena, e o Alginato, extraído de algas e coprecipitado com ions de Cálcio, um dos mais utilizados, um dos procedimentos é se preparar o gel com células e depois corta-lo no tamanho desejado, outro é pingar a suspensão de células com o alginato em uma solução de cálcio.

Ogbona *et alli* [64] desenvolveram um trabalho em torno da *Luffa cylindrica*, a qual imobilizou *Saccharomyces cerevisiae* com muita eficiência, mais de quatro vezes seu peso mas, por problemas de configuração de reator, conseguiram uma produtividade baixa, em torno de $7,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, detalhe mostrado na figura 1.6.a.

Kana *et alli* [65] imobilizaram *Saccharomyces cerevisiae* sobre um mineral, Kissiris. A ligação é atribuída entre grupos carboxil, amino, e hidroxil da célula com ions metálicos na rocha, obtiveram uma produtividade de $1,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, com extrato de uvas, o dobro do conseguido por meios convencionais.

Tyagi *et alli* [66] desenvolveram um estudo comparativo entre células *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio, bagaço de cana, e bagaço tratado com hexametilenodiamina. Este último mostrado na figura 1.6.b, imobiliza 0,41 g célula /g base.

Um outro modo engenhoso de imobilizar células, é o método das fibras ocas, "hallow fiber", em que as células são colocadas dentro de uma fibra fechada no extremo inferior, e de parede porosa e extremamente fina de modo que não haja vazamento de células, mas sim um permeamento de reagentes e produtos. A vantagem deste tipo de reator é manter a concentração de células próxima a da do tecido de onde vieram. Por isso é indicado para sistemas com células de seres superiores. Williams *et alli* [7] nos mostram um reator de fibras ocas operando com células mamarias em que com um fluido de prova, fazem um mapeamento através de imagem por ressonância magnética dos pontos de consumo de oxigênio dentro do reator, na figura 1.6.c.



Figura 1.6.a- Loofa cylindrica com células *S. cerevisiae*, Ogbonna *et alli* [64].



Figura 1.6.b- Bagaço tratado, com células ampliação 870x, Tyagi *et alli* [66].

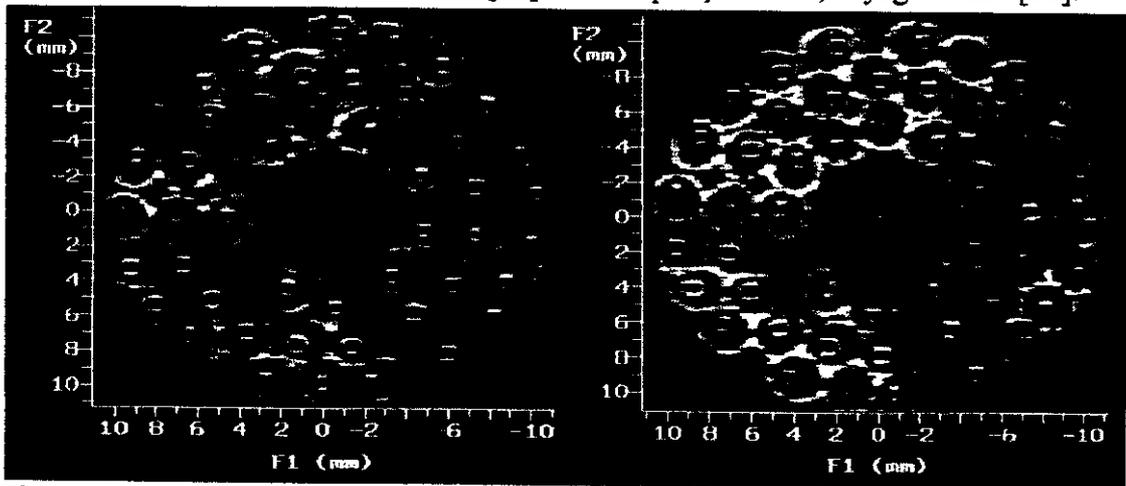


Figura 1.6.c- Imagens de ressonância magnética nuclear de um reator de fibras ocas onde com um marcador acompanha-se o crescimento de células mamarias. As áreas mais brancas indicam maior consumo de oxigênio. A espessura da camada celular é estimada em $200 \mu\text{m}$, Williams *et alli* [7].

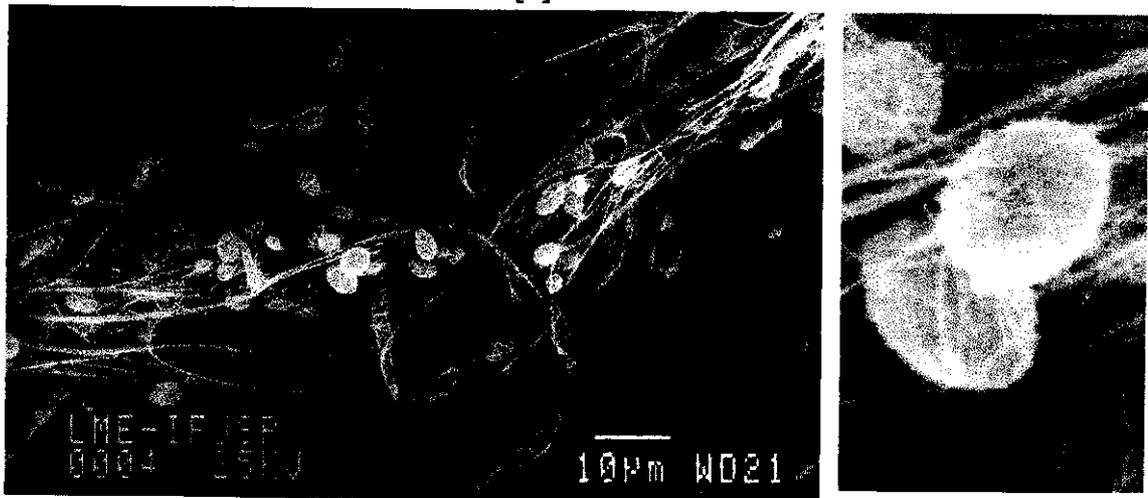


Figura 1.6.d- Microscopia eletrônica de células de *S. cerevisiae* immobilizadas em crisotila, no detalhe ampliado é possível ver o aprisionamento devido ao enovelamento das fibras sobre as células; microscopia obtida em nosso grupo por Cassiolla, F.M. .

O método utilizado neste trabalho não se enquadra diretamente em nenhum dos anteriores, mas talvez em alguma combinação. Trata-se da imobilização em crisotila, descrita por Joekes *et alli* [67] e mostrado, na figura 1.6.d., foto obtida em nosso grupo.

É possível que se possa qualificar este método como um aprisionamento por fibras de crisotila, as quais fazem ligações covalentes entre os grupos hidroxil da fibra com grupos carboxil e ou aínas de proteínas na superfície da célula.

Para posteriores comparações, é interessante fazermos uma divisão nos métodos de imobilização com relação às características geométricas do imobilizado obtido.

1.6.1- Métodos Oclusivos.

São aqueles que imobilizam as células dentro de alguma substância fixa. Os aprisionamentos (clássicos) como o alginato de cálcio, são um exemplo que impõe barreiras difusionais e assim atrasam a reação, mas por outro lado, protegem as células de excessos de concentrações de reagentes e produtos, diminuindo o efeito das inibições.

Um exemplo do quanto a barreira difusional atrapalha foi mostrado por Chang *et alli* [68], que encapsulou junto com as células em alginato de cálcio a enzima invertase, produzida pela célula, mas que colocada mais próximo dos reagentes acelera o sistema de reações. Relatam também que surfactante aplicado na superfície da membrana de alginato, reduz as rupturas por CO₂.

1.6.2- Métodos Expositivos.

São os métodos que fixam as células evitando que sejam arrastadas pela corrente do processo, mas que mantêm boa parte de sua superfície exposta ao meio de reação, não impondo barreiras difusionais e tirando assim melhor proveito do potencial destas. São exemplos a crisotila, o bagaço de cana tratado, a Loofa cylindrica, o Kissiris, as adsorções, etc.

1.7-Os Principais Tipos de Reatores de Fermentação:

Os reatores são projetados e configurados em função de como vão operar, de que vão ser alimentados, de qual vai ser o seu elemento ativo, neste caso as células, e como vão estar durante o funcionamento. Deve-se ter em mente também por quanto tempo.

No caso das células, elas podem estar livres ou imobilizadas, cada caso será analisado juntamente com suas vantagens e desvantagens.

1.7.1- Vantagens e desvantagens de bio catalisadores:

São catalisadores vivos, ou originários de seres vivos. Deste modo a biocatálise esta relacionada com a transformação produzida por etapas metabólicas originárias de seres vivos. Suas vantagens são de efetuar as transformações de forma mais rápida, seletiva, e em condições mais suaves que seus concorrentes catalisadores normais.

As condições em que células e enzimas normalmente trabalham são mais suaves, sendo em temperaturas abaixo de 45°C, em pressão atmosférica, e pH entre 3 e 8.

A transformação pode ser feita por enzimas isoladas; neste caso pode ser necessário o uso de caros cofatores, ou células vivas, ou ainda células cuja parte de seu metabolismo que produz a reação desejada ainda funcione.

No caso das células vivas, existe a vantagem delas se reproduzirem, mantendo assim a viabilidade alta no sistema. No entanto, isso pode ser interpretado como desvantagem, pois a célula que se reproduz e cresce consome substrato, reduzindo o rendimento.

Uma desvantagem é a grande quantidade de água necessária ao processo, o que encarece a separação e concentração do produto final.

As células podem ser recicladas no processo. Isso demanda equipamentos caros como centrifugas, e as vezes tratamentos de recuperação, como no caso do processo Melle-Binot, ou podem ser filtradas para serem removidas do produto, como no caso do vinho e da cerveja.

Uma das características das células como biocatalisadores é sua diversidade. Dentro de uma espécie de levedura existem diversas cepas, sendo que cada uma tem um comportamento diferente. Wendhausen et alli [14] fizeram um estudo comparativo entre diversas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, e chegaram a resultados com velocidades iniciais de fermentação variando mais de 260% entre as cepas. Portanto, ao se comparar processos deve-se ter em mente, exata e precisamente, o micro organismo utilizado, se não comparações não terão muito sentido.

1.7.2- Reatores com células livres:

Existem diversas configurações de reatores operando com células vivas livres. Em batelada usando reatores tanque, temos a atual produção de álcool pelo processo Melle-Binot. E em reatores tanque contínuos, com reciclo direto de células, o que os permite trabalhar com altas concentrações destas, e com separação contínua do produto por membranas, ou filtros. E em torre, por elutriação, ou leito fluidizado.

Atkinson *et alli* [69] descrevem colunas de elutriação onde flocos de células estão em permanente queda contra o fluxo; exibem boa produtividade na fabricação de cervejas, que tem baixa graduação alcoólica. Para produzir álcool combustível onde o teor é mais elevado e a inibição pelo produto muito mais expressiva, o tamanho poderia tornar-se anti-econômico. Uma foto de uma torre de fermentação de uma cervejaria pode ser vista na figura 1.7.2.a.

A outra linha de conceito sobre a qual por ser promissora se faz muita pesquisa, são os reatores contínuos com reciclo direto e alta densidade de células. São reatores tanque agitado onde se alimenta uma solução bastante concentrada de açúcares e cujo conteúdo é constantemente bombeado a uma unidade anexa que faz a separação do álcool.

Por ser uma nova tecnologia, e não haver dados do comportamento em função da temperatura, problema não só deste ramo da fermentação, pois grande parte dos estudos são feitos em regimes isotérmicos, Sá-Correia *et alli* [32], Leão *et alli* [33], e Thatipamala *et alli* [34], desenvolveram estudos envolvendo viabilidade celular em função da concentração de álcoois e da temperatura, como já foi citado.

De Carvalho [9] desenvolveu um estudo em CSTR com reciclo de células para avaliar a viabilidade ao longo do tempo de uma população de células nesta configuração, no intervalo de temperatura entre 28°C e 37°C. Foi usado um reator com 2.8 L de volume útil, equipado com uma bomba nemo com um motor de 1,5 Hp, o qual circulava 850 L/h, ou seja, passava 303 vezes por hora todo o volume do reator pelo filtro. Foi obtida a produtividade de $2,97 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, e rendimento 0,369, 72% do teórico.

O baixo desempenho foi atribuído a sólidos particulados retidos no sistema e a substâncias inibidoras não removidas pelo sistema de filtro. Por melhor que seja o sistema nemo de bombeamento, um reciclo de 303 vezes por hora deve causar perdas por cisalhamento de células elevadas, e segundo Leão *et alli* [33] se o filtro não eliminou álcoois superiores, estes podem ter causado o efeito de inibição responsável pela baixa produtividade e rendimento.

Após operar por 1500 horas, foram levantados dados para este sistema com esta cepa de células; que expressam a relação entre células viáveis e mortas em função do tempo de funcionamento.

$$\ln(Nv/Nd) = [A1e^{(E1/RT)} \cdot e^{-Kd \cdot P}] \cdot t$$

P = concentração de álcool
 A1 = -9,00227
 E1 = 39667
 Kd = 0.07425

De Siqueira Filho [8] desenvolveu um estudo em equipamento idêntico porém com o objetivo de relacionar a velocidade de crescimento de células neste regime com a temperatura, e concentrações de produto e substrato

$$\mu = \mu_{\max} \cdot S/(S + Ks) \cdot (1 - P/Pm)^n \cdot (1 - X/Xm)^m$$

Ks = fator de inibição pelo substrato
 m = 2 n = 4
 Pm = -9,8973 \cdot T + 403.65
 Xm = 63,8 g/L

Cysewsky *et alli* [37] desenvolveram um estudo em um sistema análogo, porém faziam a extração a vácuo do álcool, e provavelmente não só o etanol, uma vez que usavam a pressão de 50 mmHg para operar o sistema, e sim todos os voláteis que segundo as ref [32], [33], e [34] prejudicam as células. Cysewsky *et alli* [27] também escreveram um estudo detalhado sobre o efeito de traços de O₂ sobre o desempenho e a viabilidade de células e aplicaram estes conhecimentos neste atual estudo, com resultados mostrados na tabela 1.7.2.a. O processo elimina o que é tido como o maior inibidor em sistemas fermentativos, o produto com alta concentração, no entanto o próprio autor salienta que os custos de se bombear o CO₂ produzido contra a atmosfera são proibitivos e levam à inviabilidade.

Tabela 1.7.2.a – Comparação entre produtividades obtidas por técnicas com células livres.

Melle-Binot	Até 5,0 g.L ⁻¹ .h ⁻¹
De Carvalho [9]	2,97 g.L ⁻¹ .h ⁻¹
Cysewsky [37] atmosférico + reciclo	29,0 g.L ⁻¹ .h ⁻¹
Cysewsky [37] vácuo 50 mmHg	40,0 g.L ⁻¹ .h ⁻¹
Cysewsky [37] Vácuo + reciclo	80,0 g.L ⁻¹ .h ⁻¹

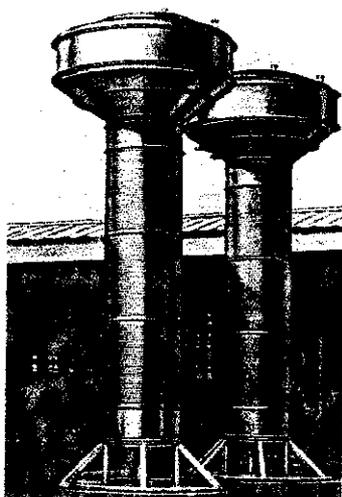


Figura 1.7.2.a- Torres de fermentação por elutriação de leveduras flocculantes, de Atkinson [69].

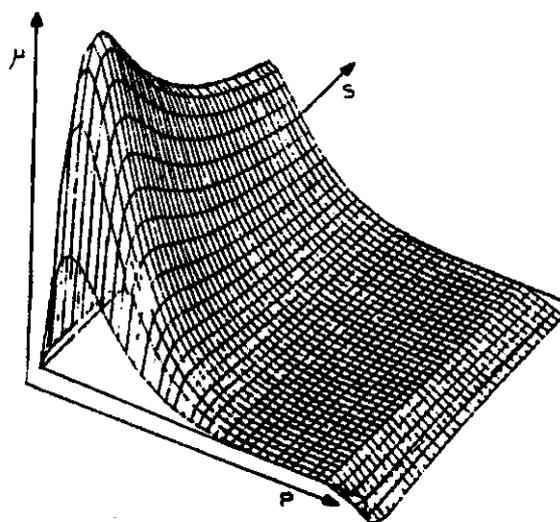


Figura 1.7.2.b- Resposta da velocidade de crescimento celular em função do Produto e do substrato, de Dourado *et alli* [70].

Em sistemas com células livres, o número total destas bem como sua fração de viabilidade são uma das chaves da produtividade. O conhecimento da vida média das células segundo Jarzebski *et alli* [71] é de fundamental importância para que se possa projetar uma purga adequada para o sistema, recurso pelo qual o índice de viabilidade se recomporá. Eles relatam que após colocar o sistema em regime estacionário há um declínio na produtividade, resultado das primeiras baixas. No entanto, ao se fazer a purga, permite-se que haja uma recomposição dinâmica do número de células viáveis em serviço. Existe o fator de inibição do crescimento pela concentração celular.

Para sistemas com células vivas a reprodução é fundamental para manter o índice de viabilidade, e esta operação consome recursos do substrato e perda de produtividade durante a fase de divisão.

1.7.3- Vantagens e Desvantagens de Células Imobilizadas

Quando comparamos as células de *Saccharomyces cerevisiae* livres com as imobilizadas, podemos distinguir dois processos competindo simultaneamente, comandados por fatores externos, ou induzidos, como oxigenação, substrato, inibição pelo produto, temperatura, teores de sais minerais, vitaminas, amino ácidos, hormônios, oligo elementos, etc. São a fermentação alcoólica e o crescimento para a reprodução.

Quando as células são imobilizadas, verifica-se na maioria dos casos uma redução se não um completo cessar na sua atividade de crescimento e reprodutiva. Isso sem dúvida torna seu metabolismo mais disponível para a fermentação, um argumento para se entender o aumento verificado na atividade fermentativa. Por outro lado, uma célula aprisionada tentando gerar energia pela sua via fermentativa contra uma dificuldade maior imposta pelo método de imobilização ao seu crescimento, também estaria produzindo mais.

De um modo geral, células imobilizadas tendem a produzir mais e reproduzir menos. Isso leva a melhores rendimentos de substrato e maiores produtividades. Quando elas são imobilizadas se tornam entidades muito maiores, o que as confere propriedades de alto interesse, como facilidade em serem separadas do meio de reação, ou formar um leito fixo, por onde passem os reagentes saindo produtos, excluindo-se assim etapas industriais de separação, e conseguindo uma óbvia redução de custos.

No entanto, estas células estão imobilizadas, e sua reposição significa a troca do imobilizante, o que sai mais caro que apenas células, e isso nos leva a uma análise do chamado microambiente da célula.

Será que ela tem tudo o que precisa para trabalhar, por quanto tempo? As células livres dispõem de capacidades diferentes conforme a cepa, e quando são imobilizadas também, um trabalho comparativo feito com imobilizações sobre crisotila por Wendhausen *et alli* [14] é mostrado na tabela 1.7.3.a.

Tabela 1.7.3.a- Comparação entre desempenho de células imobilizadas em crisotila:

Linhagem	Velocidade. Inicial g CO ₂ /(g células.h)	Conversão máxima %	Relação entre Velocidades
Comercial imob.	0,05	87,7	1,0
CCT0762	0,13	80,4	2,6
CCT0290	0,1	81,8	2,0
CCT3174	0,09	96,3	1,8
CCT0472	0,08	96,3	1,6
CCT0294	0,08	91,8	1,6
FEA01	0,08	97,3	1,6
CCT0292	0,07	96	1,4

As técnicas de imobilização de células são muito promissoras. Imobilizadas elas produzem mais rápido e com maior rendimento, mas é necessário que cada porção do reator tenha um microambiente adequado, e que este tenha um sistema de distribuição de reagentes e de remoção de produtos, dejetos celulares e calor também muito bom, pois estas células estão trabalhando em regime de sobrecarga, e têm que viver muito mais que as livres, pois não são facilmente substituíveis. Analisando todos estes fatores, vemos que sistemas imobilizados são potencialmente mais lucrativos, mas que necessitam de mais conhecimento e tecnologia.

1.7.4- Reatores com Células Imobilizadas.

As fermentações imobilizadas têm em geral um custo, por enquanto, ainda maior que as livres. Muito trabalho em pesquisa é feito no intuito de identificar problemas, propor soluções e testá-las. Para produtos com valor agregado alto ou processados por micro organismos caros ou delicados, as técnicas de imobilização são compensadoras, mas grande esforço tem sido feito para aplicar os benefícios das imobilizações em velocidade, rendimento, e simplificação de processo na produção de álcool combustível, que é um produto de baixo valor agregado, no qual cerca de 70% do custo do produto vem da matéria prima.

Diversos autores fazem estudos comparativos entre a eficiência de diversas técnicas de imobilização e as mesmas leveduras livres, sendo que outros trabalham para melhorar a condições operacionais.

Existe uma discussão em torno do modo como se calcula a produtividade. Alguns autores consideram o volume total do reator, outros o volume de líquido dentro durante a fermentação, e um terceiro grupo, considera o volume de sólidos responsáveis pela reação. Vários não mencionam como foi feito. Estes três modos levam a valores muito diferentes, sendo aconselhável descrever o método ao se mostrar um valor.

Ryu *et alli* [72] desenvolveram um trabalho em torno das limitações impostas à etapa cinética pelas etapas difusivas em leitos de esferas de alginato em função do diâmetro, entre 1,0 e 3,7 mm. Dentre os problemas de transporte, concluíram que, quanto menor a esfera menos as difusões internas irão atrapalhar, e que para velocidades superficiais acima de 1,2 cm/s os problemas de transporte externo se tornam desprezíveis. Este é o efeito típico que caracteriza as imobilizações oclusivas, enquanto ajudam a formar uma macroestrutura, criam problemas limitantes de transporte.

Williams *et alli* [73] desenvolveram um trabalho comparativo entre leveduras livres e imobilizadas em esferas de 3mm de alginato de cálcio. Na comparação da atividade versus pH, viram que a célula livre tinha um pico de desempenho em pH = 4,5 enquanto o sistema imobilizado trabalhava sem alterações de pH = 3,0 até 7,5. Quanto à temperatura, as livres sobreviviam fermentando, porém sem se reproduzir até 42°C, enquanto as imobilizadas só fermentavam até 30°C, o que denuncia problemas de transporte de calor na esfera. Quanto à produtividade, os dados são relativos ao sistema imobilizado, e a máxima produtividade foi $P = 53.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ com quase 50% de perda de glicose, a máxima conversão foi 96% do limite teórico com $P = 12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, sendo que o sistema se manteve estável operando a 30°C, por 44 dias.

Chang *et alli* [68], utilizando uma levedura modificada geneticamente para produzir mais invertase, e encapsulando junto no alginato mais invertase e um surfactante Twen-20 da Waco, para ajudar a saída do CO₂, obtiveram resultados destacados. Sem vazamentos detectados de células conseguiram uma produtividade de $P = 48,8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ com conversão de 95% do limite teórico. Parece bom, mais não se sabe o diâmetro das esferas nem a base de cálculo da produtividade. Mas pela melhora,

da para perceber o quanto as barreiras difusionais atrapalham o transporte da sacarose e a ação da invertase.

Watanabe et alli [74] utilizando *Saccharomyces cerevisiae* kyokay 7, em alginato num reator semi batelada acoplado a um modulo de fibras ocas com poros de $1\mu\text{m}$ para filtragem produziram um Sake com 14% p/p etanol, a uma produtividade de $P = 3,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, nove vezes maior que o processo original de produção da bebida. Nesta caso, a barreira difusional ajudou as células a suportarem melhor e serem assim menos inibidas pelo o álcool.

Gòdia et alli [75] desenvolveram um trabalho com células imobilizadas em carragena com diâmetro de 3.5 mm, $\text{pH} = 4.0$, e $T = 30^\circ\text{C}$, onde a máxima conversão foi 100% do limite teórico com $P = 17,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. A máxima produtividade foi $P = 21.83 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ com conversão de 52.5% do limite teórico. Especifica que as produtividades foram calculadas em função do volume do reator, e taxas de diluição em função do volume de líquidos dentro do reator.

Os problemas de transporte causados pelo CO_2 são sérios, afetam a produtividade e a viabilidade ao longo do tempo, e a taxa de conversão ao alterarem o perfil do escoamento nos leitos fixos. Hamamci et alli [12] desenvolveram o conceito de "Traped Colum", para minorar os transtornos dos causados pelos gases. Trata-se de uma coluna em que o diâmetro acompanha o volume do elemento de reação, alargando conforme vai progredindo. Foi elaborado um estudo com colunas feitas com células imobilizadas em esferas de K-carragena de 3.7 mm de diâmetro, onde se obteve a máxima produtividade de $60 \text{ g etanol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, a qual funcionou por 3 meses. A técnica melhorou muito o escoamento de líquidos e gases, reduzindo os desvios do comportamento ideal de escoamento pistão.

Roca et alli [11] desenvolveram um sistema onde se pulsa o escoamento, visando forçar o gás a se soltar e a subir e reduzir a espessura da camada limite durante a oscilação, contribuindo para a redução da resistência difusiva global. Foi construída uma coluna de células imobilizadas em alginato, a qual passou por um tratamento por 5 min com $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 0,3 M para endurecer as esferas com diâmetro de 2mm. A perda de viabilidade foi reduzida em 27%, e houve um aumento de até 20% na produtividade.

Kana et alli [65] desenvolveram um estudo com o chamado Kissiris mineral, uma pedra porosa comum na Grécia e regiões vulcânicas, este já é um suporte expositivo, para fermentar extrato de passas. Obteve uma produtividade $P = 4.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ o dobro do conseguido pelo processo convencional.

Ogbona et alli [64] desenvolveram um estudo sobre *Loofa cylindrica* como suporte, expositivo, e obtiveram resultados muito bons no que diz respeito à durabilidade; no entanto a configuração de reator que usou levou a uma baixa produtividade $P = 7,08 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Tyagi et alli [76] publicaram um estudo que mantém em segredo o nome do suporte mas este consegue imobilizar em sua superfície $0,132 \text{ gcel./gsup}$, que a 30°C obteve uma produtividade máxima de $28,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ com um rendimento 96% do teórico. O crescimento das células é 32% do normal e a viabilidade se manteve acima de 92% por 32 dias.

Ghose et alli [77], um associado de Tyagi, fez o acompanhamento térmico desta coluna e com 8 pontos distribuídos ao longo do comprimento próximos ao centro, documentou uma elevação de temperatura de 24°C na entrada para 29°C na saída.

Bandyopadhyay et alli [78], outro associado de Tyagi, fez um estudo microbiológico das leveduras imobilizadas nos suportes dos estudos anteriores, constata que seus suportes assim como os de vidro poroso, e vidro poroso tratado com

glutaraldeído soltam células brotadas das imobilizadas, sendo estas mais rápidas e sincronizadas. Há também uma redução no consumo de O₂ e na produção de CO₂.

Tyagi et alli [66] relatam um trabalho feito com bagaço de cana tratado com hexametildiamina usado como suporte onde para uma densidade de 50 g célula /litro de reator, e uma relação altura/diâmetro de 2.5, consegue uma produtividade de 31,8 g .L⁻¹.h⁻¹ com um rendimento 0,482 94% do máximo teórico.

1.7.5- O Reator de Eficiência Orgânica:

Como podemos observar com farta amostragem na natureza, existem muitos exemplos de sistemas onde células trabalham juntas, sintonizadas em máxima eficiência, a Eficiência Orgânica, em que todas juntas lutam por sobreviver e reproduzir-se, na forma de um ser.

Ao estudar algum atlas de anatomia e histologia, vemos que os órgãos que compõem um ser são compostos de tecidos, e estes por diferentes células, cada uma com sua função, de modo que o micro ambiente de cada uma seja suficiente. Se algum dia nossa humilde engenharia conseguir construir uma montagem onde todas as células recebem o necessário, elas operarão em seu ponto máximo de eficiência, e esta montagem será um Reator de Eficiência Orgânica.

Para explicar melhor o conceito temos na figura 1.7.5.a, um órgão que é tido como um prodígio da engenharia natural, um pulmão, na vista externa, e aberto, onde se vê as conexões de entrada e saída se ramificando para atingir o micro mundo das células, Sobotta [79]. Na figura 1.7.5.b, temos cortes em microscópio de um bronquíolo terminando em um saco alveolar, e um saco alveolar cortado e ampliado, onde se vê micro capilares suprindo as células especializadas em fazer a troca gasosa, Gartner /Hiat [80]. Estas seriam nossas leveduras.

Fazendo um cálculo supondo condições ideais, ou orgânicas, se tivéssemos em um reator de um litro, com um núcleo de 1 kg com 10% de crisotila, ou seja 100g da fibra ativada, imobilizariamos sem problemas 100 g células, as quais segundo Aboutbul et alli [35] têm a velocidade inicial ou máxima de 2,3 g etanol /g célula.h, um fermento de pão comum; desprezando-se as inibições por produto e substrato, assumindo a oxigenação ideal de Cysewsky [27] , e admitindo que o CO₂ saia sem causar nenhum problema por outro caminho, teríamos uma produtividade P de:

$$P = 100 \text{ g cel. / Litro} * 2,3 \text{ g etanol / g cel.hora} = 230 \text{ g etanol/ Litro.hora}$$

Se usássemos a linhagem CTT0762, que tem a velocidade inicial segundo Wendhauser *et alli* [14] , 2.6 vezes maior que o fermento de pão comum, teríamos:

$$P = 230 \text{ g etanol/ Litro.hora} * 2,6 = 460 \text{ g etanol/ Litro.hora.}$$

Este seria um reator de eficiência orgânica, ou seja, um órgão de fermentação.

1.8- O Efeito Térmico:

Para cada 4 mol de etanol formado, ou 4 * 46g , há um $\Delta H^{\circ}r = -31,4 \text{ Kcal/mol.}$, o qual segundo o cálculo para o reator acima nos daria um fluxo de calor Q^o de:

$$Q^{\circ} = 460 \text{ g etanol/Litro.hora} * \text{mol}/184 \text{ g} * (-31,4 \text{ Kcal/mol}) = -78,5 \text{ Kcal / Litro.hora}$$

Uma vazão de calor difícil de ser removida, principalmente porque os limites na temperatura de operação do reator são estreitos, se a temperatura abaixa em uma região

forçada pela refrigeração o rendimento cai bastante, se ela aumenta, pode matar por desnaturação. Ainda estamos muito longe desta eficiência de reator, mas o problema térmico existe e já é suficiente para causar danos, vide D'Amore et alli [30], onde descreve problemas causados pelo calor, e proporção do custo de fermentação com remoção de calor, para dornas simples.

Ghose *et alli* [77] monitorou o perfil térmico de uma coluna com produtividade $P=28,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e encontrou uma variação ao longo do eixo de 24°C na entrada para 29°C na saída, isso porque sua coluna era termostatizada.

1.8.1- Inibição do crescimento e Morte Celular:

Segundo Sá-Correia *et alli* [32], Leão *et alli* [33], Thatipamala *et alli* [34], e outros, existe uma faixa de temperatura alta em que as células fermentam bastante mas não mais se reproduzem. Esta é a faixa de operação que interessa aos reatores imobilizados com crisotila, mas há a necessidade de se ver o que acontece dentro do reator em termos de distribuição de temperaturas, pois enquanto uma parte trabalha, outra pode estar morrendo, já que em temperaturas mais altas as células ficam mais sensíveis.

Nesta faixa de operação teríamos uma minimização das perdas de substrato para massa celular.

1.8.2- O Ponto de Operação:

É o ponto onde se obtém uma boa conversão, pois cerca de 70% do custo provem da matéria prima, com as maiores produtividade e estabilidade possíveis, e com o mínimo de refrigeração possível, pois cerca de 30% do custo da fermentação é com refrigeração.

1.9- Teoria Aplicada ao Sistema de Acompanhamento da Temperatura:

Os sensores utilizados no sistema são diodos de silício que, pelo seu pequeno tamanho, interferem menos no escoamento, sendo que a variação na sua tensão de limiar a uma polarização constante em função da temperatura, que é um defeito do componente real, é a propriedade medida por estes termômetros eletrônicos. A figura 1.9.1.a- traz um gráfico de como se comportam as tensões de limiar em função da temperatura segundo Dulim [81], e Millman & Halkias [82].

Os termômetros eletrônicos são descritos na figura 1.9.1.b, e o cálculo dos componentes de seus blocos pode ser feito seguindo a teoria abordada por Pertence [83], e parte de sua arquitetura por Kolvoda [84].

A conversão de dados analógicos em digitais foi feita utilizando-se dois circuitos integrados ADC0808 [85], para 8 entradas cada, uma vez que temos 15 pontos amostrais.

A coordenação do interfaceamento entre o microcomputador e os conversores A/D foi feita com o circuito integrado 8255 [86], e com eletrônica digital periférica descrita por Iodeta *et alli* [87], a arquitetura da interface foi inicialmente fornecida por Malcome-Lawes [88], mas posteriormente foi aperfeiçoada e simplificada visando adequá-la melhor a este caso.

Os programas para aquisição de dados, bem como aqueles para leitura, análise, e busca no banco de dados gerados foram escritos em Qbasic, para os quais o livro de Cooper [89] foi de vital importância.

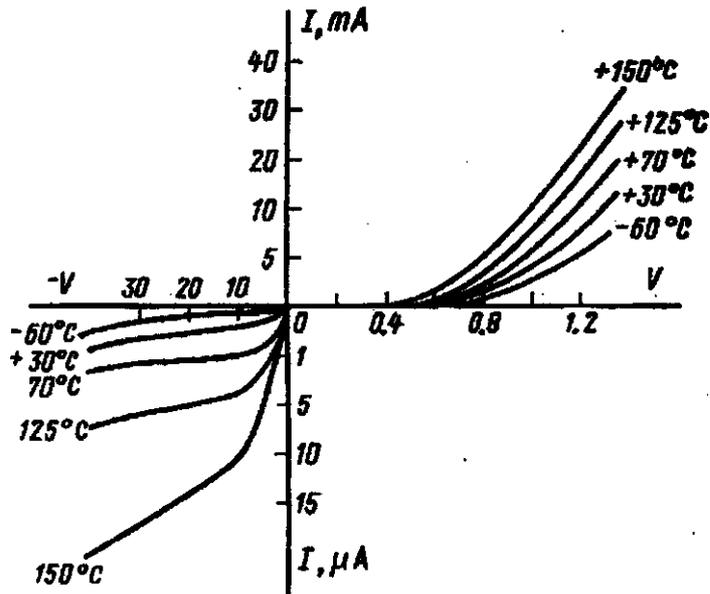


Figura 1.8.a - Influência da temperatura sobre a tensão de limiar em um diodo PN de silício, Dulin [81].

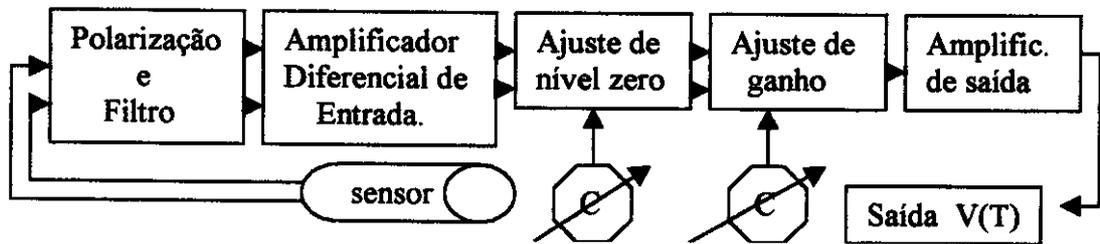


Figura 1.8.b- Diagrama em blocos da lógica do circuito de um termômetro eletrônico desenvolvido pelo autor para este trabalho. O sensor é um diodo PN de silício.

1.10- Considerações:

Dale et alli [90] fizeram em seu trabalho uma comparação entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces fragilis*, concluindo que a primeira tolera mais álcool, e a segunda mais calor, mas o mais importante no projeto de um reator é saber tirar proveito das propriedades que se tem à mão. Uma pequena reprodução celular para repor as células que acabaram é uma boa estratégia, se o sistema de imobilização e as condições operacionais a permitirem. Outro ponto de consenso entre vários autores aqui mostrados é que os álcoois produzidos devem ser removidos o mais breve possível, ou então deve haver

uma intercambiação entre partes ou estágios do reator de modo que as células das partes mais prejudicadas pela exposição possam se recuperar.

Outro problema que ajuda o teor alcoólico a se tornar grave é a temperatura, pois é de interesse da produção uma maior produtividade, e esta ocorre em temperaturas mais elevadas fazendo com que as células fiquem mais sensíveis, daí a ênfase neste trabalho em monitorar perfis térmicos dentro e durante a reação de fermentação no reator.

Uma vantagem dos suportes imobilizadores oclusivos é uma certa proteção da cultura contra contaminações, problema grave para sistemas em batelada convencional conforma salienta Oliveira [91]. No entanto, a crisotila ativada, apesar de manter a superfície das células expostas, tem mostrado que este sistema é anormalmente estável, com durabilidade e resistência ao apodrecimento ainda incomparáveis.

1.11- Objetivo:

Este trabalho tem como objetivos:

Desenvolver e testar a oxidação de álcoois e estabilidade em fase gasosa de leitos fixos a base de crisotila ativada imobilizando óxido de manganês e óxido de titânio separadamente em duas séries de experimentos.

Desenvolver leitos fixos para a fermentação alcoólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em crisotila ativada e estudar efeitos térmicos bem como levantar as curvas de produtividade em função das variáveis, do teor de inertes, da temperatura de operação, da vazão de alimentação, e da concentração de sacarose na alimentação.

II- EXPERIMENTAL

2.1- Materiais

2.1.1- Crisotila

Em todos os experimentos deste trabalho foi utilizada a crisotila brasileira do tipo 5RL, (CB 5RL) proveniente da mina Cana Brava-Minaçu Goiás, cedida pela SAMA, Mineração de Amianto Ltda.

A classificação da crisotila comercializada pela SAMA segue o Padrão de Classificação Canadense, que é baseado em ensaios granulométricos realizados em uma máquina classificadora chamada Quebec Standart Testing Machine. Da massa inicial recebida de crisotila 5RL assim como da SAMA, cerca de 38% é constituída por resíduos de rocha e de pó de fibras, sendo outra impureza comumente presente os óxidos de ferro, na proporção de 2,2 mg/g de crisotila , Parizotto [2].

A área superficial específica da crisotila 5RL "in natura", obtida por adsorção BET de nitrogênio , é de 13,9 m²/g , Giongo [3].

Toda a crisotila utilizada neste trabalho, cerca de 1kg, foi tratada pelo processo de ativação Patentado, em que alíquotas de cerca de 15g de cada vez, foram lavadas com jato de água em peneiras Tyler 250, resultando em cerca de 10g, em base seca, cada alíquota foi colocada em um Bequer de 900mL, contendo solução equimolar $3,3 \cdot 10^{-2}$ M ácido acético, e acetato de sódio, e colocada em um banho com ultra som de 25 khz durante 20 minutos. Após a sonicação, as alíquotas foram novamente lavadas em peneira Tyler 250, secas em estufa e guardadas até a ocasião do seu uso , Parizotto [1].

2.1.2- TiO₂

Foi utilizado da marca Aldrich, com área superficial estimada em 10 m²/g por adsorção (BET) de N₂ , Giongo [3].

2.1.3- MnO₂

Foi utilizado MnO₂ marca Riedel-Haen , 92% com impurezas SiO₂ 3%, Fe 0,3%, HCl insolúvel 3,6% passados por peneira Tyler 150, 250, 325, e 400. O diâmetro final das partículas separadas ficou entre 38 e 45 microns. Esta fração do óxido é do tipo gama-MnO₂, segundo difratogramas de Raio-X, e possui área superficial de 53 m², segundo adsorção (BET) de N₂ Zucchetti [1].

2.1.4- Reagentes

Metanol	PA Nuclear	Formaldeído
Etanol	PA Nuclear	Etanaldeído
i-Propanol	reciclado da planta piloto do instituto	Propionaldeído
n-Propanol	reciclado da planta piloto do instituto	Propanona
n-Butanol	PA Nuclear	Butiraldeído
2-Butanol	PA Nuclear	Metil-etil-cetona
ciclo-Hexanol	PA Nuclear	

A fonte de sacarose utilizada foi o açúcar refinado de cana marca União.

2.1.5- Leveduras

Foram utilizados fermentos em tabletes e liofilizados da marca Fleischman Royal, e liofilizados marca Oetker, todos de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

2.1.6- Solução nutriente

Todos os ensaios tiveram a solução nutriente padronizada como sendo composta por 10% m/v sacarose, uréia, fosfato básico de potássio, e pH ajustado em 5 com ácido sulfúrico.

Em um frasco de 4L, coloca-se 350g de sacarose (10% m/v), 5,2g de uréia, 9,1 g de KH_2PO_4 , completa-se com água destilada, e ajusta-se o pH entre 5.0 e 5.5 com H_2SO_4 , nas soluções multiplas, 5%, 15%, 7.5%, 2.5%, e 20%. Foi ajustada e alterada apenas a quantidade de sacarose. Exemplo, a solução 5% leva 175g de sacarose.

2.1.7- Fibra de vidro picada

Fibra de vidro comercial tipo Rooving picada, pronta para uso.

2.2- Equipamentos (obs. Itens feitos sob encomenda foram custeados pelo aluno)

Banho termostático Techné modelo Tempunit.

Agitadores mecânicos com aquecimento Fanen.

Bomba peristáltica regulável Milan.

Bomba peristáltica fixa.

Polarímetro LEP A2 Zeiss.

Cromatógrafo a gás CG, H_2 , coluna carbowax com polietilenoglicol.

Espectro fotômetro FT-IR Perkin Elmer 16PC.

Peneiras Tyler 250, 400.

Microcomputador 286 com winchester de 50Mb , drive 31/2"

Nobreak modelo SMS 700.

Microdestilador com banho termostático.

Refratômetro Zeiss.

Banho ultrasonico Thornton B12 25Khz.

Balança analítica Bosch S2000.

Balança digital semi-precisão.

Centrifuga Fanen.

Placa de interfaceamento para PC.(sob encomenda)

15 termômetros eletrônicos multi-escala.(sob encomenda)

Fonte de alimentação estabilizada com +12v, +5v, 0v,-12V.(sob encomenda)

Regulador de ciclo de operação para bombas peristálticas fixas.(sob encom.)

Serpentina 1,5m em inox trocadora de calor Wellcome.(sob encomenda)

Cuba para banho termostático 10L.

3 garrações de 4L, 1 gerrafão se 9L.

Reator feito sob medida e mostrado na fig 2.2.1

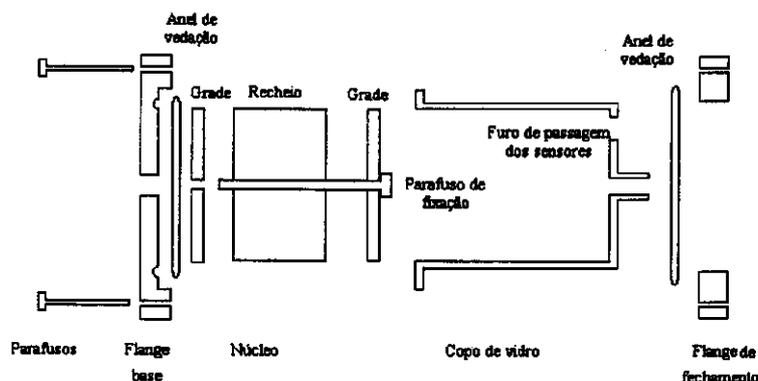


Figura 2.2.1: Vista explodida em corte do reator utilizado, diâmetro interno 7 cm, comprimento máximo ajustável até 20 cm.

2.3- Estudo de Oxidação de Álcoois

Tendo em vista a natureza dos possíveis produtos, foi necessário desenvolver uma montagem experimental apta a condensar as substâncias mais voláteis, sem deixar de se poder monitorar a perda de carga ao longo do leito do reator.

2.3.1- Montagem utilizada

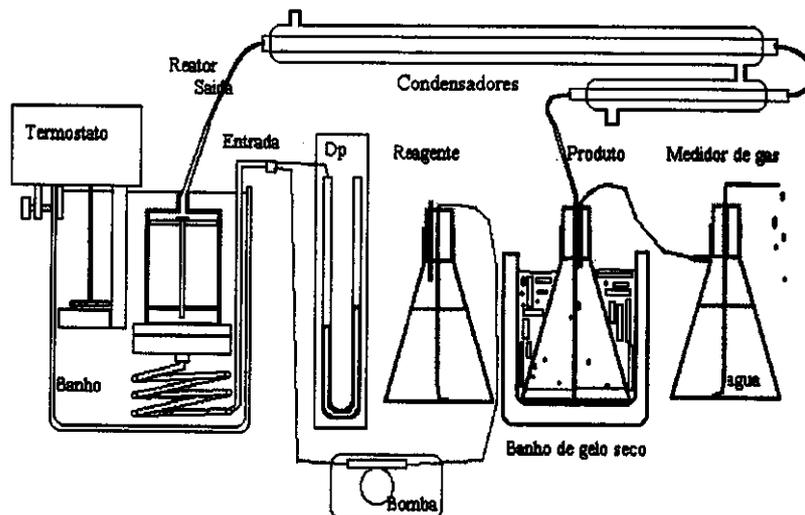


Figura 2.3.a- Montagem utilizada para os ensaios de tentativa de oxidação de álcoois.

Foi feita a montagem descrita na figura 2.3.a, em que a bomba peristáltica puxa do Elemyer de reagentes o álcool a ser testado, bombeia pela serpentina de inox que atua como evaporador fazendo-os passar pelo núcleo do reator como vapor aquecido na temperatura garantida pelo banho termostático.

Há uma tomada de pressão na entrada da serpentina, através da qual é medida a perda de carga exercida pelo núcleo contra a passagem do vapor.

Após percorrer o reator, o vapor passa por dois condensadores em série, para que se condense e pré resfrie o produto que será borbilhado em outro Elemyer que fica dentro de um banho de gelo seco e álcool, -78°C , o que nos garante a recuperação de qualquer um dos possíveis voláteis como produtos.

Um último frasco fazia o papel de medidor de gases, e selo hidráulico de baixa pressão caso aparecesse algum produto gasoso não condensável pelo banho criogênico, ou alguma oscilação do sistema.

2.3.2- Preparação dos núcleos

Foram testados dois tipos de núcleos, um com MnO_2 , e outro com TiO_2 .

Para o núcleo com MnO_2 , foram colocados 7.2 g de crisotila ativada pelo processo descrito na seção 2.1.1 saturadas com o óxido descrito na seção 2.1.3, e 100 g de fibra de vidro picada como a descrita na seção 2.1.9, formando um núcleo com 6.4% de massa ativa.

Para o núcleo com TiO_2 , foram colocadas 7.2 g de crisotila ativada pelo processo descrito na seção 2.1.1, saturadas com a mistura de óxidos de titânio descrita na seção 2.1.2 e 100 g de fibra de vidro picada descrita na seção 2.1.9, formando um núcleo de idêntica massa, e massa ativa, 6.4 %.

2.3.3- Experimento

A execução do ensaio foi fazer passar pelo sistema, alternados por uma lavagem

com ar comprimido, os álcoois, metanol, etanol, i-propanol, n-propanol, n-butanol, e 2-butanol, na mesma ordem, tanto para o núcleo de MnO_2 , como para o de TiO_2 .

Coloca-se o sistema nos seus equilíbrios térmicos, banho termostático, condensadores, e banho criogênico, e faz-se o bombeamento do reagente da vez.

Após o fluxo entrar em equilíbrio, marca-se a perda de carga desenvolvida, a qual permanece estável por alguns minutos durante o bombeamento.

O produto colhido é cromatografado no equipamento descrito na seção 2.2, nas condições: T injetor = $160^\circ C$, T coluna = $100^\circ C$, T detetor = $180^\circ C$, atenuação = 64, sendo que diversas amostras foram testadas em espectro fotômetro FT-IR.

2.4- Estudo de fermentações livres

A fermentação livre é a fonte de biomassa para se fazer depois as fermentações imobilizadas em crisotila. Por isso foram feitos dois ensaios exploratórios, variando-se a relação massa de inoculo/massa de substrato, visando observar a inibição do crescimento pelo substrato, o que acontece com os açúcares durante o processo, o crescimento em biomassa, e a vazão de CO_2 .

2.4.1- Montagem utilizada

O sistema composto por um Kitassato de 800 mL atua como fermentador, enquanto o gás carbônico produzido expulsa a água do garrafão de medição.

Marcando a hora no menisco da água no garrafão, fazemos o acompanhamento integral do CO_2 produzido, depois dividindo-se o volume entre marcações pelo tempo entre marcações, temos a taxa de produção média naquele intervalo.

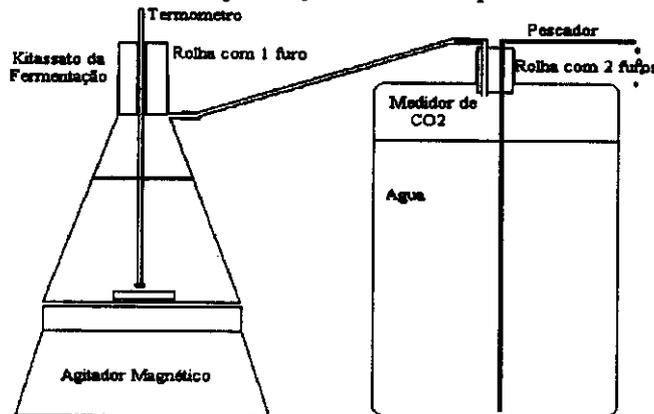


Figura 2.4.1- Montagem utilizada para estudo de fermentação livre.

2.4.2- Experimento

Os ensaios de fermentação livre 1, e 2, chamados EFL-1, e EFL-2, foram conduzidos em uma montagem descrita na figura 2.4.1.

Foi usado como inoculo, o fermento liofilizado a base de *Saccharomyces cerevisiae* da Fleischman Royal, disponível na época.

O ensaio EFL-1 durou 6 dias, e teve como condições iniciais, as abaixo:

- Volume inicial $V_0 = 850$ mL
- Massa inicial de sacarose $M_{osac.} = 200$ g $C_{o\ sac.} = 0,23$ g/mL (23% m/v)
- Massa inicial de células $M_{ocel.} = 10$ g $C_{o\ cel.} = 0,01$ g/mL (1% m/v)
- Temperatura ambiente $T = 26,5^\circ C$

A temperatura foi deixada livre, variando ao longo do experimento, sendo que a partida foi dada a $30^\circ C$.

Periodicamente alíquotas de 20 mL eram retiradas, divididas em duas e

centrifugadas a 3000 rpm por 3min, dando a concentração de células no momento, o sobrenadante ia para a análise de índice de polarização da luz, mostrando-nos como estavam os açúcares.

O ensaio EFL-2 durou pouco mais de 2 horas, e teve as seguintes condições iniciais:

- Volume inicial $V_0 = 475 \text{ mL}$
- Massa inicial de sacarose $M_{\text{sac.}} = 25\text{g}$ $C_{\text{o sac.}} = 0,05 \text{ g/mL}$ (5% m/v)
- Massa inicial de células $M_{\text{cel.}} = 25\text{g}$ $C_{\text{o cel.}} = 0,05 \text{ g/mL}$ (5% m/v)
- Temperatura ambiente $T = 26,5^\circ\text{C}$

A temperatura também foi deixada livre, variando ao longo do experimento, sendo que a partida foi dada em 30°C .

Neste ensaio não colhemos amostras, só foi acompanhada a produção de CO_2 .

2.5- Estudo de fermentação imobilizada com variação de temperatura, e monitoração da vazão de CO_2

Este primeiro estudo sobre fermentação em leito fixo à base de crisotila e fibra de vidro tendo células de levedura previamente imobilizadas, visa nos mostrar o tempo necessário para atingir o estado estacionário do reator, o tempo de maturação ou de desenvolvimento, e depois, como reage a produção de CO_2 frente a variações na temperatura de operação.

2.5.1-Montagem utilizada

Nesta montagem, a bomba peristáltica puxa de um frasco de 4L a solução nutriente, do item 2.1.7, e a bombeia pela serpentina trocadora de calor que vai garantir que a alimentação chegue ao reator na temperatura do banho.

A saída do reator esta conectada a um frasco de 4L que separa o produto líquido do gasoso, CO_2 . Há uma mangueira de compensação entre reagente e produto para compensar o volume líquido bombeado de um para o outro.

A outra saída do frasco separador de produtos está ligada à entrada de pressurização do frasco de 9L medidor de volume de CO_2 por volume deslocado de água, através do qual monitoramos a taxa de produção do gás.

Há um medidor de queda de pressão, manômetro em U com mercúrio ligado na entrada da serpentina, monitorando a queda de pressão no leito.

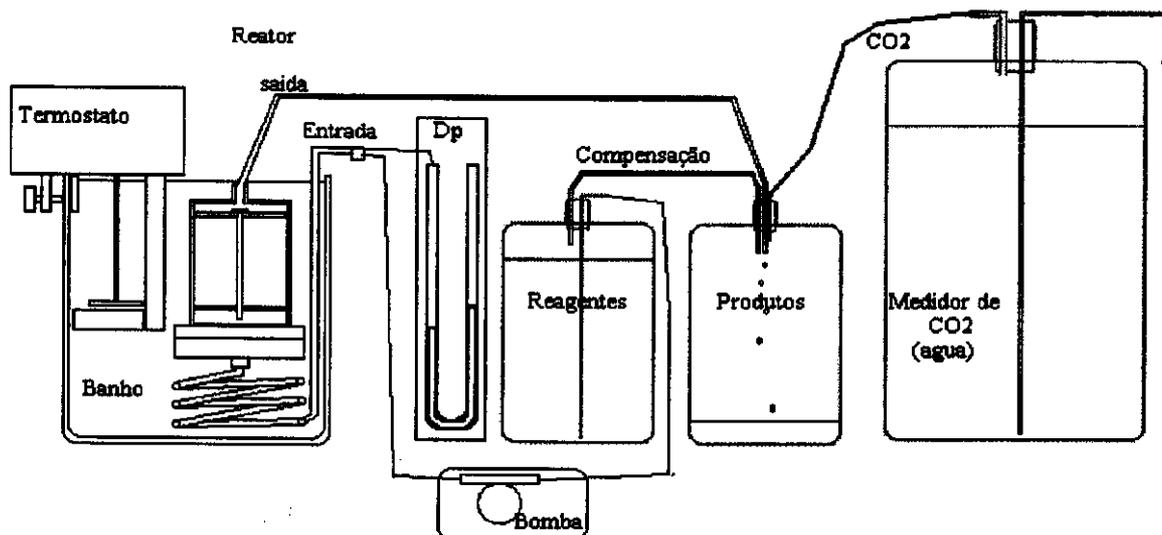


Figura 2.5.1: Montagem utilizada nos ensaios de fermentação com leveduras imobilizadas.

2.5.2- Preparação do núcleo do reator

Cultura de células:

Em um Bequer de 1 litro foram colocados:

900 ml de água destilada

150g de sacarose

7 g de fermento liofilizado Oetker

A temperatura foi ajustada em 35°C, antes de adicionar as células, e o conjunto permaneceu 24 horas em regime agitado leve e com temperatura controlada, provida por um agitador magnético com aquecedor.

Na tentativa de estabelecer um balanço de massa para se saber quanto de células está suportado sobre a crisotila, 10 g desta, previamente ativada, foram umedecidas, pesando então, 64,8 g.

A crisotila úmida foi adicionada à cultura de células, sob leve atuação do agitador magnético, onde permaneceu por 5 minutos, tempo suficiente para que se prendessem células para saturar as fibras de crisotila.

As fibras foram então filtradas, lavadas e drenadas a um estado de umidade parecido com o anterior, para que pudessem ser pesadas e comparadas.

Massa de crisotila úmida e com células	72,5 g
Massa de crisotila úmida	<u>64,8 g</u>
Diferença, massa de células	7,7 g

Temos então a seguinte composição deste núcleo, supondo a seco:

Massa de células	7,7 g
Massa de crisotila	10,0 g
Massa de fibra de vidro	<u>100,0 g</u>
Massa total	117,7 g

As fibras foram misturadas e colocadas diretamente sobre a grade do reator, de modo que se formou um arranjo espacial homogêneo, com alta porosidade, necessário ao escoamento do CO₂ produzido pela fermentação.

2.5.3-Experimento

Uma vez que o núcleo estava composto, o reator fechado e conectado, e o banho termostático a 31°C e em equilíbrio com o sistema, começamos a bombear a solução nutriente descrita no item 2.1.7.

A marcação da hora nos meniscos do nível da água nos vai dando dados parciais sobre a evolução do processo, e uma vez atingido o estado estacionário, iniciamos as variações de temperatura.

Mantendo sempre a mesma solução nutriente, inicialmente elevamos a temperatura para 35°C, 37°C, 40°C, 45°C, depois a temperatura foi baixada para 40°C, e 31°C, sempre marcando pontos no menisco da água, para comparar se há reprodutibilidade ou danos após operação em temperaturas elevadas.

2.6-Construção de um sistema computadorizado para monitoração em tempo real das temperaturas dentro do núcleo do reator.

Tendo em vista os resultados do experimento anterior, tornou-se imperativo saber o que acontece dentro do reator. Para tanto foi projetado e construído um sistema que, acoplado ao reator na montagem da figura 2.5.1, possa fazê-lo.

2.6.1- Descrição do sistema de aquisição de dados térmicos

Foi construído um sistema eletrônico para acompanhar os experimentos, fazendo medidas automaticamente das temperaturas em 14 pontos dentro do reator e do banho, bem como da evolução do CO₂ produzido pelas células, e guardá-las em arquivos organizados para que se possa estudar os efeitos térmicos ocorridos dentro do núcleo.

O posicionamento dos sensores e o sistema são descritos resumidamente na figura 2.6.1; nas figuras 2.6.2, 2.6.3, e 2.6.4 são mostradas as relações entre as variáveis e os gráficos.

Os termômetros eletrônicos são circuitos que medem a variação da tensão de limiar nos diodos usados como pontas de prova.

Cada ponta de prova tem um circuito independente que tem que ser calibrado.

No nosso caso escolhemos 25°C como sendo o nosso zero volt, e 45°C como sendo o topo, 4,95 volt. Então, todos os sensores foram zerados em 25°C, e alinhados em 45°C.

A placa de interfaceamento contém conversores analógico/digital, (A/D) de 8 bits, ou seja, que dividem em 256 pedaços as tensões entre 0 V, e 4,95 V. Sendo nosso ΔT de 20°C, temos uma resolução para este caso de $20^{\circ}\text{C} / 256 = 0.0781^{\circ}\text{C} / \text{bit}$.

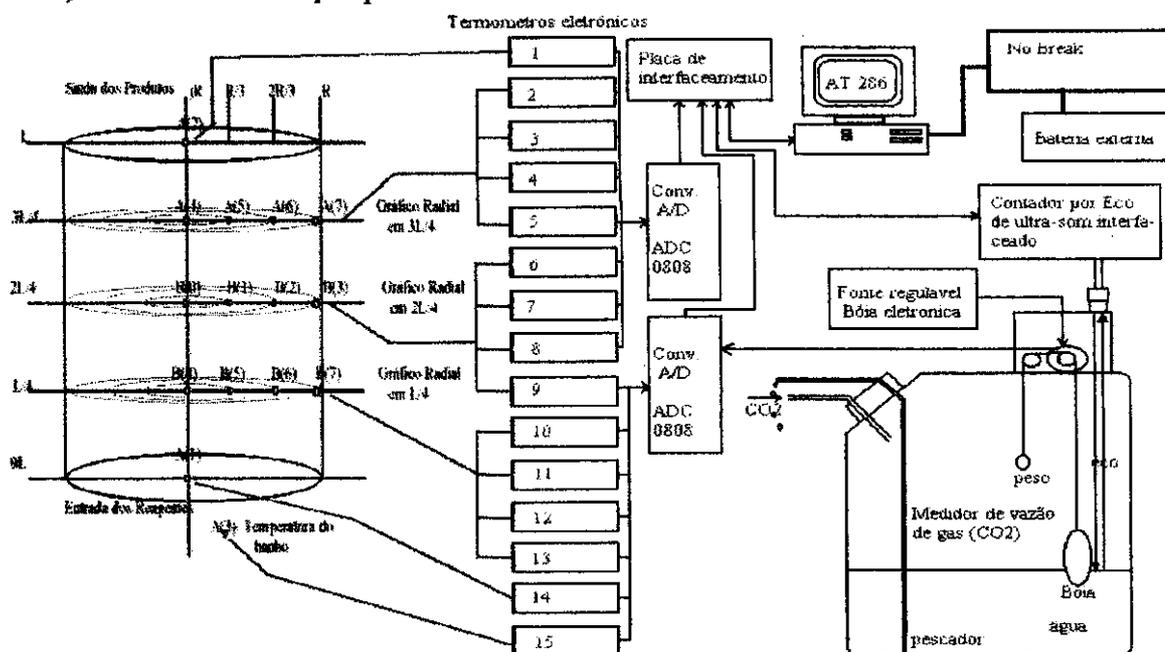


Figura 2.6.1: Posicionamento dos sensores térmicos dentro do volume de reação, núcleo, e descrição resumida do sistema de aquisição de dados computadorizado automático, utilizado para medir e gravar os efeitos térmicos ocorridos durante os ensaios, para estudos posteriores.

Como localizar os pontos nos Gráficos de perfis térmicos:

GRÁFICOS RADIAIS:

- Os sensores a(4), b(0), b(4), estão a 0,3 cm do eixo axial geométrico,
- os a(5), b(1), b(5), estão a 1,3 cm do eixo,
- os a(6), b(2), b(6), estão a 2,3 cm do eixo, e
- os a(7), b(3), b(7), estão a 3,3 cm do eixo, encostados na parede interna.

Os gráficos radiais têm no extremo externo, à direita, o ponto dado pela variável a(3), temperatura do banho termostatizado.

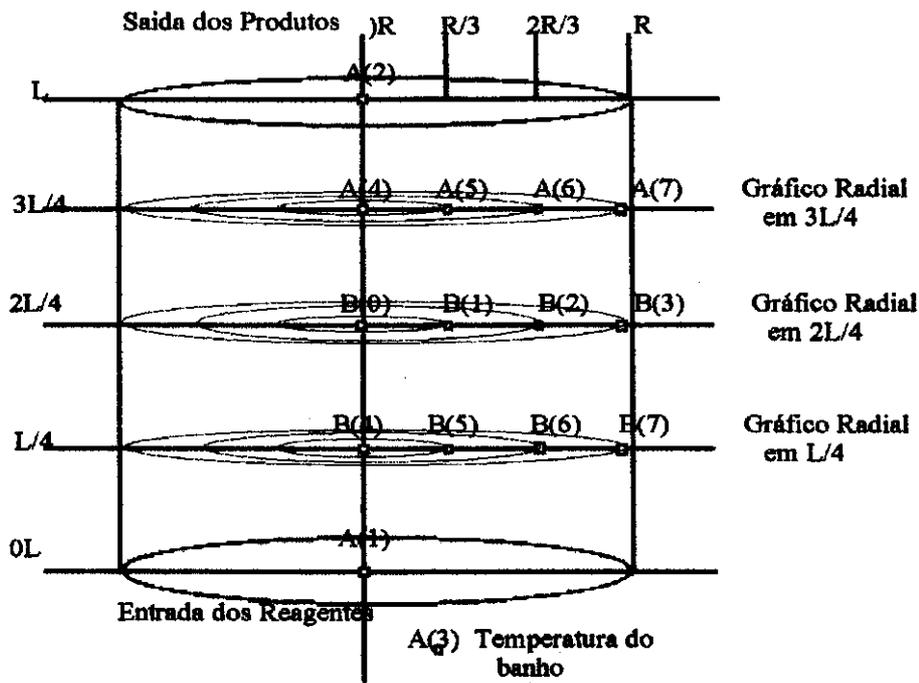
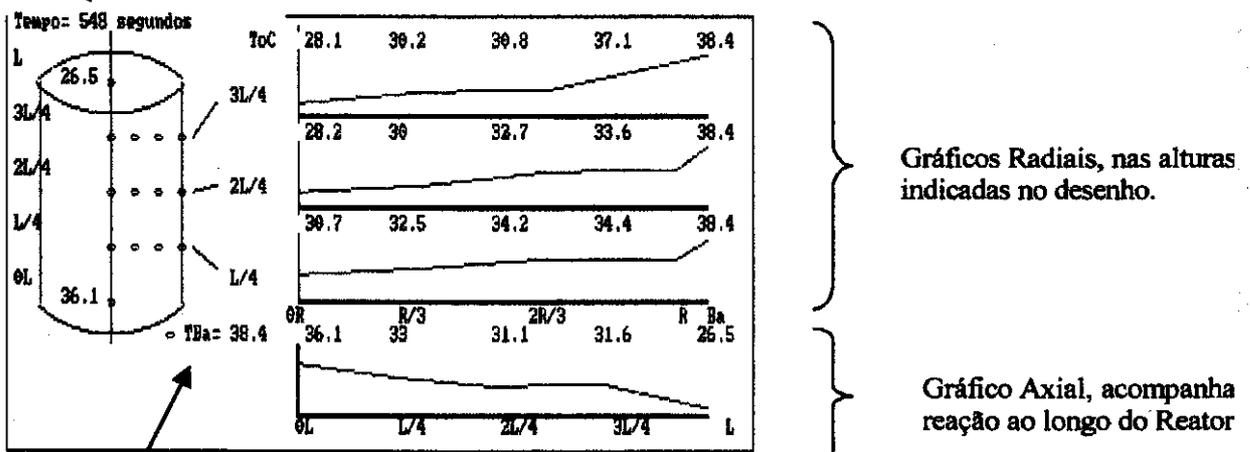


Figura 2.6.2- Posicionamento dos sensores e nome dado a cada um.

GRÁFICO AXIAL:

Os gráfico axial, inicia em 0L, 0 cm, plotando a variável a(1), em L/4, 3,5 cm, temos a média de b(4), b(5), b(6), e b(7), em 2L/4, 7,0 cm, temos a média de b(0), b(1), b(2), e b(3), em 3L/4, 10,0 cm, temos a média de a(4), a(5), a(6), e a(7), e em L, 14 cm, temos plotado o valor da variável a(2).

Tempo decorrido desde o início do experimento



Temperatura do banho termostático.

Figura 2.6.3- Relação entre os gráficos e as variáveis, e dados na tela de perfis.

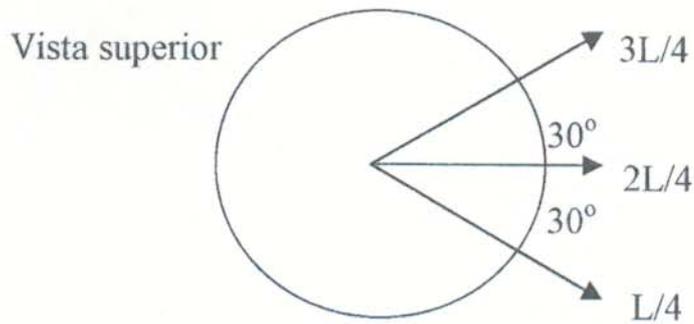


Figura 2.6.4-Disposição angular dos sensores:

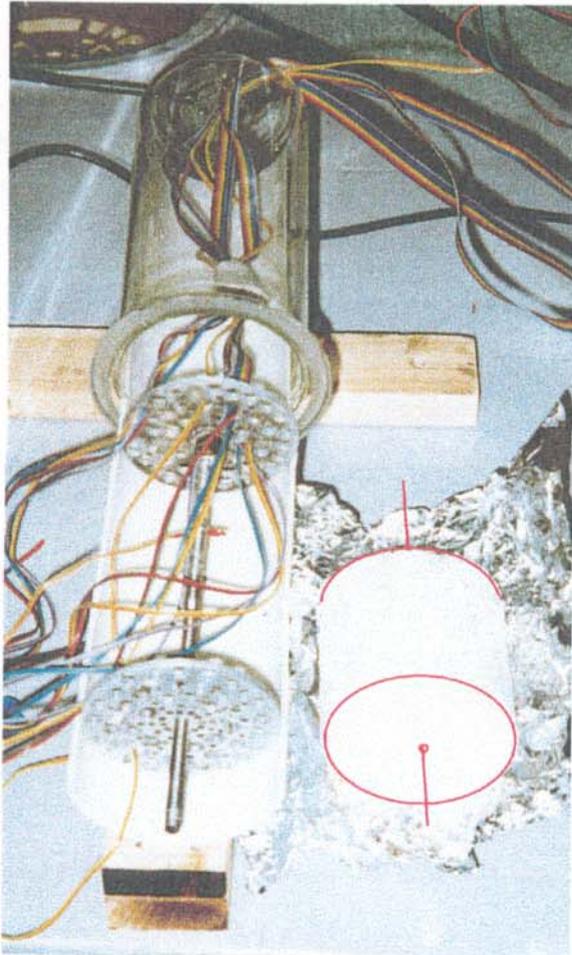


Fig. 2.6.5- Núcleo estéril antes de ser montado entre as grades do núcleo, de receber os sensores da fiação e de ser introduzido no corpo do reator.

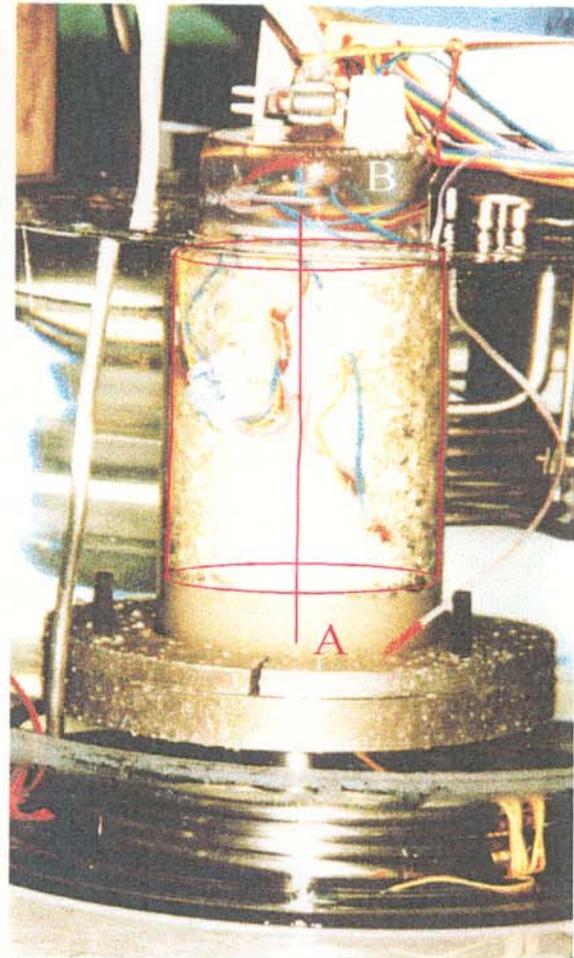


Fig. 2.7.2-Reator montado passando pelo processo de imobilização de células, recebendo a suspensão em (A), e devolvendo água limpa em (B).

2.6.2-Experimento de aferição dos instrumentos

Este experimento consistiu em se colocar o reator com o núcleo e com todos os sensores instalados e a uma temperatura inferior a 25°C no banho termostático, ligá-lo e deixar-lo aquecer até atingir o equilíbrio, próximo a 38°C ; enquanto isso, ir gravando os dados nos arquivos test-x,

Após isso, abrir os arquivos e analisar os dados concluindo se o sistema vai servir ou não aos propósitos deste trabalho.

2.7- Estudo de fermentação com levedura imobilizada em núcleo com 5% de crisotila.

Este experimento visa achar uma direção à um máximo de produtividade, e levantar dados de perfis térmicos dentro do reator.

Foi feito um núcleo com a mistura de 15g de crisotila ativada, e 285g de fibra de vidro picada, resultando em uma peça com 300g, e 538 mL, volume externo do cilindro.

2.7.1-Montagem utilizada

A montagem de suporte ao reator foi a mesma da figura 2.5.1, tendo acoplado o sistema descrito na figura 2.6.1, e foram interligados na forma mostrada na figura 2.6.1.

2.7.2-A imobilização das leveduras

Em um frasco de 5L sob agitação magnética e aquecimento a 35°C, foi produzida a biomassa, adicionando-se 14g de fermento liofilizado Fleischmann, e 3,5 L da solução nutriente do item 2.1.7.

A cultura foi deixada 24 hs nestas condições para se desenvolver, após as quais, foi feita, por centrifugação de 2 amostras, a medida da concentração que deu 25.4 g/L.

Foi bombeado através do reator 0,8L desta suspensão; depois 1L de água destilada para carregar o que não estivesse bem preso; a concentração final da água de lavagem mais a suspensão passada pelo reator foi de 3,1 g/L.

Portanto, por um balanço de massa temos que entraram no reator 20,3g de células, e saíram 5,6 g, ficaram então, imobilizadas 14,7 g de células em base úmida.

O processo de imobilização pode ser visto na foto mostrada na figura 2.7.2.

2.7.3-Experimento

Todo o processo de imobilização foi monitorado pelo computador e o primeiro dia da etapa de desenvolvimento também, mas houve um grave problema de corrosão, que os inutilizou os sensores completamente a partir daí. mas até então foram adquiridos dados.

Após a imobilização das células, o reator foi colocado em regime de desenvolvimento para chegar a um estado estacionário. A 30°C, foi alimentado com a solução padrão com 10% de sacarose a uma vazão de 15,8 mL/min por 2h e 30min, então foi baixada para 2.0 mL/min e assim mantida por 3 dias.

Duas amostras foram colhidas para avaliar a produtividade através de análise de teor alcoólico, enquanto o sistema de aquisição de dados ainda estava em bom funcionamento: uma, com vazão de alimentação em 15,8 mL/min ao final da etapa, e outra, com vazão de 2.0 mL/min, após 2h e 30min operando neste regime.

Uma vez que o reator foi considerado em regime estacionário, foi executada a grade experimental para se achar a direção de melhor produtividade, descrita na tabela 2.7.3

Tabela 2.7.3- Descrição da grade de condições experimentais aplicada ao reator com núcleo com 5% de crisotila, e 14,7 g de células. A % se refere a sacarose m/v na solução nutriente de alimentação, de acordo com o item 2.1.7.

	0,82 mL/min	3,2 mL/min	3,2 mL/min	2,0 mL/min	2,0 mL/min	1,25 mL/min
30°C		20%	10%	10%	15%	
35°C			10%	10%	15%	
40°C	15%		10%	10%	15%	15%

2.8- Estudo de fermentação com levedura imobilizada em núcleo com 10 % de crisotila

Este experimento visa achar uma direção à um máximo de produtividade, e levantar dados de perfis térmicos dentro do reator.

Foi feito um núcleo com a mistura de 30g de crisotila ativada e 270g de fibra de vidro picada, resultando em uma peça com 300g, e 538 mL, sendo o volume externo do cilindro, exatamente o mesmo volume do núcleo anterior, para facilitar comparações.

2.8.1-Montagem utilizada

A montagem de suporte ao reator foi a mesma da figura 2.5.1, tendo acoplado o sistema descrito na figura 2.6.1, os quais foram interligados na forma mostrada na figura 2.6.1., idêntica à do ensaio anterior. No entanto, os sensores foram todos trocados e capeados com borracha de silicone ou cola de junta de motor, e recalibrados.

2.8.2-A imobilização das leveduras

Em um frasco de 5L, sob agitação magnética e aquecimento a 35°C, foi produzida a biomassa, adicionando-se 14g de fermento liofilizado Fleischmann, e 3,5 L da solução nutriente do item 2.1.7.

A cultura foi deixada 24 hs nestas condições para se desenvolver, após as quais, foi feita, por centrifugação de 2 amostras, a medida da concentração, que deu 23,3 g/L em média.

Foi bombeado através do reator 3,1L desta suspensão, depois 0,45L de água destilada para carregar o que não estivesse bem preso, a concentração final da água de lavagem mais a suspensão passada pelo reator foi de 11,1 g/L.

Portanto, por um balanço de massa temos que entraram no reator 72,2g de células, e saíram, 39,4 g, então, ficaram imobilizadas 32,8 g de células.

O processo de imobilização pode ser visto na foto mostrada na figura 2.7.2.

2.8.3-Experimento

Todo o processo de aquecimento, homogeneização térmica, e imobilização foram monitorados pelo computador na etapa de desenvolvimento, 20 min após o início houve outro grave problema de corrosão, caiu água do banho termostático com hipoclorito de cálcio que atuava como esterilizador, em cima dos circuitos dos termômetros eletrônicos, ocorreu uma descalibração total.

As placas foram lavadas com água destilada e depois com acetona, um ventilador foi deixado 24hs soprando em cima delas, até secarem bem.

Foi feita uma recalibração, enchendo o reator com água para cessarem os efeitos térmicos, baixando a temperatura do banho e do reator para 25°C, obtendo assim o ponto de zeramento dos sensores, 0V, depois subindo a temperatura para 35°C, que é o meio da escala. Foi feito o alinhamento dos sensores em 2,475 V. Funcionou por mais alguns ensaios permitindo obter perfis térmicos em diversas produtividades.

Após a imobilização das células, o reator foi colocado em regime de desenvolvimento para chegar a um estado estacionário. A 33,7°C, foi alimentado com a solução padrão com 10% de sacarose a uma vazão de 3,9 mL/min por 2 dias, então foi executada a grade experimental descrita na tabela 2.8.3.

Uma amostra foi colhida para avaliar a produtividade através de análise de teor alcoólico, enquanto o sistema de aquisição de dados ainda estava em bom funcionamento, 20 minutos após o início do período de desenvolvimento.

Depois de recalibrado, ainda foi possível obter perfis térmicos para diversas condições operacionais.

Tabela 2.8.3- Descrição da grade de condições experimentais aplicada ao reator com núcleo com 10% de crisotila, e 32,8 g de células. A % se refere a sacarose m/v na solução nutriente de alimentação, de acordo com o item 2.1.7. Os pontos marcados com * são os que foram acompanhados pelo sistema eletrônico.

	2,0 mL/min					3,9 mL/min
30°C	10%*	15%				10%
35°C						10%*
40°C	15%	10%	7,5%	5%	2,5%	10%*

2.9- Estudo de eficácia volumétrica

A parte ativa do leito do reator é composta por elementos infinitesimais, as células. Um sistema perfeito, como os órgãos dos seres vivos, faria com que o suprimento, e a remoção de dejetos fosse no mínimo o suficiente para todos os seus membros. É óbvio que estamos muito longe em nossa engenharia da eficiência da natureza.

O desenho de um reator, para ser eficaz, precisa no mínimo explorar todo o seu volume, suprimindo e removendo adequadamente cada elemento de volume.

Para avaliar a eficácia volumétrica, de uma forma bem simples, vamos passar uma solução colorida, suco de uva, pelo reator, assim poderemos ver onde há irrigação, onde há caminhos preferenciais, enfim, enxergar superficialmente os caminhos no leito do reator.

2.9.1- Montagem

Foi utilizada exatamente a mesma do item 2.8, inclusive o mesmo núcleo.

2.9.2-Experimento

A preparação consiste em bater no liquidificador 2 Kg de uva tipo Benitaka, vermelha, peneirar em uma peneira plástica com abertura aproximada de 1,2 mm, bombear pelo reator, e observar.

A temperatura do experimento foi 40°C, e a vazão da bomba, 10,9 mL/min., e o pH do suco estava em 3,5

Duas amostras foram coletadas para avaliar o teor alcoólico.

2.10 – Cálculo da produtividade dos experimentos com fermentação.

Foi feita uma curva de calibração onde os padrões foram preparados por diluições consecutivas nas concentrações de 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, e 0,62%. Os padrões foram preparados em duplicatas, totalizando dez padrões. De cada padrão, três amostras foram destiladas até a metade do volume em banho de gelo, e destes destilados foram medidos os índices de refração a 21°C.

A curva de calibração foi então montada com 5 concentrações e 6 pontos por concentração.

Para determinar a produtividade em uma condição experimental, foi colhida uma amostra de 20mL, destilada a metade do volume, e avaliada através do índice de refração a concentração de álcool. Multiplicando a vazão por hora pela concentração e pela densidade, temos as gramas produzidas por hora, as quais divididas pelo volume do leito do reator em litros, nos dá a Produtividade em g etanol por litro por hora.

$$P = g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$$

III-RESULTADOS

A apresentação dos resultados obtidos neste trabalho, de acordo com a parte experimental, está dividida em sete seções. A primeira expõe resultados do estudo da oxidação de álcoois; a segunda, os de fermentação livre; a terceira, os de fermentação imobilizada com variações de temperatura de operação; a quarta, os resultados do ensaio de aferição do sistema eletrônico construído especialmente para os dois estudos que o seguem; a quinta, os dos estudos com núcleo com 5% de crisotila; a sexta, os dos estudos com núcleo de 10%; e a sétima, os resultados do estudo de eficácia volumétrica.

3.1- Resultados dos estudos de oxidação de álcoois

3.1.1- Reações

Tanto para o núcleo com MnO₂ como para aquele o com TiO₂, foram feitas cromatografias gasosas para todas as amostras dos reagentes, e dos possíveis produtos, foram feitos também espectros FT-IR, e nada além dos reagentes e seus contaminantes normais foi achado nos produtos.

3.1.2- Outros

Uma vez que havia uma bomba mantendo constante o fluxo de reagente na fase líquida, a temperatura igual para todos, e um manômetro medindo a perda de carga, para todos os álcoois enquanto passavam pelos dois núcleos, foi feito o cálculo do fator de Fanning através da equação: $hl = 2 \cdot Ff \cdot L/D \cdot V^2 / g$, sendo hl a medida da perda de carga em cm Hg, V a velocidade do vapor, e L e D as dimensões do leito, e Ff o fator de Fanning. Os resultados estão na tabela 3.1.2.

Tabela 3.1.2- Resultados do cálculo do fator de Fanning para a passagem dos vapores dos álcoois através dos núcleos com MnO₂, e TiO₂, e proporções entre eles.

Vapor de álcool a 135°C	Fator Fanning Núcleo MnO ₂	Proporção	Fator de Fanning núcleo TiO ₂	Proporção
Metanol	72	1.00	72	1.00
Etanol	105	1.46	120	1.67
n-Propanol	148	2.05	99	1.37
i-Propanol	115	1.59	76	1.05
n-Butanol	111	1.54	111	1.54
2-Butanol	112	1.55	94	1.30

3.2-Resultados de estudo de fermentação livre

Estes ensaios foram feitos com o objetivo de verificar a influência da concentração do substrato, sacarose, e a proporção massa-substrato/massa-leveduras na cinética do processo, sendo que no primeiro experimento, foram acompanhadas variáveis intensivas, ângulo de polarização da luz, e evolução da concentração de células, ou seja o crescimento da biomassa; no segundo, foi acompanhada a evolução da taxa de produção de CO₂, uma variável extensiva.

3.2.1-Crescimento da biomassa e ângulo de polarização da luz versus tempo

Durante o experimento, alíquotas foram retiradas deste e de cada uma foram medidos a biomassa e o ângulo de polarização da luz; portanto, são pontos simultâneos aos dois gráficos, e podem ser vistos nas figuras 3.2.1.a, 3.2.1.b, respectivamente.

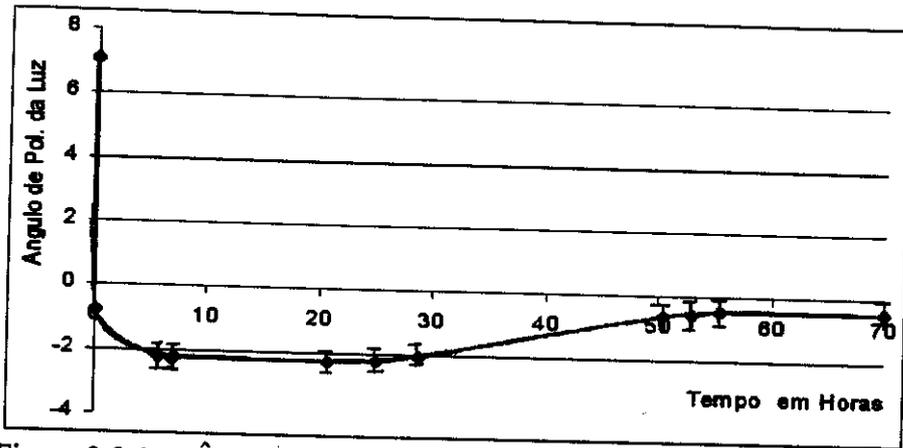


Figura 3.2.1.a- Ângulo de polarização da luz em função do tempo para o experimento de fermentação livre número 1, realizado com excesso de substrato.

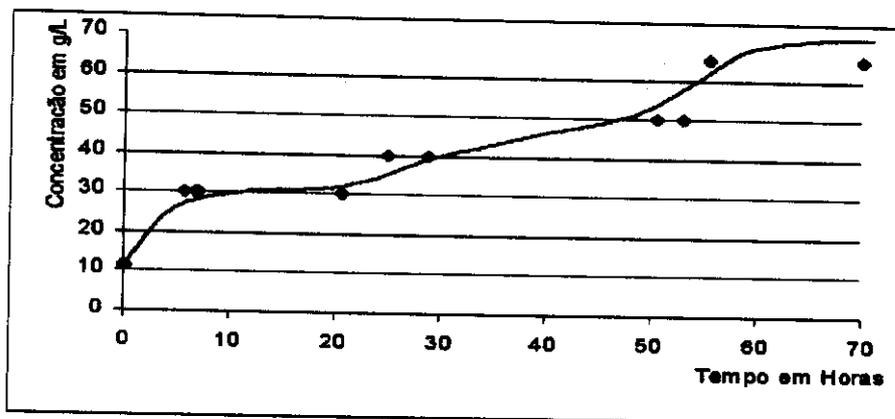


Figura 3.2.1.b- Crescimento da concentração de células em função do tempo para o experimento de fermentação livre número 1, realizado com excesso de substrato.

3.2.2- Taxa de produção de CO₂ versus tempo.

Durante este experimento, não foram retiradas alíquotas, pois o dado que nos interessa é função do volume total de massa ativa no fermentador.

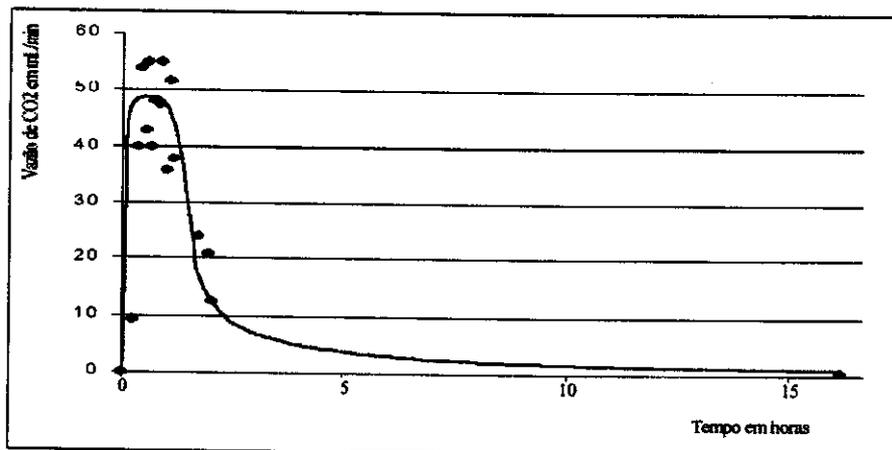


Figura 3.2.2- Evolução da taxa de produção de CO₂ em função do tempo para o segundo experimento de fermentação livre, sem excesso de substrato, e com massas iguais de células e sacarose.

A atividade analítica neste experimento foi marcar a hora no menisco da água do medidor de volume deslocado, dado com o qual se fez o gráfico das taxas, mostrado na figura 3.2.2.

3.3-Resultados do estudo de fermentação imobilizada com variação de temperatura, e monitoração da vazão de CO₂

Os resultados deste experimento podem ser divididos em três grupos diferentes; o primeiro, sobre o desenvolvimento das células imobilizadas no núcleo em direção ao estado estacionário; o segundo, sobre a resposta do núcleo em taxa de produção de CO₂ a variação de temperatura de operação; e o terceiro, sobre o núcleo aberto após o ensaio.

3.3.1- Desenvolvimento do núcleo

O acompanhamento da taxa de produção de CO₂ até o estado estacionário pode ser visto na figura 3.3.1.. Em cerca de 48 hs, este núcleo que suportava inicialmente cerca de 7,7g de leveduras, já estava em condições bem estáveis para sofrer os experimentos de alteração de temperatura de operação; no entanto, foram esperadas mais 48hs em observação, as quais não entram neste gráfico.

Nas 48 hs adicionais foi observada uma pequena redução na produtividade. Isso definiu a hora de começar os ensaios de variação de temperatura.

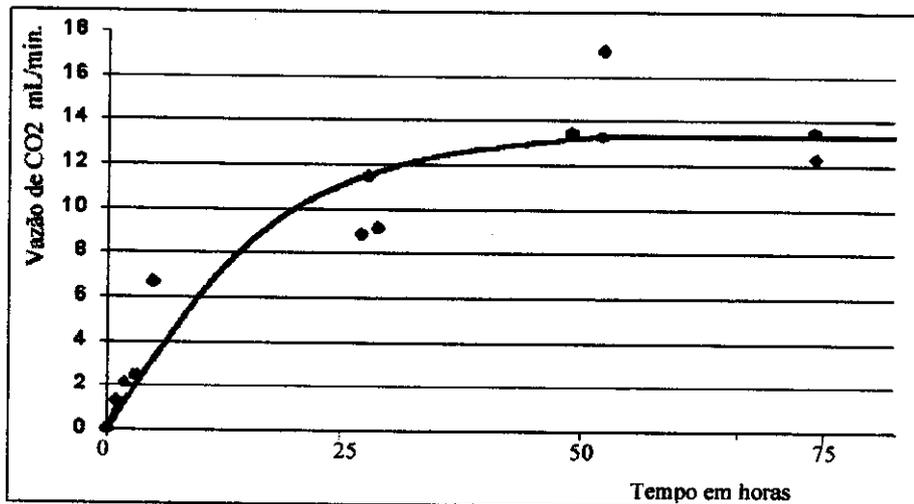


Figura 3.3.1- Evolução da taxa de produção de CO₂ em função do tempo de um núcleo com 7,7g de células imobilizadas, alimentado com solução padrão 10% de sacarose, a 1,5 mL/min, e a 31°C.

3.3.2-Resposta a variações da temperatura

Os experimentos de variação de temperatura de operação foram feitos com o núcleo em estado estacionário desenvolvido na etapa anterior.

As condições de alimentação foram mantidas idênticas, com a solução padrão de 10% de sacarose bombeada a uma vazão de 1,5 mL/minuto.

A temperatura inicial, 31°C, é a mesma do período de desenvolvimento. O experimento elevou-a até 45°C, de modo que obtivemos os resultados graficados da taxa de produção de CO₂ na figura 3.3.2.a., depois a temperatura foi baixada novamente, até 31°C. Os resultados estão na figura 3.3.2.b.

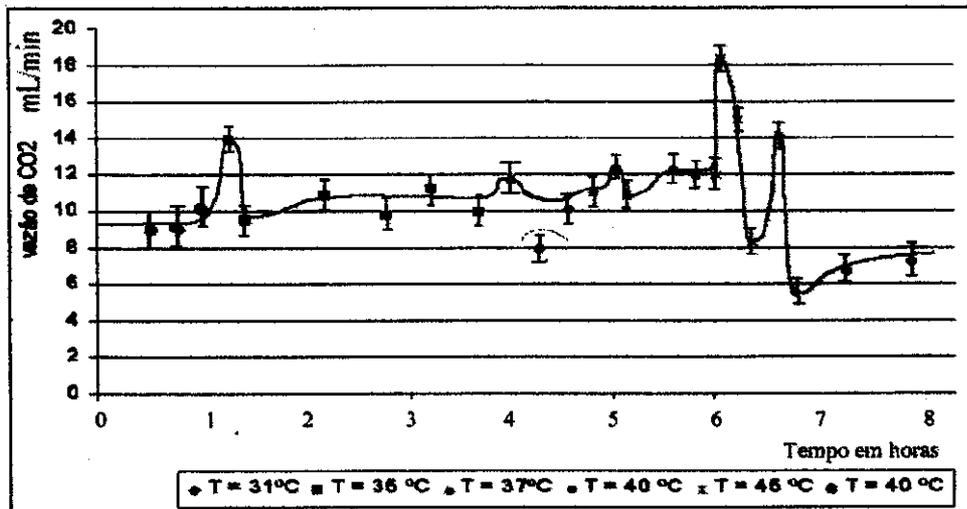


Figura 3.3.2.a- Resposta da taxa de produção de CO₂ a diferentes elevações de temperatura, para um núcleo de células imobilizadas em estado estacionário, em experimento com núcleo de crisotila com 7,7g de células imobilizadas.

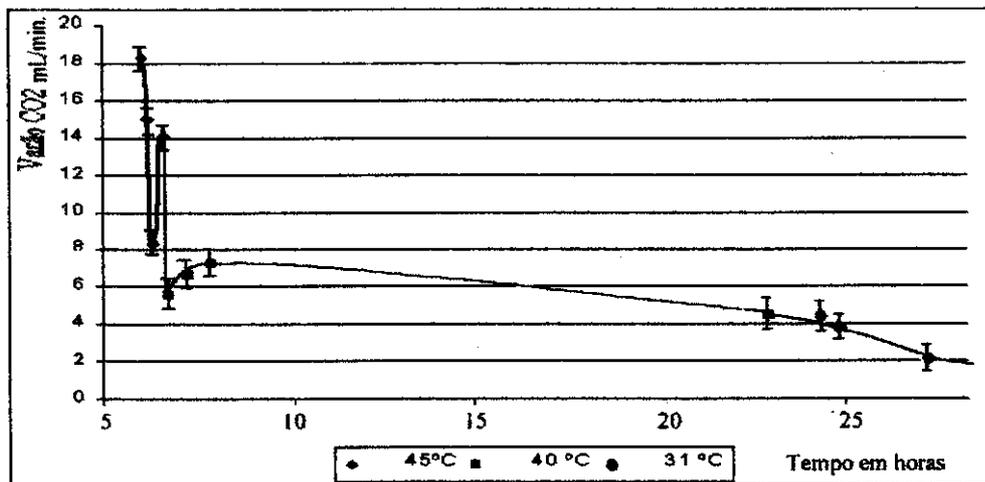


Figura 3.3.2.b - Sequência do gráfico anterior a partir do pico máximo ocorrido próximo a 5,5 hs, onde é mostrado a decadência da produção se comparada às mesmas temperaturas antes do sobreaquecimento no pico máximo.

3.3.3- Outros

Outros resultados mostram a evidência da não homogeneidade térmica dentro do núcleo do reator.

Ao final do experimento o reator foi desmontado, e o núcleo retirado e cortado para avaliação, e foi encontrado que a parte central deste estava diferente, aparentava estar degenerada, ou mesmo cozida, escura.

A figura 3.3.3 ilustra o aspecto encontrado ao se cortar o núcleo ao meio.

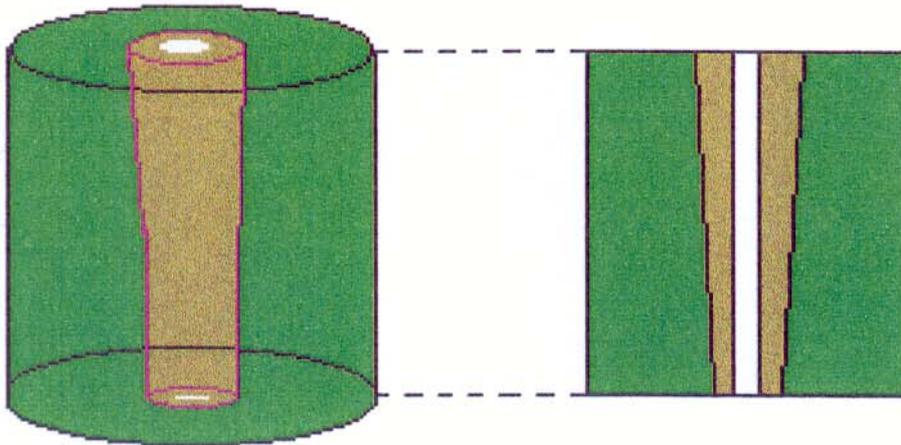


Figura 3.3.3- Descrição do volume afetado pelo excesso de calor. Em verde temos a área saudável, em marrom, a danificada, e em branco no corte, o furo da passagem do parafuso central.

3.4-Resultados do ensaio de aferição da instrumentação

Para se ter uma melhor visão, dividimos a apresentação dos resultados em etapas, onde os dados são mostrados de modo a torná-los mais visualizáveis, e acostumar o leitor com as notações criadas para demonstrar os resultados obtidos.

3.4.1-Todos os pontos, exibidos pelo programa graftot.

O ensaio de aferição da instrumentação que constou de um aquecimento simples, sem líquidos ou reações, gerou 10425 pontos em cerca de 27 minutos. Estes são exibidos em sua totalidade através do programa Graftot, montado para buscar na memória todos os dados, e exibí-los ao longo do eixo do tempo do cronômetro do sistema, quando este os guardou. O resultado está na figura 3.4.1.

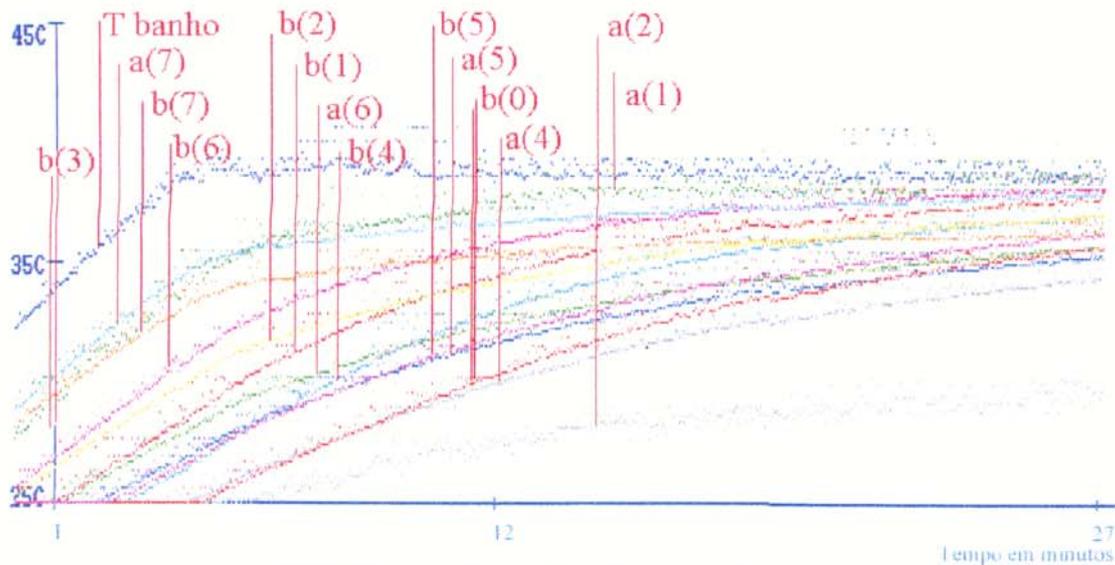


Figura 3.4.1- Pontos gravados e recuperados pelo sistema de aquisição de dados durante o ensaio de aferição. São 10 425 pontos colhidos em 27 minutos, e descrevem o aquecimento do reator seco e sem células em direção à homogeneidade de temperaturas, sendo que um conjunto completo de medições era gravado em média a cada 2,3 seg.

3.4.2-Curvas com maiores dispersões e suas médias calculadas pelo programa

Grafpmnd

Grafpmnd, significa colocar no gráfico os pontos e as médias.

Para ter uma visão da dispersão dos pontos, escolhemos as três piores fontes, e aplicamos o programa que exhibe todos os dados colhidos destes sensores, e sobreposto a eles em outra cor, a média, com o número de amostras escolhidos.

Os três sensores que ficaram fora do núcleo do reator, o do banho termostático, o do OL, e o do L, são aqueles com maiores dispersões, e foram escolhidos para ser avaliados utilizando-se o programa. O resultado está na figura 3.4.2.

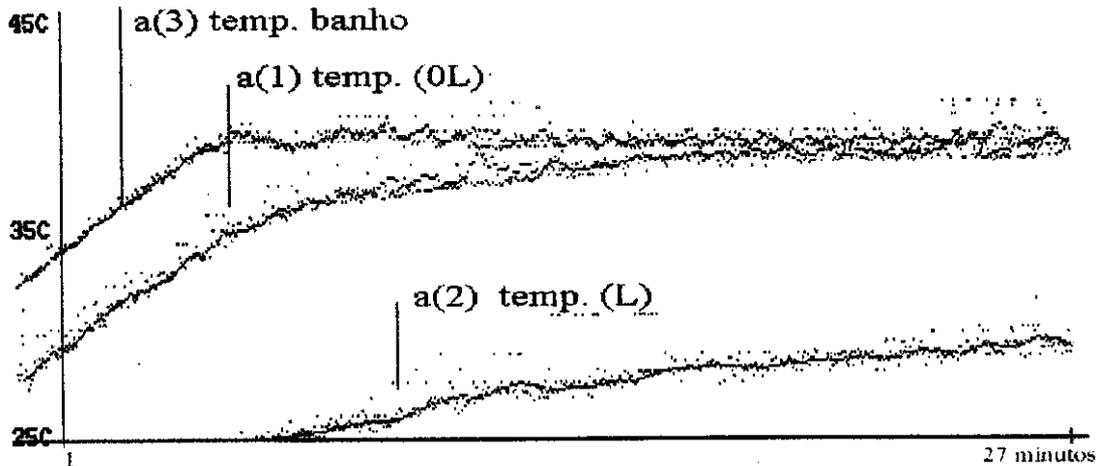


Figura 3.4.2 -Tela gerada pelo programa Grafpmnd, com dados gerados no experimento de aquecimento do reator a seco, sem reação. Os dados mostrados são relativos aos três sensores que ficam fora da crisotila, aqueles com maior dispersão. Os dados da curva a(3), são acompanhados pela curva de média de cada 5 pontos, da curva a(2), pela curva com médias de cada 10 pontos, e a curva a(1), pela curva com médias a cada 15 pontos. O erro máximo calculado para o sensor a(3), no pior caso foi de $\pm 0,35^{\circ}\text{C}$.

3.4.3-Quatro telas de perfis capturadas ao longo do ensaio exibidas pelo programa

Anigraf

A forma mais simples de se verificar os perfis térmicos dentro do núcleo é através do programa que recupera da memória conjuntos de dados gravados um por um, e desenha na tela os perfis correspondentes, em velocidade acelerada. Com este recurso, é possível, em alguns minutos, estudar o que aconteceu durante horas.

O ensaio de aferição foi submetido a este procedimento, e quatro instantes foram capturados, e são mostrados nas figuras 3.4.3. a,b,c,d.

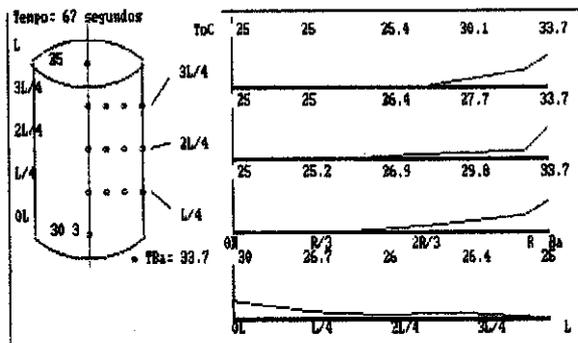


Figura 3.4.3.a

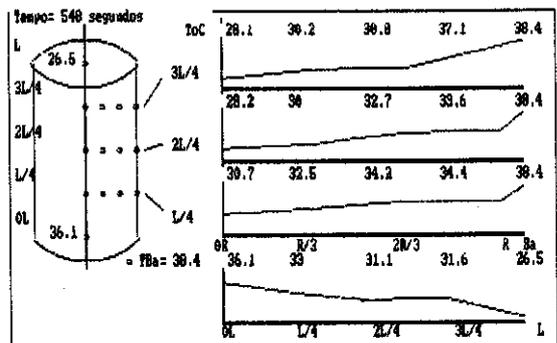


Figura 3.4.3.b

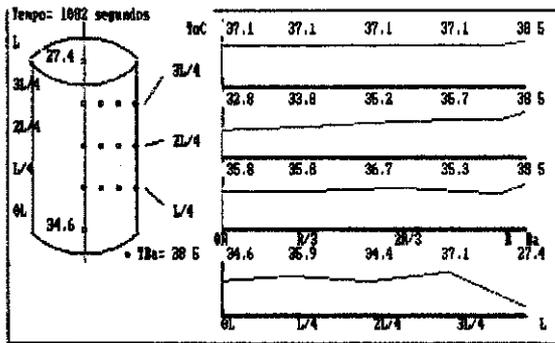


Figura 3.4.3.c

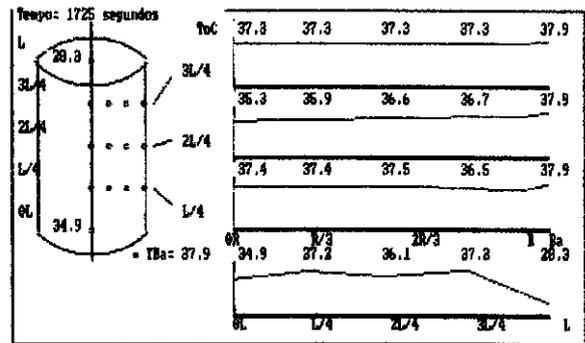


Figura 3.4.3.d

As figuras 3.4.3.a.b.c.d, são aplicações do programa Anigraf, o qual reconstituiu as telas dos perfis térmicos no instante em que haviam sido gravadas. No caso, 67, 548, 1082, e 1725 segundos após o início do experimento.

3.4.4-Quatro telas de perfis com sobreposição e médias exibidas pelo programa Grafpm.

De posse do número de pontos mínimo de que precisamos para obter um perfil médio aceitável, vamos ao programa Grafpm, o qual nos dá os perfis médios, de um número de amostragens por nós escolhidas, e no instante do experimento em que quisermos buscar a informação. Esta técnica é necessária para que se possa saber, com uma boa segurança, o que aconteceu em média numa parte do experimento.

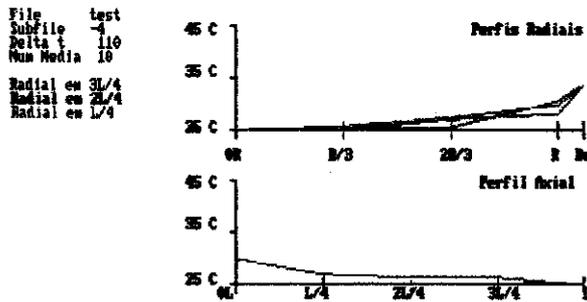


Figura 3.4.4-a

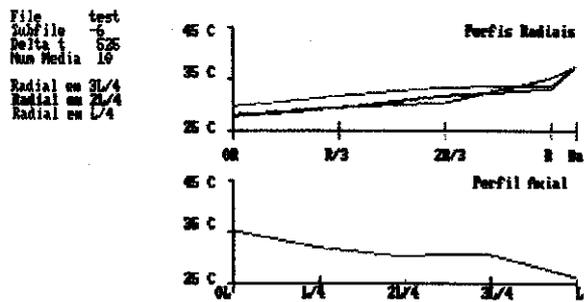


Figura 3.4.4-b

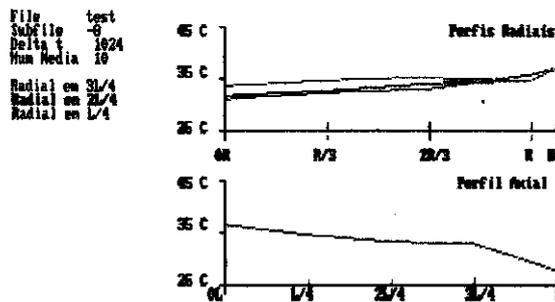


Figura 3.4.4-c

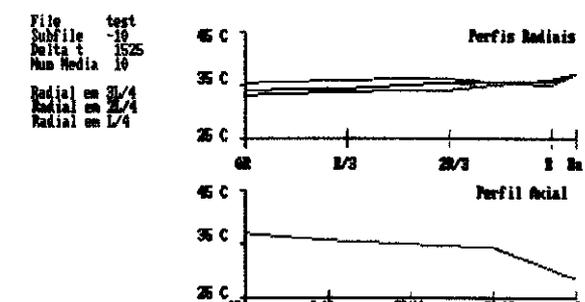


Figura 3.4.4-d

As figuras 3.4.4-a,b,c,d, são aplicações do programa Grafpm, o qual nos dá os perfis médios, no caso de 30 amostragens, nos instantes distantes Δt do início do experimento. No caso, 110s, 525s, 1024s, e 1525s.

De posse destes programas e utilizando esta técnica no procedimento da análise dos dados obtidos eletronicamente, podemos ter um bom coeficiente de certeza do que obtemos.

3.5- Resultados dos estudos de fermentações com núcleo com 5% de crisotila.

Aqui são mostrados os perfis térmicos obtidos durante o processo de imobilização das células, na etapa de evolução acompanhados da produtividade ao atingir o estado estacionário, e os resultados da grade experimental, sendo estes apenas as produtividades, pois a corrosão dos sensores, tornou impossível capturar dados.

3.5.1- Imobilização de leveduras

As duas telas capturadas nos mostram um pequeno efeito térmico visto como um ligeiro aquecimento em áreas onde houve mais atividade na imobilização das células.

A figura 3.5.1.a-nos mostra os perfis após o núcleo receber as 14,7 g de células, e a figura 3.5.1.b nos mostra o que acontece quando estas células começam a receber a solução nutricional padrão, com 10% sacarose podem se observar áreas que aquecem, resultado da atividade celular exotérmica que já havia começado.

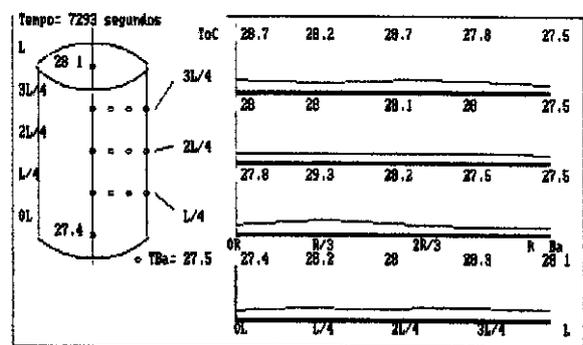
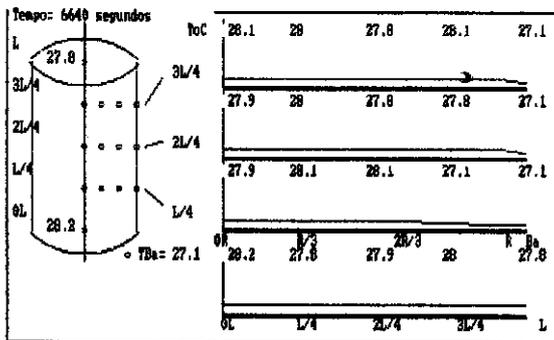


Figura 3.5.1.a- Perfis térmicos do núcleo que acabou de imobilizar suas 14,7g de células.

Figura 3.5.1.b- Perfis térmicos deste núcleo quando começa a ser alimentado.

3.5.2- Período de desenvolvimento

Durante todo este período, o banho foi ajustado em 30°C; a solução de alimentação foi a padrão de 10%, as vazões foram alteradas inicialmente de 15,7 mL/min., para 2.0 mL/min..

Ao final de etapa com vazão 15,7 mL/min, uma alíquota foi analisada e a produtividade calculada em 7,7 g.L⁻¹.h⁻¹. A figura 3.5.2.a nos mostra os perfis no início desta etapa, e a figura 3.5.2.b nos mostra os perfis quando a alíquota foi colhida.

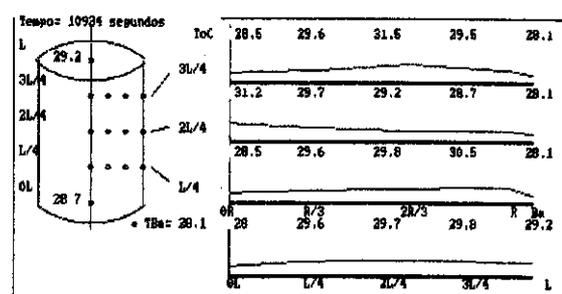
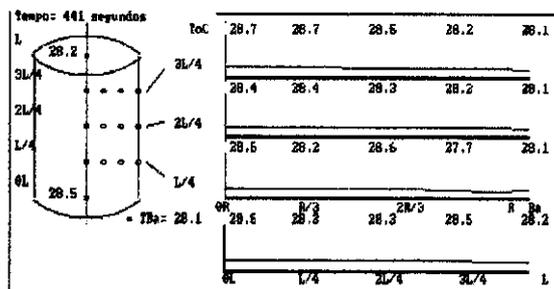


Figura 3.5.2.a- Perfis térmicos no início da etapa de desenvolvimento.

Figura 3.5.2.b-Perfis térmicos 3hs após a etapa iniciar, quando foi colhida a amostra que nos deu uma produtividade de 7,7 g.L⁻¹.h⁻¹.

Pode-se observar que, em apenas 3 horas, a atividade celular define onde é mais favorável à sua atividade, e marca com maior emissão de calor as regiões onde está atuando mais intensamente.

Agora com taxa de alimentação reduzida a 2,0 mL/min, podemos observar durante as 5 hs seguintes o desenvolvimento.

Ao final desta etapa, outra alíquota foi colhida e nos deu a produtividade de 4,9g/Lh. A solução nutritiva é a mesma, assim como a temperatura do banho, só a vazão de alimentação foi reduzida de 15,7 para 2,0 mL/min.

As figuras 3.5.2.c,d,e,f, nos mostram a evolução dos perfis térmicos, indiretamente a atividade celular, em quatro telas capturadas ao longo das 2,2 hs em que estas condições foram mantidas. Podemos observar na última tela, o estabelecimento de um regime térmico que nos mostra um aquecimento crescente logo após o início do reator, e também podemos ver nas figuras 3.5.2.g,h, que a distribuição da atividade se tornou mais heterogênea, através da sobreposição dos perfis.

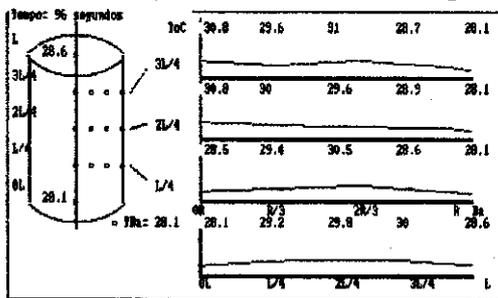


Figura 3.5.2.c- Perfil térmico a 96 segundos.

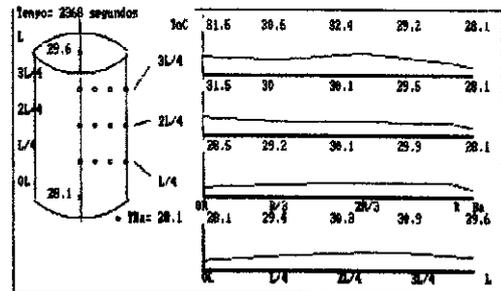


Figura 3.5.2.d- Perfil térmico a 40min..

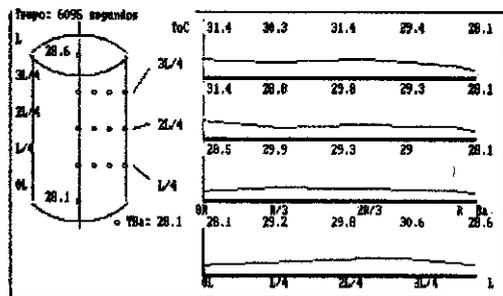


Figura 3.5.2.e- Perfil térmico a 100 minutos.

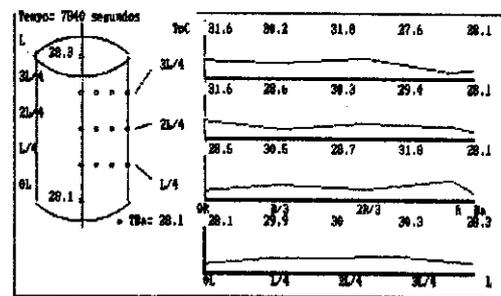


Figura 3.5.2.f- Perfil térmico a 2,2 hs.

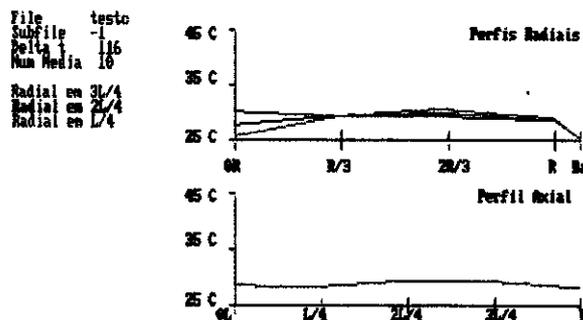


Figura 3.5.2.g- Sobreposição dos perfis térmicos em 116 segundos

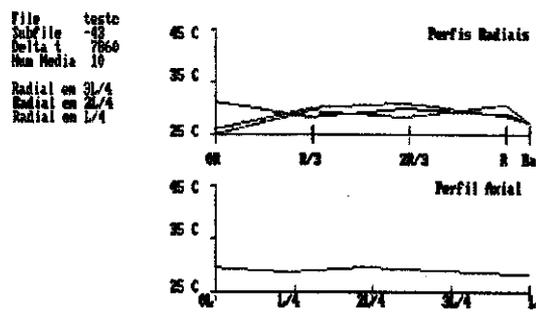


Figura 3.5.2.h- Sobreposição dos perfis térmicos em 2,2 horas

3.5.3- Curvas de resultados da grade de experimentos.

O tempo total esperado para que com margem de folga o reator atingisse o estado estacionário foi de 48 horas. A partir daí, foi executada a grade experimental que consiste em variar as condições experimentais e avaliar, após estabilizado, qual a produtividade do núcleo em teste.

Os resultados da grade experimental em produtividade são mostrados nas figuras 3.5.3.a,b,c., sendo que a figura 3.5.2.c, é a plotagem dos pontos de produtividade obtidos a temperatura de 40°C, obtidos nas diversas vazões, e a 10% e 15% de sacarose na solução nutriente. Produtividades em g etanol por litro de leite de reação por hora.

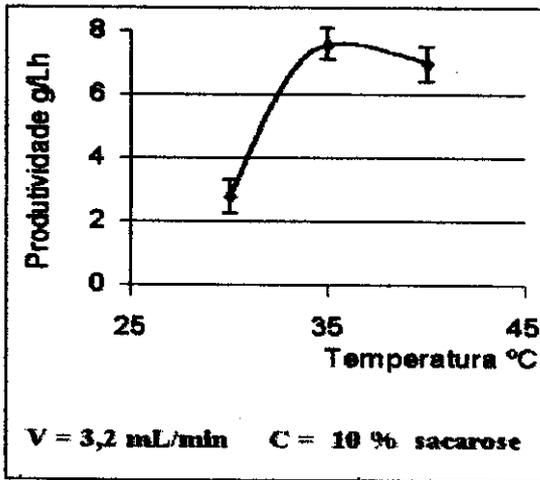


Figura 3.5.3.a- Produtividades obtidas nas condições acima por um núcleo com 5% de crisotila com 14,7g de células imob.

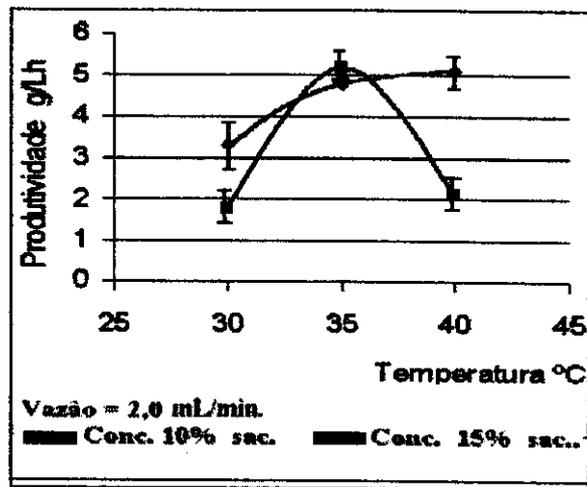


Figura 3.5.3.b- Produtividades obtidas nas condições acima por um núcleo com 5% de crisotila com 14,7g de células imob.

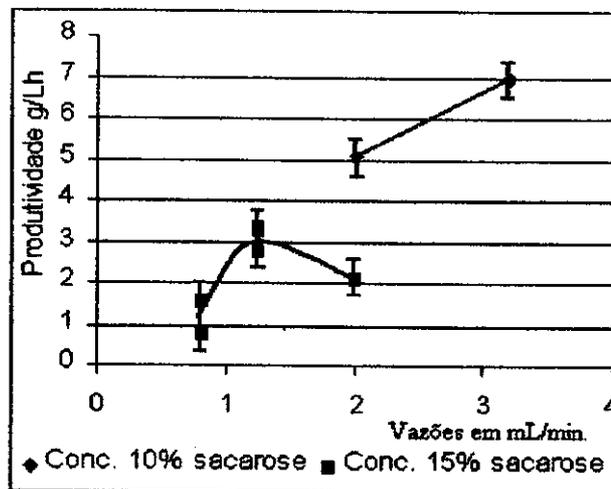


Figura 3.5.3.c- Pontos obtidos de produtividade à temperatura de 40°C e nas condições acima para um núcleo com 5% de crisotila com 14,7 g de células imobilizadas.

3.6-Resultados dos estudos de fermentação com núcleo com 10% de crisotila.

Aquí são mostrados os perfis térmicos obtidos durante; o aquecimento, o processo de imobilização das células, a etapa de evolução, e de alguns pontos da grade

experimental. Infelizmente ocorreu um acidente que limitou a possibilidade de se acompanhar os efeitos térmicos de todos os pontos prescritos pela grade experimental.

3.6.1-Imobilização de leveduras

Antes de se imobilizar as leveduras, foi feito um ensaio onde se aqueceu o reator até o equilíbrio térmico, monitorando pelo sistema de aquisição de dados. As telas inicial e final são mostradas nas figuras 3.6.1.a,b, a título de confirmar a qualidade da substituição dos sensores que foram corroídos, e da recalibração.

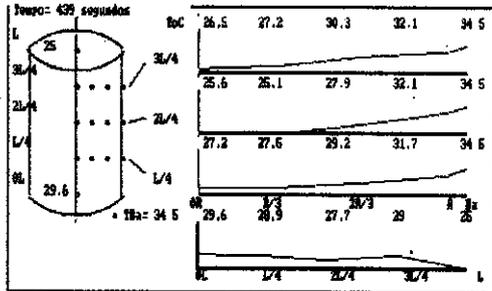


Figura 3.6.1.a-Aquecimento após 7,3 min.

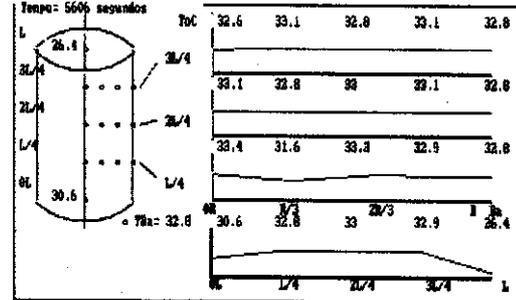


Figura 3.6.1.b-Aquecimento após 90 min

Após confirmar o funcionamento com a qualidade necessária, foi feita a imobilização das leveduras, sendo que este núcleo fixou 32,8g destas.

O processo pode ser acompanhado pelas telas de perfis mostradas nas figuras 3.6.1.c,d,e,f, e ter seus perfis comparados por sobreposição nas figuras 3.6.1.g,h.

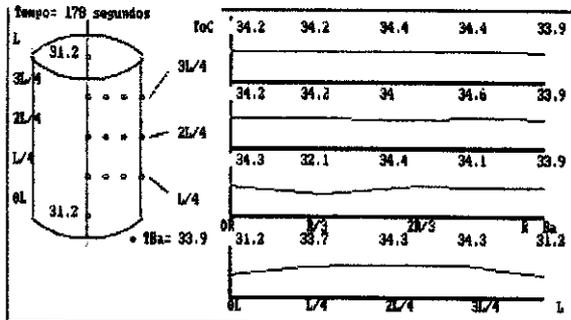


Figura 3.6.1.c- Células chegando na parte Inferior do núcleo.

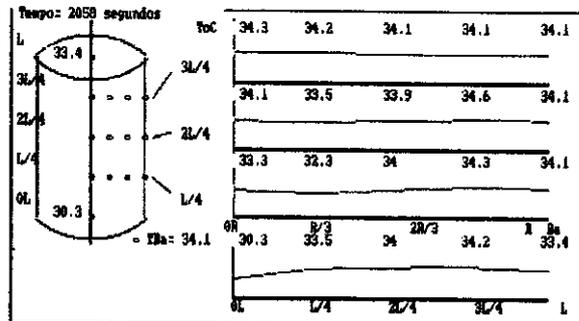


Figura 3.6.1.d- Células cobrindo o núcleo.

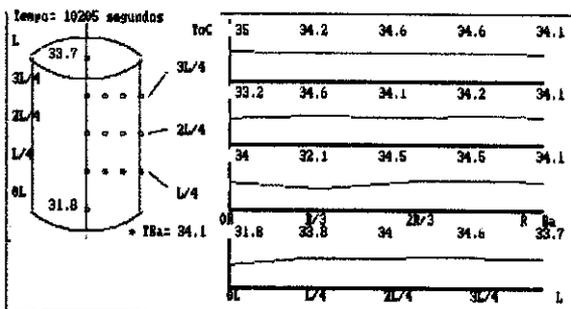


Figura 3.6.1.e- Final do bombeamento de Células.

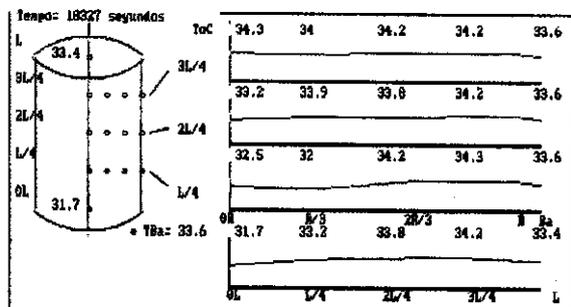


Figura 3.6.1.f-Bombeamento com solução padrão 10%, quando cobriu todo o leito do reator.

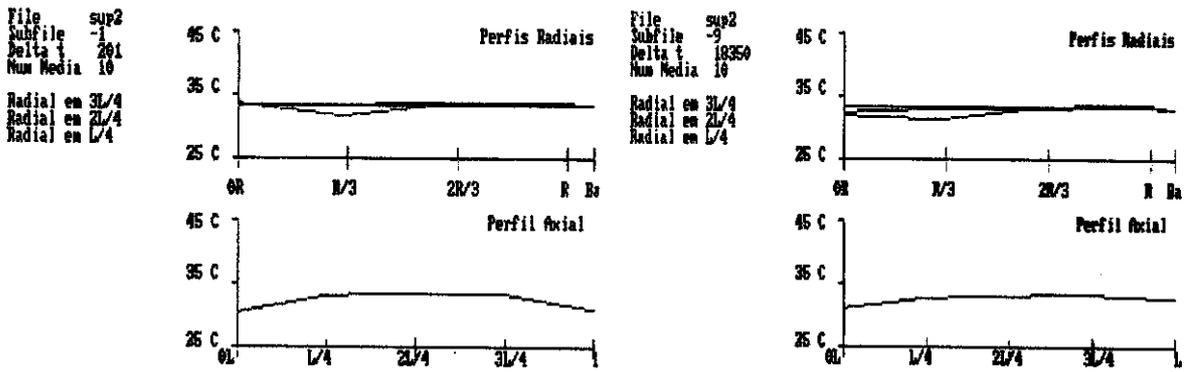


Figura 3.6.1.g-Perfis antes da imobilização. Figura 3.6.1.h-Perfis após a imobilização.

3.6.2-Período de desenvolvimento

Esta etapa foi alimentada com solução padrão 10% de sacarose, a 3,9 mL/min, e a uma temperatura de 30°C, continuação da etapa anterior.

Cerca de 20 minutos após o início, houve um acidente, mas os dados gravados são suficientes para acompanharmos o início do processo.

Logo após, uma alíquota foi coletada e teve seu teor alcoólico analisado, possibilitando calcular a produtividade, que foi 5,5 g.L⁻¹.h⁻¹

Nas figuras 3.6.2.a,b,c, temos perfis térmicos desta primeira parte desta etapa, e na figura 3.6.2.d, os perfis sobrepostos para visualizarmos as diferenças na distribuição da atividade aqui também ocorridas. O ponto sobre o qual foi calculada a produtividade corresponde ao último gráfico adquirido.

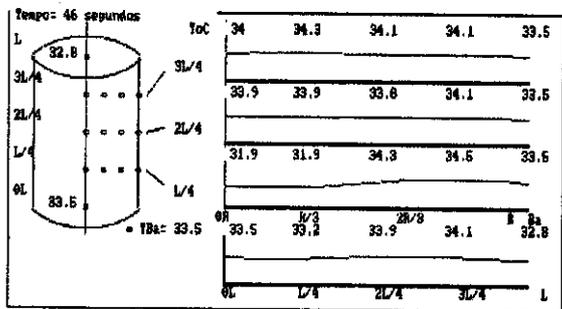


Figura 3.6.2.a- Perfis no início da etapa de desenvolvimento, 46 segundos do início.

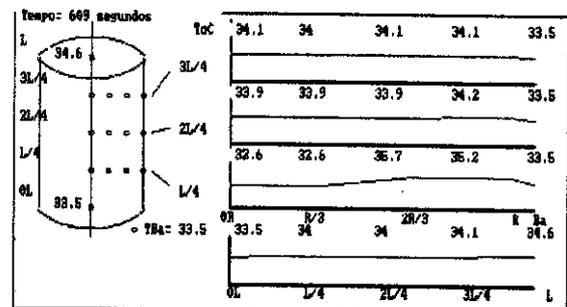


Figura 3.6.2.b- Perfis a 10 min. depois do Início.

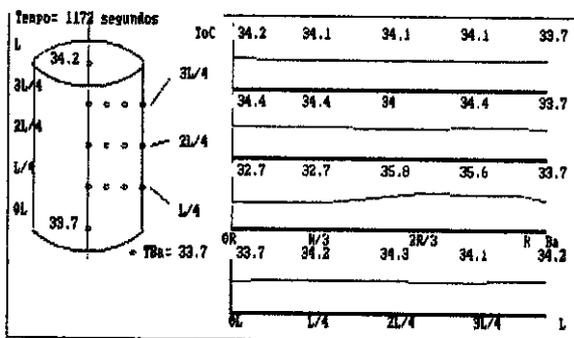


Figura 3.6.2.c- Última aquisição de dados antes do acidente, instante em que foi colhida uma amostra com P = 5,5 g.L⁻¹.h⁻¹

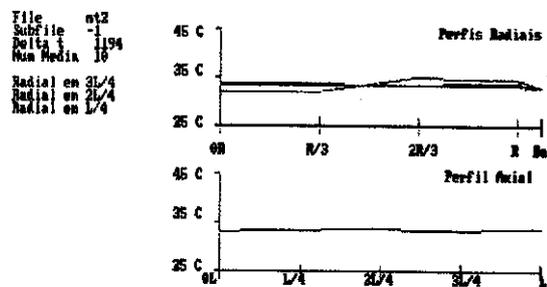


Figura 3.6.2.d- Comparação dos perfis da última aquisição antes do acidente.

3.6.3- Curvas de resultados da grade de experimentos

O tempo total esperado para que com margem de folga o reator atingisse o estado estacionário foi de 48 horas. A partir daí, foi executada a grade experimental que consiste em variar as condições experimentais e avaliar após estabilizado, qual a produtividade do núcleo em teste.

Os resultados da grade experimental em produtividade são mostrados nas figuras 3.6.3.a,b, sendo que a figura 3.5.2.b, é a plotagem dos pontos de produtividade obtidos a diferentes concentrações de alimentação, obtidos entre 2,5% e 15% de sacarose na solução nutriente. Há um ponto extra com concentração de alimentação 10%, obtido 3 dias após o término da grade experimental, apenas antes dos ensaios de eficácia volumétrica. Produtividades em g etanol por litro de leito de reação por hora.

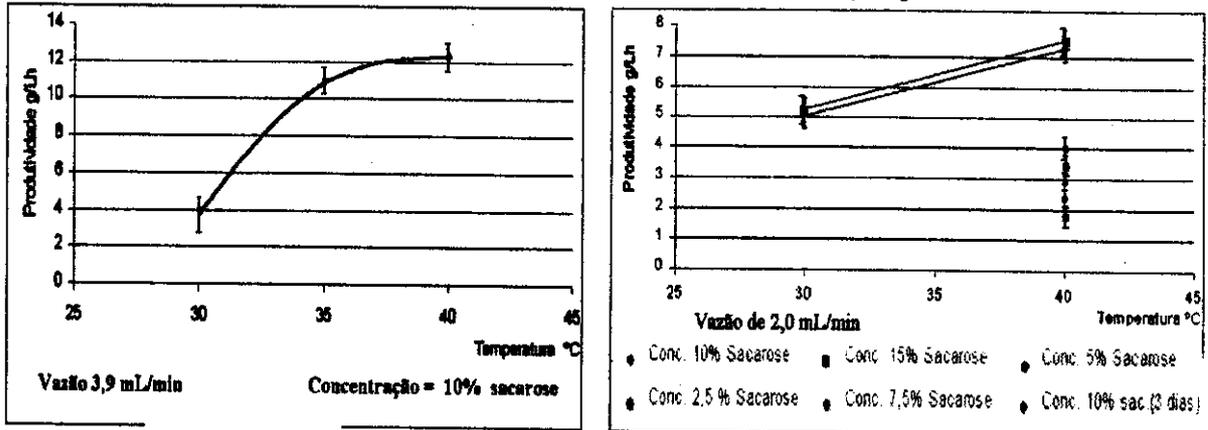


Figura 3.6.3. a,b-Produtividades de um núcleo com 10% de crisotila e 32,8 g de células imobilizadas, ensaios nas condições descritas acima.

3.6.4- Perfis térmicos de pontos da grade de experimentos

Para alguns pontos, apesar do acidente, foi possível recalibrar o sistema e adquirir dados nas condições dos experimentos de produtividade.

O ponto de máxima produtividade, a 40°C, $P = 12,3 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, para o qual temos as figuras 3.6.4.a, enquanto o reator ainda estava se estabilizando, e a figura 3.6.4.b, que mostra os perfis térmicos do reator em plena produção; mas há áreas de produtividade maior, indicadas pela temperatura maior, o que indica que o volume do reator não está sendo aproveitado ao máximo.

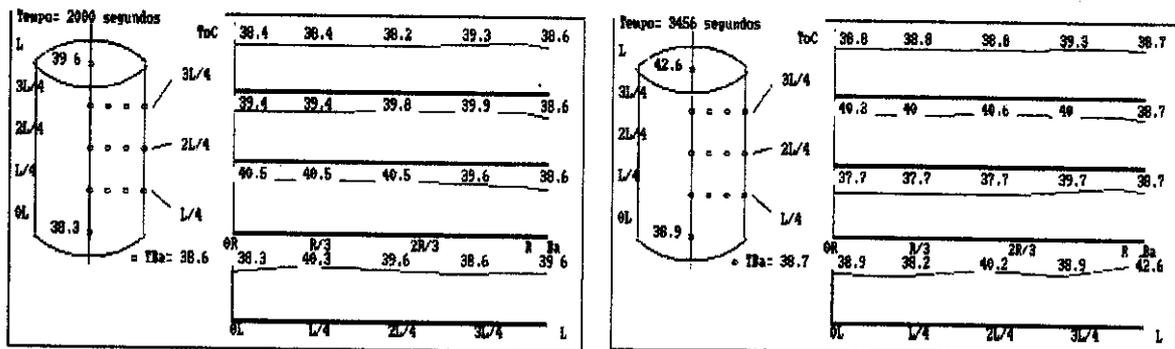


Figura 3.6.4.a- Reator com núcleo com 10% de crisotila e 32,8g de células, estabilizando em banho a 40°C para coleta de amostra.

Figura 3.6.4.b-Reator estabilizado na hora da coleta da alíquota para análise de produtividade, $P = 12,3 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

O ponto experimental dado por $T = 35^{\circ}\text{C}$, vazão $3,9\text{mL}/\text{min}$, concentração 10%, e produtividade $P = 11\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ tem nas figuras 3.6.4.c,d os perfis térmicos da estabilização para a coleta, e a condição na qual foi feita a coleta da alíquota para análise de teor alcoólico.

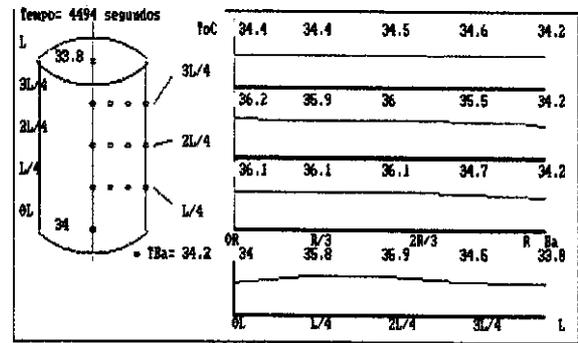
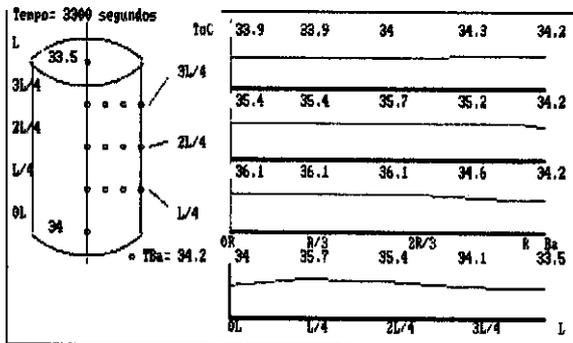


Figura 3.6.4.c- Reator com núcleo com 10% de crisotila e 32,8g de células, estabilizando em banho a 35°C para coleta de amostra.

Figura 3.6.4.d-Reator estabilizado na hora da coleta da alíquota para análise de produtividade, $P = 11\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

O ponto experimental dado por $T = 30^{\circ}\text{C}$, vazão $2,0\text{mL}/\text{min}$, concentração 10%, e produtividade $P = 5,1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ tem nas figuras 3.6.4.e,f, os perfis térmicos da estabilização para a coleta, e a condição na qual foi feita a coleta da alíquota para análise de teor alcoólico.

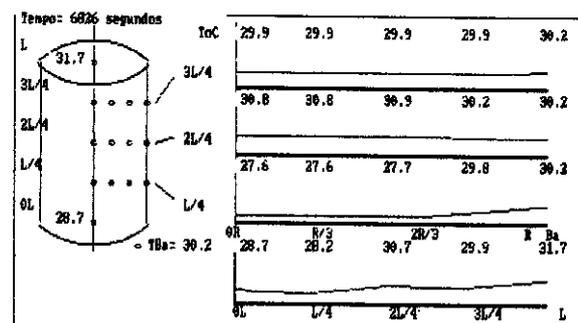
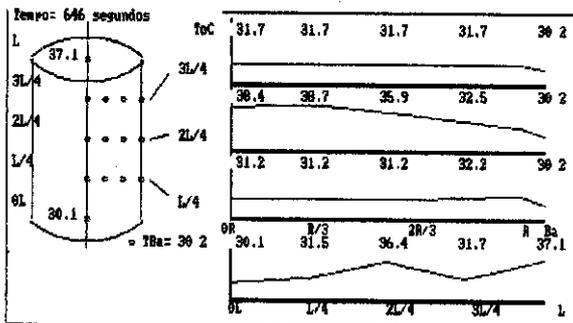


Figura 3.6.4.e- Reator com núcleo com 10% de crisotila e 32,8g de células, estabilizando em banho a 30°C para coleta de amostra.

Figura 3.6.4.f-Reator estabilizado na hora da coleta da alíquota para análise de produtividade, $P = 5,1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

3.7-Resultados dos estudos de eficácia volumétrica.

O aproveitamento volumétrico do núcleo do reator, ou seja, quanto do volume realmente participou da reação durante o ensaio, é um número bastante difícil de se estimar com precisão, mas através da figura 3.7.a, onde temos o reator sendo percorrido pelo suco de uva descrito na seção experimental correspondente, podemos perceber que boa parte da metade superior não está molhada, o que denota a não participação na reação. No detalhe ampliado da figura 3.7.b. é possível ver um canal de escoamento preferencial, que se formou ao redor da fiação dos sensores; e na figura 3.7.c, podemos ver o efeito do entupimento causado pela borra do suco de uva; e este entupimento avançando pelo canal preferencial da fiação a dentro.

A análise de eficácia volumétrica por cores em um leito fixo, é de avaliação apenas superficial, mas nos dá bons indícios do que realmente ocorre.



Figura 3.7.a- Reator sendo percorrido por suco de uva, pode-se observar o aproveitamento através das áreas molhadas, e a borra de uva entupindo a base, e entrando pelo canal preferencial da fiação,



Figura 3.7.b- Detalhe Ampliado de um canal preferencial de escoamento, este em torno da fiação dos sensores.

Figura 3.7.c- Detalhe da borra de uva entupindo a base do leito, e avançando carregada pelo suco de uva por um canal preferencial, no caso identificado como sendo causado pela fiação dos sensores.



3.7.1-Produtividade

Após efetuada a passagem de dois litros de suco de uva a uma vazão de 10.9 mL/min, $T = 40^{\circ}\text{C}$, foram colhidas duas amostras para análise do teor alcoólico, resultado que levou a uma produtividade, considerando-se o volume total do leito, 548 cm^3 de $P = 25,9\text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Se formos calcular a produtividade tendo como base o volume de líquidos no reator, 120 mL, teremos $P = 117\text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

3.8- Aproveitamento obtido pelo sistema eletrônico.

O sistema construído para este trabalho, apesar de ser um protótipo, adquiriu uma quantidade de dados razoável, houve aperfeiçoamentos durante os ensaios, tais como a mudança no capeamento dos sensores, e também acidentes. É interessante mostrar os resultados em termos de volumes de pontos amostrais. Resultados na tabela 3.8.

Tabela 3.8: Dados obtidos pelo sistema eletrônico on line, e o aproveitamento .

Série de experimentos	Bytes produzidos	Bytes aproveitáveis	%
Núcleo 5% crisotila	6 350 000	1 816 000	28,6
Núcleo 10% crisotila	9 218 000	3 467 000	37,0
Totais	15 568 000	5 283 000	33,5

IV-DISCUSSÃO

4.1- O efeito da mistura da fibra de vidro

Existem dois fatores de compatibilidade entre a crisotila e a fibra de vidro: o geométrico, e o eletrostático.

Quanto ao geométrico, ambos são materiais fibrosos, sendo que as fibras de vidro têm comprimento, espessura e largura muito maiores que as fibras de crisotila, que por sua vez apresenta enroscadas em si as fibrilas, com diâmetro da ordem de alguns nanômetros e comprimento da ordem de microns. Esta semelhança fibrosa possibilita que as duas espécies se entrelacem, ou seja, que consigam com que uma boa área de cada uma toque a outra.

Quanto ao de natureza elétrica, a crisotila tem um potencial zeta positivo, em ampla faixa de pH. A fibra de vidro, cuja estrutura muito se assemelha à sílica, tem um potencial zeta, negativo, em ampla faixa de pH. A mistura dos dois ingredientes é feita em água destilada. Podemos admitir $\text{pH} = 6.0$, onde os sinais de zeta são opostos. No entanto, existe o efeito do coeficiente dielétrico da água, $k = 78$, o qual enfraquece a interação dividindo a força de atração eletrostática pelo coeficiente dielétrico, em expressão química, solvata. Em solução aquosa, a mistura é facilmente moldável; após a secagem a estrutura apresenta uma rigidez advinda da coesão causada pela força eletrostática, a qual é aumentada pela ausência da água, e redução da distância.

Foram produzidos núcleos com várias concentrações de crisotila sobre fibra de vidro, onde a partir de 5% crisotila já se observa um efeito estruturador no leito seco. À medida que se aumenta o teor de crisotila, mais rígido e fechado ao escoamento fica o núcleo.

O efeito conseguido no processamento com a mistura da fibra de vidro a crisotila é a formação de uma mistura de sólidos que em solução aquosa podem ser moldados, e quando secos apresentam características de estabilidade geométrica, não soltando facilmente as fibras de aglomerado.

Quando um leito está entre as grades de retenção do reator, a força aplicada por elas tem um efeito sobre a porosidade, pois apertando diminui o volume de vazios para a mesma quantidade de sólidos, e flexionam-se as fibras que tenham esta liberdade de movimento, e o arranjo fica pré-tencionado.

Se for uma reação em fase líquida, na presença da água há um acomodamento, o núcleo tende a se moldar, e se a força inicial não for suficiente, canais preferenciais tenderão a se formar.

Os experimentos de fermentação da seção 2.5 não tiveram este problema, pois após montar o reator foi dado um aperto no parafuso das grades de retenção até o limite; já nos experimentos com sensores de temperatura este aperto foi menor, para evitar que os sensores nos pontos de medida fossem tirados de posição, o que permitiu a formação de alguns visíveis canais preferenciais. No entanto, a crisotila permaneceu em sua posição sem ser levada pelo fluxo, segurando as células imobilizadas.

4.2- A Oxidações de álcoois

Possivelmente não encontramos reações por não termos fornecido condições experimentais suficientes. A literatura citada na introdução descreve processos com temperaturas acima de 200°C e pressões de até 3 atm; mesmo assim, para outros catalizadores, Zucchetti [1] que conseguiu oxidar benzidrol a benzofenona o fez sob radiação de micro ondas, e não em um reator termostatizado.

Não excedemos em nossos experimentos por questão de segurança a 165°C , e

1 atm, o que possivelmente limitou os resultados a uma negativa de reações. Uma vez que a existem outros processos, vemos que termodinamicamente as reações são possíveis.

4.3-Os núcleos e seus efeitos no escoamento e na fermentação

Os núcleos demonstraram uma boa estabilidade, tanto frente a escoamentos de gases até 165°C como a escoamentos de fases aquosas em fermentações, saindo dos ensaios com as mesmas medidas que entraram, sem haver acúmulo de fibras de crisotila soltas na grade de saída do reator. Nos ensaios em fase gasosa operaram com pressões de pico de até 200 mmHg, sem afetar a geometria da estrutura. Nas fermentações, mesmo naquelas com mais alta vazão e produção de CO₂, a perda de carga ao longo do núcleo ficou em torno de 5 mmHg, contra os cerca de 300 mmHg relatados por Wendhausen [14].

A alta porosidade favorece a saída de gás. Isso evita perdas de viabilidade de células que fiquem imersas em bolhas estagnadas, contribuindo também com a produtividade. No entanto, a alta facilidade com que os gases saem lhes confere um deslocamento volumétrico que altera profundamente o padrão de escoamento do escoamento ideal pistão. Formam-se bolhas grandes que empurram o fluido reacional para o fim do leito, e com isso, empurrando reagentes para o final do leito de reação, derrubam a taxa de conversão, pois levam o reagente como que por um atalho até a saída.

O leito poroso formado não é homogêneo, dispõe de canais preferenciais, ou simplesmente fendas de diâmetro equivalente maiores e menores, que causam desvios no escoamento. Identificamos assim uma variável não prevista, o torque aplicado ao parafuso central responsável pela força entre as grades de retenção. Se a força entre as grades for suficiente, o leito será acomodado em uma posição a partir da qual pouca mobilidade será possível com a força das bolhas; e estando mais compactado, a distribuição interna será mais homogênea, melhorando o escoamento e aproximando mais do idealizado como um escoamento pistão.

O problema do desvio do escoamento do comportamento ideal pistão, causado pelas bolhas de CO₂, é mencionado em quase todos os textos citados em que os experimentos com colunas de células imobilizadas tenham atingido uma produtividade alta o suficiente para ter um fluxo de gás vigoroso. Autores como Gódia *et alli* [75] desenvolveram soluções como uma coluna de geometria variável ao escoamento, e Roca *et alli* [11] com uma coluna com vazão pulsante para melhorar a saída do CO₂, que prejudica a viabilidade e o escoamento.

O aumento do teor de crisotila de 5% para 10% torna o leito mais homogêneo, apto a imobilizar mais células; e mais problemático em relação ao escoamento, pois mais CO₂ será produzido. Em caso extremo, se a queda de pressão ao longo do leito for muito grande, o trabalho de L'Italien *et alli* [36] nos mostra que, para uma quantidade grande de gás dissolvido, este atua como um inibidor importante da fermentação.

4.4- A resolução do sistema eletrônico e a fermentação.

O sistema foi calibrado para perceber mudanças de 0,078°C, com as margens de erro dadas pelos fabricantes dos componentes eletrônicos [85]; temos em 0,15°C um valor razoável para a resolução. O erro máximo observado foi de +- 0,35°C.

Segundo Atkinson [69], os caminhos que podem ser tomados por uma determinada porção de reagentes dentro de um reator tubular podem levar a resultados muito diferentes. Isso se deve a diferenças de temperatura, uma vez que esta comanda a cinética de reação. Lehninger [29] ressalta que a temperatura comanda as velocidades

de reações enzimáticas nos seres vivos, e seu ponto de máximo para este caso está pouco abaixo do início da desnaturação irreversível das enzimas.

Ghose *et alli* [77] construíram um aparato que mede a temperatura em 8 pontos ao longo da sua coluna de fermentação, e obteve um perfil iniciando em 24°C indo até 29°C na saída.

Williams *et alli* [7] utilizaram a técnica de imagens por ressonância magnética nuclear para acompanhar o crescimento de uma cultura aprisionada em um reator de fibras ocas. O tipo de célula não é o mesmo, nem o tipo de reator, mas é muito útil saber como acontecem as coisas dentro de um reator, principalmente no nosso caso em que o limite de operação é razoavelmente estreito.

D'Amore *et alli* [30] nos dá a perspectiva de quanto é útil saber o ponto máximo de temperatura em que se pode operar um reator através de uma avaliação dos custos com as variações de temperatura necessárias ao processo. Sendo que, elevando-se a temperatura de operação do reator conseguem-se economias tanto na refrigeração deste como no aquecimento para a etapa de destilação.

O sistema construído nos permitiu acompanhar 15 pontos e identificar, pelo efeito térmico, algumas porções do volume que foram mais ativas, e áreas geometricamente mais propensas a danos por desnaturação devida a sobre aquecimento; ou seja, locais com maiores dificuldades de escoamento térmico.

Foram feitos ensaios para avaliação do equipamento antes dos experimentos com o núcleo com 5% de crisotila, e repetidos antes do ensaio com o núcleo com 10%. Foi achada uma baixa dispersão dos dados em torno da média, e em ambos os casos médias simples a cada 5 pontos como mostra a figura 3.4.2 foram suficientes para se obter uma curva contínua razoável em relação ao processo de aquecimento.

O processo de difusão do calor no núcleo do reator é visto nas figuras 3.4.3.a,b,c,d para a montagem com o núcleo com 5% de crisotila e as figuras 3.6.1.a,b para o núcleo com 10%. Pode-se observar a diferença no coeficiente de condutividade térmica do vidro do reator em relação ao núcleo pela diferença na declividade do primeiro segmento relativo à condução de calor pelo vidro, e os restantes. A saída do reator, na coordenada L aparece sempre com temperatura inferior ao restante em todas as medidas, porque este ponto ficou para fora do banho termostático. Os gráficos de sobreposição nas figuras 3.4.4.a,b,c,d nos mostram que dentro do reator a condução de calor não é homogênea.

A reação de conversão da sacarose em álcool é bastante exotérmica, conforme discutido na introdução na página 6, cerca de -31 kcal / mol, o que torna fácil localizar focos desta atividade através do aquecimento.

A figura 3.5.1.a mostra a distribuição térmica dentro do reator com núcleo com 5% de crisotila logo após receber 14,7g de células em água destilada, termicamente homogêneo e inativo, quando começou a receber a solução nutriente. Após aproximadamente 10 minutos, na figura 3.5.1.b, quando todo o reator já estava alimentado, podemos ver nos perfis térmicos pequenos picos, que nos mostram onde inicialmente o leite estava ativo. Acompanhando as figuras 3.5.1.b, 3.5.2.b, e 3.5.2.f, podemos visualizar como se deu o processo de desenvolvimento interno da colônia de células em seu rumo a um estado estacionário. Na figura 3.5.2.h podemos ver o grau de heterogeneidade da atividade dentro do reator, pelo menos nas imediações dos sensores.

O mesmo procedimento pode ser acompanhado para o reator com um núcleo com 10% de crisotila e 32,8 g de células imobilizadas, iniciando na figura 3.6.1.c,d,e,f, 3.6.2.a,b,c, de onde podemos comparar que o padrão de distribuição desenvolvido em cada um dos núcleos foi diferente. No entanto, no núcleo com 10% de crisotila, a distribuição parece mais homogênea, comparando as figuras 3.5.2.h e 3.6.2.d., o que

pode ser atribuído à concentração de crisotila por ser o dobro, e assim deve preencher melhor o espaço disponível.

A figura 3.6.4.b, gráfico dos perfis térmicos obtidos nas condições experimentais em que se obteve a maior produtividade nos mostra o aquecimento do início do leito com 38,9°C até o final com a média 42,6°C. No entanto, nos mostra que a $\frac{3}{4}$ do comprimento do reator a temperatura está mais baixa que na $\frac{1}{2}$ do caminho. Se simplesmente não houvesse reação, a temperatura seria no mínimo igual à do banho, mas isso demandaria um espaço muito grande para a troca de calor com tão pouca diferença de temperatura. Este efeito evidencia um canal preferencial de escoamento por onde uma parte do líquido do início do leito passa facilmente para o final, sem sofrer a reação. Este atalho pode ser observado nas figuras dos outros pontos experimentais, 3.6.4.a,b,c,d,e,f.

Na figura 3.6.4.e, obtida enquanto o reator era esfriado para o próximo ponto experimental, podemos observar com clareza que o perfil radial em $2L/4$, nos mostra uma área ativa sendo gradualmente levada a outra temperatura operacional menor, enquanto o perfil abaixo, o $L/4$ já recebeu líquido mais frio; este está perdendo calor pela parede do reator, e o seu perfil acima, o $3L/4$ já frio também, comprova que recebe líquido frio por algum atalho. Portanto, baseado nesta análise térmica, concluímos que existe um mecanismo de escoamento não homogêneo dentro deste leito, e podemos comprovar que o volume central é a região de maior acúmulo de calor e portanto a mais sensível a excessos de temperatura. Esta hipótese havia sido levantada após o ensaio de variação de temperatura, quando ao final, o reator foi desmontado e seu leito ao ser cortado mostrou, conforme a figura 3.3.3, a região central danificada.

Balanco dos problemas e acertos do sistema eletrônico

Este sistema tornou possível, como foi verificado, ter uma certa visão do que ocorre dentro do leito do reator em tempo real, através de medições com suficiente resolução da temperatura dos pontos nas coordenadas escolhidas. Bem simples se comparado com as imagens obtidas por RMN por Williams et alli [7], mas ajudou a chegar a conclusões.

O primeiro problema ocorreu com a proteção dos diodos sensores que estavam em contato com a solução. Eles tinham uma capa protetora de esmalte sintético, marca Coral, e a capa não resistiu e degradou, junto com os diodos, e destes só sobrou o vidro. Todos foram substituídos e recapeados, e o sistema recalibrado.

Um segundo problema foi um acidente: respingou água com hipoclorito de cálcio usado como sanitizante no banho termostático do reator, sobre os circuitos dos termômetros eletrônicos, foi feita uma lavagem e uma recalibração. Por algum tempo funcionou, depois os dados tornaram-se inadequados, mas continuaram a ser gravados, pois serviram para o aprimoramento do sistema de aquisição de dados, do sistema de interfaceamento, e do programa de controle.

Houve problemas com o número de conjuntos de medições que se podia gravar em um arquivo, e com o número de arquivos que o DOS sustentava em um diretório. Com alguns experimentos o sistema foi aprimorado, e foi adquirido um conjunto total de 15 Mb de dados experimentais.

O sistema foi projetado para conseguir um bom aproveitamento do espaço de memória, gravando os dados na forma de um byte por medição por sensor, conforme foram adquiridos do conversor A/D. A tabela 3.8 mostra o aproveitamento dos dados.

Se pudéssemos construir um sistema com mais pontos monitorados, teríamos uma resolução bem mais acurada do que se passa no interior do leito de reação, e um sistema

de posicionamento dos sensores que permitisse comprimir mais o leito sem problemas de posicionamento nos permitiria estudar um reator com melhor distribuição interna, e consequentemente melhor performance.

4.5- O efeito da temperatura

Segundo as referências Moulin *et alli* [31], Sá-Correia *et alli* [32], Leão *et alli* [33], e Thatipamala *et alli* [34], existe um limite onde células livres se reproduzem, fato este muito importante para reatores com técnicas que envolvam células livres onde a viabilidade e a produtividade estão intimamente ligadas à reprodução. Mas para reatores com células imobilizadas, a alta taxa de reprodução não só não é necessária como deve ser evitada, pois células no efluente significam custos com separação e perda de substrato com biomassa, balanço evidenciado por Aguilera *et alli* [39] como fator $Y_{p/x}$. Por outro lado, se nunca permitirmos que haja condições de reprodução, estaremos abrindo mão de um recurso de auto regeneração de nossos sistemas, ponderação feita também por Dale *et alli* [90].

Foi observado que, quando o reator operava a temperaturas abaixo de 32°C, a solução efluente era bem turva. Isso significa células em suspensão, pois a solução reagente era incolor, e quando a temperatura era superior a 37°C, o efluente estava cristalino, ou seja se houvesse células seriam muito poucas, portanto, é possível operar o reator por um período em seu ponto de maior rendimento $Y_{p/x}$, e depois periodicamente deixá-lo regenerar-se a uma temperatura mais amena.

4.6- O efeito dos nutrientes

Segundo Voet *et alli* [22], o magnésio participa do catabolismo da glicose, logo nas primeiras etapas, juntamente com o fosfato inorgânico quando abrem o anel do carbo-hidrato, e Walker *et alli* [26] em seu estudo determinaram as concentrações mínimas para que haja atividade celular. Até 13 μM quase não há reprodução; a partir disso, esta dispara atingindo um patamar em 500 μM ; a concentração de Mg é outro modo de se segurar e controlar a reprodução celular.

Nos ensaios desenvolvidos neste trabalho, não foi adicionado a solução nutriente nenhum sal de magnésio no intuito de verificar se em situação de carência a célula seria capaz de utilizar o metal na forma de hidróxido da superfície da crisotila. Não foi. Foi observada uma lenta queda no rendimento que pode ser vista através da produtividade do ensaio com núcleo com 10% de crisotila onde o ponto obtido com 10% sacarose, 2 mL/min, e 40°C tinha uma produtividade de $P = 7,5 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, e o mesmo ponto avaliado 3 dias depois apresentou $P = 4,0 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Aparentemente houve uma lenta desativação do sistema celular por carências de nutrição, as quais quando repostas pelo suco de uva no ensaio de eficácia volumétrica, podem ter colaborado com a reação na produtividade.

A condição de oxigenação utilizada nos ensaios foi estritamente anaeróbica, o que segundo Cysewsky *et alli* [27] compromete o desempenho a longo prazo. Segundo ele uma pequena pressão parcial de O_2 , da ordem de menos de 1,7 mmHg ajuda na manutenção celular de sua estrutura e de suas enzimas, mais um motivo para a reação observada no ensaio volumétrico: o suco de uva tinha sido batido em liquidificador, o que garante a saturação de ar dissolvido, e naquela situação, provavelmente necessário.

Muitos autores usam aditivar a solução nutriente com algum complemento supridor de amino ácidos, tais como extrato de levedura, Peptone ou equivalentes. Neste trabalho não foi utilizado nenhum reforço deste tipo, pois em escala industrial encareceria o produto.

4.7-Produtividades

A Produtividade foi avaliada em função de 4 variáveis: concentração de crisotila no núcleo, temperatura do banho, concentração de sacarose na alimentação, e vazão de alimentação.

Em relação ao teor de crisotila nos leitos, os dois estudos obtidos neste trabalho, 5% e 10% de crisotila ativada sobre fibra de vidro em base de peso, nos mostram que nestes limites a massa de células imobilizada é proporcional à de crisotila. Isso quer dizer que aparentemente quanto mais fibra melhor, pois haverá mais células trabalhando no mesmo espaço; no entanto, será pior o escoamento, tanto nos desvios causados pelas bolhas que serão geradas em proporções maiores, como será maior a perda de carga ao longo do leito. Conforme L'Italiem et alli [36] demonstraram, o CO₂ em solução também é um inibidor potente, e em reatores maiores para indústrias será necessário cuidado no projeto para que a perda de carga não seja elevada o suficiente para forçar a solubilização do CO₂ produzido, e assim atrapalhar ao invés de ajudar.

Considerando as referências [31-35] que descrevem os efeitos de inibição por substrato, por produto em função da temperatura, além de sua influência na viabilidade das células, e o trabalho de Stanley et alli [38], que descreve uma técnica para reduzir o efeito de fase lag causado por choques térmicos, e ou etílicos, podemos observar tendências que, nas condições experimentais para o leito com 5% de crisotila, são vistas na figura 3.5.3.b. Houve um pronunciado declínio na produção para os pontos tirados com solução 15% de sacarose a 30°C e a 40°C frente aos pontos nas mesmas condições, com solução 10% de sacarose. As deficiências são de cerca de 50%.

A hipótese de choque etílico pode ser descartada antes de mais nada, pois os teores alcoólicos obtidos nestes pontos eram muito baixos para qualquer inibição. Choques térmicos e por excesso de substrato também não, pois houve um tempo de adaptação suficiente antes da amostragem.

A possibilidade é que estas tendências se devam ao efeito de uma composição de fatores inibidores que se somam de maneira mais repressiva a 30°C e a 40°C do que se manifestam a 35°C.

Para o leito com 10% de crisotila as mesmas tendências a efeitos de inibição podem ter ocorrido, só que para uma inibição de 50% sobre uma população ativa com o dobro de elementos, teremos aproximadamente o mesmo resultado, o que efetivamente ocorreu e pode ser visto na figura 3.6.3.b. Para as mesmas vazões e temperaturas, as curvas para as concentrações de 10% e 15% de sacarose quase coincidem dentro de suas margens de erro.

Estas tendências significam que pode haver um patamar de produtividade no intervalo da variável concentração de alimentação, entre 10% e 15% p/v de sacarose, e um ponto de máximo em torno de 40°C, tendendo para o lado da concentração de 10%.

4.8- O ensaio de eficácia volumétrica

Foi de valia para a compreensão do processo de escoamento que ocorria. Quando o núcleo foi percorrido pela solução vermelha de suco de uva, foi confirmado que a parte superior do leito, a 3L/4, como já previsto pelo sistema térmico, não estava participando da reação, conforme figura 3.7.a..

Alguns canais preferenciais externos puderam ser visualizados pela coloração mais avermelhada conforme a figura 3.7.b. .

Ocorreu um efeito inesperado: a borra da uva, composta por pedaços da casca triturados pelo liquidificador que passaram pela peneira, entupiram os canais

preferenciais maiores forçando o fluxo a permear mais o leito mais fechado, como mostra o detalhe da figura 3.7.c. Deste modo, uma vez entupidos os canais maiores, o fluxo é forçado pelos menores que sobraram, melhorando a distribuição de reagentes, e possibilitando um acréscimo na parcela do leito participante da produtividade.

Aliado a esta melhora no escoamento tínhamos uma solução de alimentação saturada de ar, e oxigênio, e elementos naturais da fruta que se supõe faltavam para as células esgotadas, como sais minerais, Mg, e vitaminas.

Este ensaio foi executado depois do ponto experimental tirado com a solução 10% de sacarose após 3 dias na figura 3.6.3.b, que já mostrava o esgotamento das células com uma produtividade menos da metade da inicial nas mesmas condições, e mostra uma surpreendente reação na produtividade.

A regeneração é prevista em vários artigos que citam regeneração por oxigenação, em especial o de Cysewsky et alli [27]. A melhora no desempenho também é prevista por Walker et alli [26] e esperada, uma vez que não havia sido adicionado nenhum Mg na solução nutriente até então.

O *Saccharomyces cerevisiae* é um fungo encontrado na natureza geralmente em uvas doces.

V - CONCLUSÕES

Leitos fixos a base de crisotila e fibra de vidro.

É possível produzir leitos fixos a base de crisotila ativada com teores desta a partir de 5% m/m com fibra de vidro.

Entre 5% e 10%, quanto maior a relação de massa entre a crisotila e a fibra de vidro mais rígido fica o leito, e capaz de reter mais imobilizados. No entanto a estrutura fica mais fechada.

Podem ser produzidos com reprodutibilidade, e transportados ou guardados por até um ano devido a sua estabilidade mecânica, a qual também reduz a emissão de fibras que estão eficazmente empacotadas.

Os leitos fixos a base de crisotila e fibra de vidro apresentam um comportamento geométrico estável durante fermentações, facilitam a saída do CO₂, e reduzem a queda de pressão através do leito.

Os leitos fixos com 6,4% de crisotila ativada produziram um escoamento estável e de baixa perda de carga, resistindo o arranjo, a pressão de um fluxo gasoso sem apresentar deformações até 200 mmHg e 165°C.

Para teores de crisotila entre 5% e 10% p/p sobre fibra de vidro, a porosidade média calculada como sendo o quociente entre o volume de vazios sobre o volume total ficou em 0.22.

Fermentação alcoólica em leito fixo de crisotila ativada com fibra de vidro.

A produtividade máxima de etanol obtida foi de 12,5 g.L⁻¹.h⁻¹, tendo como base o volume total do leito de reação.

Leitos produzidos com mais crisotila, no intervalo de 5% a 10%, imobilizam mais células. Isso leva a uma maior produtividade.

Os leitos produzidos por esta técnica permitem que o gás produzido saia com facilidade, e o movimento deste causa mistura axial.

A força aplicada entre as grades de retenção do leito é importante para evitar que este se acomode ao fluxo de gás durante as fermentações, formando canais preferenciais de escoamento.

Instrumentação eletrônica computadorizada.

Adquiriu 5 milhões de pontos experimentais aproveitáveis.

A calibração adotada permitiu uma resolução de $0,15^{\circ}\text{C}$, para os 15 pontos monitorados.

Tornou possível acompanhar, em tempo real e com detalhes, as temperaturas dentro do leito do reator. Armazenou os dados obtidos acompanhados da coordenada temporal de cada um para estudos posteriores.

A distribuição espacial do aquecimento e conseqüentemente da reação não é homogênea.

A distribuição espacial da temperatura é mais homogênea no leito com mais crisotila. Comparando-se leitos de 5% com os de 10% crisotila sobre fibra de vidro p/p.

Em fermentações, as regiões centrais do leito são as mais propensas a sobre-aquecimento, e assim mais sensíveis a perdas de células por desnaturação térmica.

Oxidação de álcoois.

Não foi verificada nenhuma reação de oxidação, nem produzida por MnO_2 imobilizado em crisotila em um núcleo com fibra de vidro em fase gasosa até 165°C , nem do TiO_2 nas mesmas condições sobre os álcoois, metanol, etanol, n-propanol, i-propanol, n-butanol, 2-butanol.

Foi verificado um coeficiente de Fanning diferente para cada álcool quando escoando em fase gasosa através dos núcleos testados.

VI-REFERÊNCIAS

- [1] ZUCCHETTI, R. A. M., Crisotila brasileira como suporte para catalisadores. Aplicação na oxidação de álcoois com radiação de micro ondas. Tese de doutorado, IQ/UNICAMP, 1994
- [2] PARIZOTTO JR., O., Crisotilas naturais brasileiras: ativação da superfície e aplicação na imobilização de biocatalisadores. Tese de mestrado, IQ/UNICAMP, 1989.
- [3] GIONGO, C.V.T., Estudo de deposição de TiO₂ sobre crisotila brasileira. Tese de Mestrado, Instituto de Química- UNICAMP, 1995.
- [4] VALERIO, F., BALDUCCI, D. , LAZZAROTTO, A., Adsorption of proteins by crisotile and crocidolite: Role of molecular weight and charge density. Environmental Research, vol 44, p. 312-320, 1987.
- [5] BRITO, A., Governo fiscaliza amianto na indústria. Correio Popular, p. Economia 1, Campinas, 26/ agosto/ 1998.
- [6] Hill Jr., C. G. , A Introduction to Chemical Engeneering Kinetics & Reactor Design, 1ª ed., John Wiley & Sons, USA, p.245-316, 1977.
- [7] WILLIAMS, S. N. O., CALLIES, R. M. , BRINDLE, K. M., Mapping of oxygen tension and cell distribution in a hollow-fiber bioreactor using magnetic resonance imaging., Biotechnology Bioengineering, Vol. 56, p.56-61, 1997.
- [8] SIQUEIRA FILHO, E. P., Efeito da temperatura na cinética de fermentação alcoólica contínua com alta densidade celular. Tese de Mestrado, UNICAMP 1997.
- [9] CARVALHO, B. S., Efeito da temperatura na cinética de morte celular e em fermentação alcoólica contínua com reciclo de células. Tese de Mestrado UNICAMP 1996.
- [10] XU, P., THOMAS, A. , GILSON, C.D., Combined use of three methods for hight concentration ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*., Biotechnology Letters, vol 18, p. 1439-1440, 1996.
- [11] ROCA, E., FLORES, J., NÚÑES, M. J., LEMA, J. M., Ethanolic fermentatiom by immobilized *Sacchromyces cerevisiae* in a semipilot pulsing packed-bed bioreactor. Enzime and Microbial Technology, vol. 19, p. 132-139, 1996.
- [12] HAMANCI, H., RYUT, D. D. Y. , Performance of traped column packed-bed bioreactor for ethanol production. Biotechnology Bioengineering, Vol. 29, p.994-1002, 1987.
- [13] Foust, A. S. *et alli* , Principio das operações unitárias. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan., p. 566, 1982.
- [14] WENDHAUSEN JR., R., Estudo sobre utilização de crisotila como suporte de

- células de *Saccharomyces cerevisiae* para uso em processo contínuo de fermentação alcoólica e biorreduções, Tese de Doutorado, Instituto de Química – UNICAMP, 1998.
- [15] YANG, V., Perspectivas da indústria etanolquímica no Brasil. Revista Termodinâmica, p.23-33, fev./mar. 1980.
- [16] BISCAIA JR., E. C., CALDEIRA, A. C., Discriminação de modelos e estimativa de parâmetros cinéticos da desidrogenação do etanol a acetaldeído. Revista Brasileira de Engenharia Química, p. 26-34, dezembro, 1982.
- [17] MACIEL FILHO, R., DOMINGUES, A., A Multitubular reactor for obtension of acetaldehyde by oxidation of ethil alcohol. Chemical Engineering Science, vol 47, p. 2571-2576, 1992.
- [18] REED, GERALD, Yeast Technology, 2nd ed., AVI Book, p. 252-259, 1991
- [19] FIESCHKO, J. C., EGAN, K. M., RITCH, T., KOSKY, R. A., JONES, M., BITTER, G. A., Controled expression and purification of human immune interferon from high-cell-density fermentations of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Bioengineering, Vol. 29, p.1113-1121, 1987.
- [20] CARSEN, M., JOCHUMSEN, K. V., EMBORG, C., NIELSEN, J., Modeling the growth and Proteinase A production in continuous cultures of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Bioengineering, Vol. 55, p. 447-454, 1997.
- [21] INLOW, D., McRAE, J., BEM-BASSAT, A., Fermentation of corn starch to ethanol with genetically engeneered yeast. Biotechnology Bioengineering, Vol. 32, p.227-234, 1988
- [22] VOET, D., VOET, J. G., Biochemistry. 2nd ed. New York, John Wiley & Sons, inc., p.6, p.304-305, p.444, 1995.
- [23] McNALLY, R., Atlas of the body. Rand McNally & Company, p.60, 1980.
- [24] VITOLO, M., Produção de açúcar invertido a partir da Invertase de levedura. Revista Brasileira de Engenharia Química, Vol. 12, N^o 2, p. 40, 1989.
- [25] LEHNINGER, A. L., Bioquímica, 2^a ed., vol 2, Edgard Blucher, p.314, 1976.
- [26] WALKER, G.M., MAYNARD, A. I., Magnesium-limited growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme Microbiology Technology, vol 18, p. 455-459, 1996
- [27] CYSEWSKI, G. R., WILKE, C. R., Utilization of cellulosic materials through enzymatic hydrolysis: I. Fermentation of hydrolysate to ethanol and single cell Protein., Biotechnology Bioengineering, Vol. 18, p.1297-1313, 1976.
- [28] BECK, J. S., Bio-membranes. Washington, Hemisphere Publishing, p 16-17, 1980.
- [29] LEHNINGER, A. L., Bioquímica, 2^a ed., vol 1, Edgard Blucher, p. 134, 1976.

- [30] D'AMORE, T. , CELOTTO, G. , RUSSEL, I., STEWART, G.G., Selection and optimisation of yeast suitable for ethanol production at 40°C. Enzyme Microbiology Technology, vol 11, p. 411-416, 1989.
- [31] MOULIN G. , Temperature profiles of ethanol tolerance: Effects on the minimum and maximum temperatures for growth of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*, Biotechnology Bioengineering, Vol. 25, p.1665-1666, 1983.
- [32] SÁ-CORREIA, I. , VAN UDEN, N. , Ethanol induced death of *Saccharomyces cerevisiae* at low and intermediate growth temperatures. Biotechnology Bioengineering, Vol. 28, p.301-303, 1986
- [33] LEÃO, C., VAN UDEN, N. , Effects of ethanol and other alkanols on kinetics and the activation parameters of thermal death in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Bioengineering, Vol. 24, p.1581-1590, 1982.
- [34] THATIPAMALA, R., ROHANIS., HILL, G. A. , Effects of high product and substrate inhibitions on kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentation. Biotechnology Bioengineering, Vol. 40, p.289-297, 1992.
- [35] ABOUTBOUL, H. , SCHMIDELL, W. , KERSNER, A. L., Modelo matemático para fermentação alcoólica análise de parâmetros. Revista Brasileira de Engenharia Química, p. 35-42, vol. 11, fevereiro,1988.
- [36] L'ITALIEN, Y., THIBAUT, J., LEDUY, A. , Improvement of ethanol fermentation under hyperbaric conditions. Biotechnology Bioengineering, Vol. 33, p. 471-476, 1989.
- [37] CYSEWSKY, G. R., WILKE, C.R., Rapid ethanol fermentation using vacuum and cell recycle. Biotechnology Bioengineering, Vol. 19, p.1125-1143, 1977.
- [38] STANLEY, G. A. , HOBLEY, T. J. , PAMMENT, N. B. , Effect of acetaldehyde on *Saccharomyces cerevisiae* and *Zimomonas mobilis* subjected to environmental shocks., Biotechnology Bioengineering, Vol. 53, p.71-78, 1997
- [39] AGUILERA, A., BENÍTEZ T., Relationship between growth, fermentation, and respiration rates in *Saccharomyces cerevisiae*: A study based on the analysis of the yield Y_p/x . Biotechnology Bioengineering, Vol. 32, p.240-244, 1988.
- [40] Morrison, R. T. & Boyd, R. N., Química Organica . 7ª ed. FUNDAÇÃO CALOUSTE GULBENKIAN, Lisboa, Portugal, p. 610-611, 1973.
- [41] BERTELI, L. G. , Dezesesseis anos de Proálcool. STAB, Vol. 11, No. 1, Setembro-Outubro, 1992.
- [42] VILLEN, R. A., Micro usinas para a produção de álcool etílico. Revista Brasileira de Engenharia Química, Vol. 4, Nº 3/4, p.30-32, 1980.

- [43] SANTOS, F. G., Sorgo sacarino: Mais uma fonte de álcool, D.R. Embrapa, p. 14-17, maio, 1980.
- [44] DAY, D. F., SARKAR, D., Fuel alcohol from sweet sorgum: Microbial aspects. Development of Industrial Microbiology, Vol. 23, p. 361-366, 1982.
- [45] MATSUOKA, H., KOBA, Y., UEDA, S., Alcoholic fermentation of sweet potato without cooking. J. of Fermentation Technology, Vol. 60, No. 6, p. 599-603, 1982.
- [46] AZHAR, A F., BERY, M. K., COLCORD, A R. , ROBERTS, R. S., Development of yeast strain for the efficient ethanol fermentation of wood acid hidrolizate. Development of Industrial Microbiology, Vol. 23, p. 351-360, 1982.
- [47] BANERJEE, M., DEBNATH, S. , MAJUNDAR, S.K., Production of alcohol by direct fermentation, Biotechnology Bioengineering, Vol. 32, p. 831-834 , 1988.
- [48] SZCZODRAK, J., The enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated weat straw to ethanol. Biotechnology Bioengineering, Vol. 32, p. 771-776, 1988.
- [49] ABOUTBOUL, H., SCHMIDELL, W. , BONOMI, A., Modelagem matemática da fermentação alcoólica de hidrolizado de mandioca. Revista Politecnica, p. 35-38, outubro, 1985.
- [50] QUEIROS, M. S., RODRIGUES, E. G. C. , ANDRADE, G. D. R. , SILVA, G. H. , Aumento do tempo de utilização de uma usina de álcool de cana com a utilização de matéria prima amilácea. Revista Brasileira de Engenharia Química, p. 7-14, dezembro, 1982.
- [51] GIBONS, W. R. , WESTBY, C.A., ARNOLD, E. Semicontinuous diffusion fermentation of fooder beets for fuel ethanol and cubed protein feed production. Biotechnology Bioengineering, Vol. 31, p.696-704, 1988.
- [52] WILKE, C. R., CYSEWSKI, G. R., YANG, R .D. , VON STOCKAR, U. , Utilization of cellulosic materials through enzymatic hidrolisis. II. Preliminary assessment of na integrated processing scheme. Biotechnology Bioengineering, Vol. 18, p.1315-1323, 1976.
- [53] KLING, H. S. , CARVALHO NETO, C. , Enhacement of enzymatic hidrolisis of sugar cane bagasse by steam explosion pretratment. Biotechnology Bioengineering, Vol. 29, p. 1035-1039, 1987.
- [54] GEFI & RETHERM., Alemão abre mais a célula. Química e Derivados, jan.-fev., p. 19, 1981.
- [55] YU, S. , WAYMAM, M. , PAREKH, S. K., Fermentation to ethanol of pentose containig spent sulphite liquour. Biotechnology Bioengineering, Vol. 29, p.1144-1150, 1987.
- [56] SEEGER do BRASIL, Como recuperar o CO₂ das dornas. Química e Derivados, jan.-fev., p. 22, 1981.

- [57] MATSUOKA, S., Reciclagem energética a partir de vinhoto e bagaço. Culturas Energéticas e Biomassa, p. 21-23, Vol. 1, No 3, set. / out., 1982.
- [58] OLIVEIRA JR, L. L., Sistemas agroindustriais integrados. Culturas Energéticas e Biomassa, p. 14-16, No 4, nov./dez., 1982.
- [59] ROMANO, S., Óleos vegetais - Diesel alternativo. Culturas Energéticas e Biomassa, p. 34-42, No 4, nov./dez., 1982.
- [60] Reportagem, Ester etílico de óleo de soja. Culturas Energéticas e Biomassa, p. 24-25, No 4, nov./dez., 1982.
- [61] Brasil Energia, (Petrobras- Ministério das Minas e Energia) Nº 208, p. 50, março 1998.
- [62] O mundo depois da RIO 92. Revista Visão, p.56-60, 24 de junho de 1992.
- [63] MATTIASON, B., Immobilized Cells and Organelles. vol. I, vol. II, CRC Press, Boca Raton, p.298, 1983.
- [64] OGBONA, J. C., LIU, Y. C., TANAKA, H., Loofa (*Luffa Cylindrica*) sponge as a carrier for microbial cell immobilization. Journal of Fermentation and Bioengineering, vol. 78, p. 437-442, 1994.
- [65] KANA, K., KANNELAKI, M., PSARIANOS, C., KOUTINAS, A., Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on mineral Kissiris. Journal of Fermentation and Bioengineering, vol. 68, p.144-147, 1989.
- [66] TYAGI, R. D., GUPTA, S. K., CHAND, S., Process engineering studies on continuous ethanol production by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. Process Biochemistry, vol. 27, p. 23-32. 1992.
- [67] JOEKES, I. COMERLATO, M. H., PARIZOTTO JR, O., PEDROSO, P. R., MORAN, P.J.S., RODRIGUES, J.A.R., DE CARVALHO, M., "Processo de preparação de crisotilas de alta superfície específica, e crisotila obtida", Patente Brasileira INPI 8.903.8449 de 01/08/1989.
- [68] CHANG, H. N., SEONG, G. H., YOO, I. K., PARK, J. K., Microencapsulation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells with Invertase activity in liquid-core alginate capsules. Biotechnology Bioengineering, Vol. 51, p.157-162, 1996
- [69] ATKINSON, B., Biochemical Reactors, Pion Limited, England, p.29-34, 46-51, 1974.
- [70] DOURADO, A., GOMA, G., ALBUQUERQUE, U., SEVELY, Y., Modeling and static operation of the ethanol production in cascade reactor. I Modeling. Biotechnology Bioengineering, Vol 29, p. 187-193, 1987.

- [71] JARZEBSKI, A. B., MALINOWSKI, J.J., GOMA, G., Modeling of ethanol fermentation at high yeast concentrations. Biotechnology Bioengineering, Vol. 34, p.1225-1230, 1989.
- [72] RYU, D.D.Y., KIM, H.S., TAGUCHI, H., Intrinsic fermentation kinetic parameters of immobilized yeast cells. Journal of Fermentation Technology, vol. 62, p. 255-261, 1984.
- [73] WILLIAMS, D. , MUNNEKE, D. M. , The production of ethanol by immobilized yeast cells. Biotechnology Bioengineering, Vol. 23, p.1813-1825, 1981
- [74] WATANABE, T., AOKI, T., HONDA, H., TAYAMA, KOBAYASHI, T., Production of ethanol in repeated-batch fermentation with membrane-type bioreactor. Journal of Fermentation and Bioengineering, vol. 69, p. 33-38, 1990.
- [75] GÓDIA, F., CASAS, C., SOLÀ, C., Mathematical modelization of a packed-bed reactor performance with immobilized yeast for ethanol fermentation. Biotechnology Bioengineering, Vol. 30, p.836-843, 1987.
- [76] TYAGI, R. D., GHOSE, T. K., Studies on immobilized *Saccharomyces cerevisiae*, I. Analysis of continuous rapid ethanol fermentation in immobilized cell reactor. Biotechnology Bioengineering, Vol. 24, p.781-795, 1982.
- [77] GHOSE, T. K. , BANDYOPADHYAY, K. K. , Studies on immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. II. Effect of temperature distribution on continuous rapid ethanol formation in molasses fermentation. Biotechnology Bioengineering, Vol. 24, p.797-804, 1982.
- [78] BANDYOPADHYAY, K. K, GHOSE, T. K Studies on immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. III. Physiology of growth and metabolism on various supports. Biotechnology Bioengineering, Vol. 24, p.805-815, 1982.
- [79] SOBOTTA, Atlas de Anatomia Humana. 20^a ed., Guanabara Koogan, p.94, p.97, p.101, 1993.
- [80] GARTNER & HIATT, Atlas de Histologia. Guanabara Koogan., p 190-191, 1993.
- [81] DULIN, V., ELECTRON DEVICES. Mir Publishers Moscow, p.261, 1980.
- [82] MILLMAN & HALKIAS, Eletrônica .Vol. 1, McGraw-Hill do Brasil, p.55-58, 1981.
- [83] PERTENCE JR, A. , Amplificadores Operacionais e Filtros Ativos. 4^a ed., McGraw Hill, p. 47-67, 1990.
- [84] KALVODA, R., Operational Amplifiers in Chemical Instrumentation. Elis Horwood Limited, England, p. 116-120, 1975.
- [85] The National Semiconductor Handbook. Ic ADC 0808, p. 8-45 8-55, The National Semiconductor Corporation, USA, 1992.

[86] The National Semiconductor Handbook. Ic 8255 A-5 , p. 370-381, Itaucom, Brasil, 1993.

[87] IODETA, I. V., CAPUANO, F. G., Elementos de Eletrônica Digital. 5ª ed. P. 206-210, 325-359, 379-408, 1993.

[88] MALCOME-LAWES, D. J., Microcomputers and Laboratori Instrumentation. 2nd ed., Plenum Press, England, p. 125-145, 1988.

[89] COOPER, JAMES W., Microsoft QuickBASIC for Scientists: A Guide to Writing Beter Programs. John Wiley & Sons, New York , p. 280, 1988.

[90] DALE, M. C. , CHEN, C., OKOS, M. R., Cell growth and death rates as factors in the long-term performance, modeling, and design of immobilized cell reactors. Biotechnology Bioengineering, Vol. 36, p.983-992, 1990.

[91] OLIVEIRA, M. C. F. L., ANGELIS, D., Levedura selvagem ameaça produção de álcool. FOLHA DE S. PAULO, p. g-2, 19 de junho de 1990.

**Agradeço a Deus,
pela persistência e inspiração.**