

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**



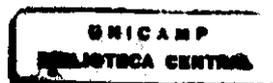
**Ativação da Superfície da Crisotila Brasileira em
Reatores de Batelada com Fluxo de Ar, CO₂ e Argônio
Utilização como Suporte de Células de *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação de Mestrado

**Paula Hanao Filloy
Orientadora: Prof. Dra. Inés Joekes**

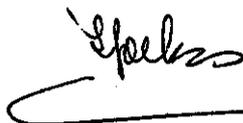
Setembro / 2000

200101694



BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Inés Joeques (Orientadora)



Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre (FEA-UNICAMP)



Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran (IQ-UNICAMP)



Este exemplar corresponde à redação final da
Dissertação de Mestrado defendida pela aluna
PAULA HANAO FILLOY, aprovada pela Comissão
Julgadora em 28 de setembro de 2000.



Prof. Dra. Inés Joeques
(Presidente da Banca)

**Aos queridos companheiros desta vida, pelo carinho e compreensão
Alfonso, Toshie, Eduardo, Júlio, Elvira e Felipe**

E a todos que trabalham pela Crisotila Brasileira

Agradecimentos. . .

À Inés, por acreditar e investir na minha formação profissional, e por prestar tantas outras informações "mui preciosas" para toda vida.

Aos colegas e amigos de grupo: Adriana, Flávio, Flávia, Nádia, Euler, Carla, Maria Alice, Soraya, Ana Luísa, Carol, Atílio, Antonio, César, Alexandre, Rener, Maurício, Jão, Fernando e ao Adriano, por toda a bondade. . .

Ao Dirnei, amigo de todas as horas e outros tantos desafios, e ao Oscar por todos os "craus" nos lugares mais inesperados.

Ao André pela amizade, incentivo e carinho de tantos anos, e pela eterna paciência de saber esperar. . .

Ao Maurício por todas as vezes que precisei de células e pela troca de idéias e informações valiosas sobre fermentação. . .

À Flávia pelo trabalho de Microscopia realizado e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica/IF - USP.

À Adriana pela "mãozinha" nos experimentos mais difíceis.

Ao Flávio pelas palavras de encorajamento e pela companhia nos fins de tarde.

Aos queridos Pedro Vazquez e Klaus pelas boas risadas e companhia agradável durante o tempo de escrita, e ao Cordeiro por cuidar tão bem da pcserver :)

Ao professor Renato Atílio pelo carinho e incentivo do dia-a-dia, pela capela de fluxo e por tantas portas abertas. . .

À professora Teresa Atvars, pelos elogios aos cafés (quando estava pronto) e por ser esta fortaleza, que muito admiro.

Aos acólitos do grupo, Denise, Carlinhos, Pilha, Ricardo, e em especial ao Duda.

Aos queridos companheiros de Férias em Floripa I, feijoadas, vacas atoladas & afins: Pinguim, Perfil, Pipoca, Rafaela, Janaína, Binhão, Nara, Ivan, Silvia, Pedro, Garga, Simone, Saulinho e ao querido Alexandre, companheiro de inúmeros laboratórios. . . FERAS DO MAR!

À Carol Giongo por me apresentar à crisotila e pelo incentivo.

Aos Durans pelas muitas festas na eterna casa do Euler. . .

À Ercíla, Joecy, Divino, Paula, Mané, "seu" Maurinho, Rose, Nelson, Toninho, Lúcia, Dara, Ledenice, Bel, André, Marco, Eliete e Luisa o meu muito obrigada.

À SAMA e a FAPESP por acreditarem na pesquisa e pelo auxílio concedido.

**Ativação da Superfície de Crisotila Brasileira em
Reatores de Batelada com Fluxo de Ar, CO₂ e Argônio
Utilização como Suporte de Células de *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertação de Mestrado: Paula Hanao Filloy
Orientadora: Prof. Dra. Inés Joekes
Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6145 - CEP 13083-970 - Campinas - São Paulo - Brasil

RESUMO

A crisotila brasileira é empregada como suporte na imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* no processo de fermentação de melão. Este suporte é previamente ativado por sonicação, em solução tampão equimolar de ácido acético/acetato de sódio por 30 minutos.

Neste trabalho, um processo alternativo de ativação, baseado em reatores de fluxo de gás é apresentado. Os reatores foram preenchidos com água ou solução tampão, e amostras de crisotila jateada foram adicionadas, sob fluxo de gás (ar, CO₂ ou argônio), por 1 ou 5 horas. Este procedimento, retira o material que não atua como suporte e ativa a crisotila, aumentando sua área superficial. A ativação foi avaliada pelo aumento da capacidade de adsorção de monocamada, pela adsorção de azul de metileno em solução.

Para testar a eficiência deste método de ativação, células de *Saccharomyces cerevisiae* foram suportadas na crisotila tratada nos reatores, seguidos por ensaios de fermentação alcoólica para avaliar a atividade das células suportadas. Foi observado um aumento de 20% na velocidade de produção de CO₂ (a 150, 250 e 300 g de glicose / L), quando comparadas às células livres. Isto significa que as células suportadas terminam o processo de fermentação antes das células livres. As crisotilas tratadas nos reatores apresentam desempenho semelhante a crisotila ativada por ultra-som. A adição de amostras de crisotila em sistemas com células de *Saccharomyces cerevisiae* (1:10 crisotila/células) foi testada na fermentação de melão. Foi observado um aumento na velocidade de produção de CO₂ em aproximadamente 30%, quando comparado ao sistema sem a adição de crisotila, apenas nos primeiros 30 minutos de fermentação.

Brazilian Chrysotile as Support for *Saccharomyces cerevisiae*: Activation of the Support Using Gas Flow in Batch Reactors

Master Thesis of Paula Hanao Filloy

Adviser: Prof. Dr. Inés Joeques

Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas

Caixa Postal 6145 - CEP 13083-970 - Campinas - São Paulo - Brasil

ABSTRACT

Brazilian chrysotile is used as support for *Saccharomyces cerevisiae* in sugar cane fermentation processes. The support is previously activated by sonication in equimolar acetic acid/sodium acetate buffer for 30 minutes.

In this work, an alternative process, based on gas flow in batch reactor was studied. Reactors were filled with water or buffer solution, and samples of washed chrysotile added. The reactors were bubbled under constant gas flux with air, or CO₂, or argon, for 1 or 5 hours. This procedure allows the removal of useless materials from the support, and allows the fibers to split (fibrilize) increasing their surface area. The activation was followed by the increase in the monolayer adsorption capacity through methylene blue adsorption from solution.

In order to test the performance of the gas-flow activated chrysotiles, *Saccharomyces cerevisiae* was supported onto them and fermentation experiments were performed. The supported cells showed roughly a 20% increase in the rate of CO₂ production (at 150, 250 and 300 g of glucose per liter) when compared with the free ones. This means that the fermentation process is completed quite sooner for the supported systems. Also, the gas-flow activated chrysotiles showed a performance as good as the sonication activated chrysotile. The addition of small amounts of chrysotile in systems containing *Saccharomyces cerevisiae* (1:10 chrysotile/cells) was tested for molasses fermentation. The initial rate of CO₂ production was also improved in roughly 30%, compared with systems containing no chrysotile, but the effect lasted for only approximately 30 minutes.

PAULA HANAO FILLOY**Súmula Curricular**

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Bacharel em Química, com atribuições tecnológicas – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP 1997.

ATIVIDADES PROFISSIONAIS RELEVANTES

- Execução de trabalho de iniciação científica intitulado: “Estudo da deposição de partículas de látex sobre crisotila brasileira”, sob orientação da Prof. Dra. Inés Joekes (setembro de 1997 a fevereiro de 1998).
- Execução de Projeto de Química Aplicada e Industrial (IQ-UNICAMP) intitulado: “Caracterização química e físico-química de tapetes de PVC”, sob orientação do Prof. Dr. José de Alencar Simoni, em parceria com a 3M do Brasil (agosto a dezembro de 1997).
- Execução de trabalho de iniciação científica intitulado: “Estudo da reação do cluster $[\text{Hf}_4(\text{CO})_{10}(\mu\text{-PPh}_2)]$ com o fosfa-alquino $\text{BuC}\equiv\text{P}$ e com a fosfina bidentada $\text{Ph}_2\text{PC}\equiv\text{CPh}_2$ e estudo da estabilidade térmica do dímero $[\{\text{Hf}_4(\text{CO})_9\text{PPh}_2\}_2\text{Ph}_2\text{PC}\equiv\text{CPh}_2]$ ”, sob orientação da Prof. Dra. Maria Domingues Vargas (agosto de 1996 a agosto de 1997).
- Execução de trabalho de iniciação científica intitulado: “Reações do fosfa-alquino $\text{BuC}\equiv\text{P}$ com ligantes acetilenos e acetiletos coordenados a carbonilas trinucleares de rutênio”, sob orientação da Prof. Dra. Maria Domingues Vargas (maio de 1995 a abril de 1996).
- Execução de trabalho de iniciação científica intitulado: “Novos derivados do cloreto cianúrico: síntese, caracterização e reações com compostos de metais de transição”, sob orientação da Prof. Dr. Pedro Faria dos Santos Filho (abril de 1994 a março de 1995).

ÍNDICE

CAPA	i
FICHA CATALOGRÁFICA	ii
BANCA EXAMINADORA	iii
DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
SÚMULA CURRICULAR	viii
ÍNDICE	ix
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Amianto	1
1.2 - Crisotila	1
1.3 - Ativação de superfícies	3
1.4 - Produção de etanol	4
1.5 - Imobilização de células para a produção de etanol	6
2 - OBJETIVOS	8
3 - EXPERIMENTAL	9
3.1 - Materiais e instrumentos	9
3.2 - Rota experimental	10
3.3 - Crisotila	10
3.3.1 - Obtenção de crisotila jateada.....	11
3.3.2 - Obtenção de crisotila ativada.....	11
3.3.3 - Obtenção de crisotila tratada com fluxo de gases.....	11
3.4 - Reatores para tratamento de crisotila jateada	12
3.4.1 - Reatores de 600 mL com fluxo de ar.....	12
3.4.2 - Reatores de 2 L com fluxo de ar, CO ₂ e argônio.....	13
3.5 - Isotermas de adsorção de azul de metileno sobre crisotila	14
3.5.1 - Isotermas de adsorção de azul de metileno sobre crisotila jateada e sobre crisotilas retiradas das zonas fluidizadas dos reatores de 600 mL e de 2 L.....	15

3.6 - Adesão de fermento de pão sobre crisotila jateada, ativada e retirada das zonas fluidizadas dos reatores de 600 mL e 2 L.....	16
3.7 - Atividade fermentativa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> suportadas em crisotila.....	16
3.7.1 - Preparo das células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
3.7.2 - Meios de fermentação de D-glucose enriquecido.....	17
3.7.3 - Preparo dos discos de crisotila contendo células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> suportadas.....	18
3.7.4 - Montagem dos sistemas de batelada para fermentação de meio estéril de D-glucose por células suportadas em discos de crisotila.....	18
3.7.5 - Montagem dos sistemas de batelada para fermentação de melaço por células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> suportadas em crisotila nas proporções 1:0,6 crisotila/células.....	19
3.8 - Atividade fermentativa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> usando crisotila como acelerador na fermentação de melaço em sistemas de batelada.....	20
3.8.1 - Preparo das células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
3.8.2 - Meios de fermentação de melaço.....	21
3.8.3 - Montagem dos sistemas de batelada para fermentação de melaço por células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , utilizando crisotila como aditivo nas proporções 1:10 e 1:5 crisotila/células.....	21
3.9 - Micrografias Eletrônicas de Varredura.....	23
4 - RESULTADOS.....	24
4.1 - Ativação da superfície da crisotila e avaliação da fibrilação.....	24
4.1.1 - Tratamento da crisotila.....	24
4.1.1.1 - Ensaio exploratório para o tratamento de crisotila jateada em reatores de 600 mL, com fluxo de ar.....	24
4.1.1.2 - Tratamento de crisotila jateada em reatores de 2 L com fluxo de ar, CO ₂ e argônio.....	25
4.1.1.3 - Medidas de pH dos meios utilizados nos reatores de água destilada e de solução tampão com fluxo de ar, CO ₂ e argônio e na ausência de aeração.....	26
4.1.2 - Medida da ativação da superfície de crisotila tratada.....	27
4.1.2.1 - Isotermas de adsorção de azul de metileno sobre crisotila jateada.....	27
4.1.2.2 - Isotermas de adsorção de azul de metileno sobre crisotila retirada das zonas fluidizadas dos reatores de 600 mL e 2 L.....	28
4.2 - Adesão de células e avaliação da atividade celular na presença de crisotila.....	37
4.2.1 - Adesão de fermento de pão sobre crisotila.....	37
4.2.1.1 - Adesão de fermento seco de pão e fermento seco instantâneo de pão sobre crisotila jateada e ativada.....	37
4.2.1.2 - Adesão de fermento de pão sobre as crisotilas retiradas das zonas fluidizadas dos reatores.....	38

4.2.2 - Atividade fermentativa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> suportada em crisotila...	39
4.2.2.1 - Atividade fermentativa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> suportada em crisotila, na fermentação de D-glucose.....	39
4.2.2.2 - Atividade fermentativa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> suportada em crisotila, na fermentação de melação.....	42
4.2.3 - Atividade fermentativa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> usando crisotila como acelerador na fermentação de melação.....	44
4.2.3.1 - Fermentação de melação por células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , utilizando crisotila como acelerador nas proporções 1:10 e 1:5 crisotila/células.....	44
4.3 - Microscopia Eletrônica de Varredura.....	48
4.3.1 - Microscopia Eletrônica de Varredura das crisotilas 5R tal como recebida da mina e após tratamento.....	48
4.3.2 - Microscopia Eletrônica de Varredura de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em crisotila tratada.....	56
5 - DISCUSSÃO	
5.1 - Homogeneidade da crisotila 5R.....	59
5.2 - Comparação da atividade crisotila tratada nos reatores com a ativada.....	60
5.3 - Crisotila como aditivo na fermentação de melação.....	61
6 - CONCLUSÕES.....	64
7 - REFERÊNCIAS.....	66
8 - ANEXO.....	70
8.1 - Fermentação de melação por células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizando crisotila como acelerador nas proporções 1:10 e 1:5 crisotila/células.....	70

1 – INTRODUÇÃO

Atualmente, crisotila é usada principalmente na construção civil, na fabricação de produtos de fricção, têxteis, filtros, papéis e papelões, isolantes térmicos e pisos vinílicos. Entretanto, a capacidade de adsorção/adesão, notável estabilidade térmica, resistência a ataque alcalino, por ser inerte a solventes orgânicos e por apresentar hábito fibroso, faz da crisotila um material nobre, muito aplicado em filtração eletrocinética, que pode ser utilizado como suporte de catalisadores, na imobilização de células e na formação de leitos fixos.

1.1 – Amianto

Amianto ou asbestos é um termo genérico aplicado a um grupo de minerais que ocorrem na natureza em forma fibrosa macroscópica, variando desde uma fibra longa macia e sedosa, até uma massa de fibras curtas, duras e quebradiças. A cor do amianto varia do branco ao cinza-esverdeado, marrom-amarelado ou azul. A maioria tem um brilho sedoso ou nacarado e são todos opacos.¹

Existem vários tipos de amiantos, que se distinguem por sua composição química e estrutura cristalina. São divididos em duas classes de acordo com suas estruturas cristalinas: os anfibólios e as serpentinas.²

- anfibólios: crocidolita, amosita, antofilita, tremolita e actinolita
- serpentinas: antigorita, picrolita e crisotila.

Dentre as variedades de minerais asbestiformes, a crisotila é a de maior importância comercial, correspondendo a 99% de todo amianto utilizado atualmente.

1.2 – Crisotila

A crisotila é um silicato de magnésio fibroso de fórmula química $3\text{MgO} \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, cuja formação está relacionada às modificações metamórficas ocorridas em rochas ultrabásicas de origem vulcânica.^{3,4} Sua estrutura é única e altamente organizada, constituída por 16 a 18 bicamadas de brucita-silicato, enroladas coaxialmente, as quais formam uma fibrila.⁵ Cada bicamada é composta por uma lâmina ou folha tetraédrica de silicato e por uma lâmina octaédrica de brucita $\text{Mg}(\text{OH})_2$ (Figura 1). As fibras de crisotila

são constituídas por fibrilas cilíndricas agrupadas paralelamente e preenchidas por material não cristalino.^{1,6-8}

A crisotila é considerada um material de boa resistência química e estabilidade térmica. É bastante estável a temperaturas de até 450°C. Acima de 450°C, o hidróxido de magnésio superficial é irreversivelmente convertido a óxido de magnésio e as fibras tornam-se quebradiças.⁶ Em meios altamente básicos ($\text{pH} > 10$), a dissolução da camada de silicato conduz ao desenrolamento das fibras.⁷ Do ponto de vista químico, a crisotila é pouco resistente a ataques por ácidos fortes, que destroem a camada de brucita, restando somente sílica.⁸

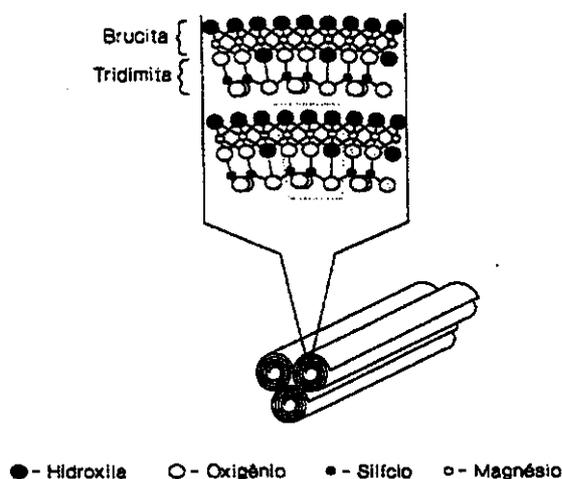


Figura 1: Esquema representativo da estrutura lamelar de crisotila, com destaque para a estrutura de parte da dupla lamela constituinte da crisotila, a mais externa referente à brucita e a mais interna à tridimita.

A área superficial específica da crisotila é da ordem de $14 \text{ m}^2/\text{g}$, após tratada e ativada.⁷ Martinez e Zucker,⁹ realizaram medidas de potencial de fluxo e obtiveram a curva de potencial zeta variando o pH. Observaram um potencial positivo entre pH 3 e 12 da ordem de 100 mV e ponto isoelétrico em pH 11,8. A superfície da crisotila é constituída por grande quantidade de sítios doadores, $\text{Mg}(\text{OH})_2$, os quais apresentam atividade catalítica.¹⁰ A crisotila é um suporte excepcional devido ao seu poder de adsorção; existe em grande abundância na natureza; apresenta inércia química, térmica e biológica; apresenta baixo custo e passível de reaproveitamento.¹¹

Parizotto⁶ realizou medidas do grau de fibrilização da crisotila após ter sido tratada com ultra-som, através do método de adsorção de azul de metileno, utilizando isotermas linearizadas segundo o modelo de Langmuir. O modelo de Langmuir,¹² originalmente deduzido para a adsorção de gases em sólidos, considera que a superfície do adsorvente é constituída de sítios de adsorção homogêneos; e todas as espécies adsorvidas interagem somente com os sítios ativos, desconsiderando as interações entre as moléculas adsorvidas, isto é, a adsorção é limitada a uma única monocamada. A maioria dos sistemas de adsorção na superfície de um sólido, a partir de uma solução líquida, obedecem o modelo de Langmuir somente a baixas concentrações de adsorbato. Por esta razão, a importância dos dados obtidos a baixas concentrações deve ser mais ressaltada.⁶

Em nosso grupo de pesquisa, a crisotila foi utilizada na obtenção de filtros de profundidade, no estudo da ativação de sua superfície e aplicação na imobilização de biocatalisadores.^{6,13,14} Outros estudos referem-se à adsorção de espécies quirais em crisotila, interação da crisotila com TiO₂, adsorção nos sítios ativos da crisotila e aplicações na fase estacionária para HPLC. A crisotila também foi utilizada como suporte para catalisadores inorgânicos e enzimas, e na degradação de dodecilbenzenosulfonato de sódio (DBS).^{7,10,15-18} As patentes obtidas são referentes à obtenção de crisotila com alta atividade superficial e na produção de etanol.^{8,10,11}

1.3 – Ativação de superfícies

Durante o processo de fabricação ou beneficiamento, a superfície dos materiais pode sofrer alterações que interferem no desempenho de processos futuros. A formação de óxidos sobre superfícies metálicas e siliconadas, incorporação de hidrogênio em metais depositados por eletrólise, água e solventes em polímeros, partículas resultantes de processos abrasivos e micro-fissuras podem diminuir a eficiência dos materiais, principalmente em processos que envolvam reações com sítios reativos.¹⁹ A fim de melhorar o desempenho destes materiais, é realizada a ativação de sua superfície.

A ativação da superfície de um material pode ser definida como um processo que promove um aumento, mesmo que temporário, de sítios ativos na superfície.¹⁹ A escolha do processo de ativação, que envolve modificações físicas e/ou químicas da superfície do material, depende das características que o material deverá apresentar durante o processo no qual será empregado. Os métodos de modificação física para tratamento de fibras

naturais se caracterizam por ativar a superfície sem modificá-la quimicamente; dentre eles, podemos citar: calandragem, estiramento, tratamento térmico, ultra-som, remoção de partículas com solventes.^{6,20-22} Os métodos de modificação química de superfície são geralmente empregados quando as superfícies dos materiais não apresentam afinidade entre si. Alguns exemplos são: inclusão de um terceiro material para promover a interação entre elas, mercerização, modificação da superfície após tratamento com ácido.^{21,23-27}

Atualmente, em nosso grupo de pesquisa, o processo de ativação da crisotila é realizado como descrito na Patente BR. 8.903.849, que utiliza ultra-som e solução tampão de HAc/NaAc.¹³ A aplicação de ultra-som a um sistema agregado por forças de van der Waals deve promover a separação dos componentes agregados. Esta é a principal vantagem do ultra-som em um grande número de aplicações. Na crisotila, a sonicação provoca a fibrilização dos feixes. Este tratamento em solução tampão de HAc/NaAc aumenta a capacidade de adsorção na superfície da crisotila, comparado ao realizado em água. O efeito causado pela utilização de solução tampão pode ser interpretado como uma “ativação”, devido ao aumento da carga superficial e do potencial zeta das fibrilas. Este aumento deve promover a repulsão entre as fibrilas, aumentando a eficiência do tratamento.⁶

1.4 – Produção de etanol

A produção de etanol em escala comercial é feita a partir do etileno, derivado do petróleo, ou por fermentação de açúcares ou outros carboidratos. As primeiras indústrias brasileiras a produzir etanol em larga escala, surgiram vinculadas às usinas açucareiras, onde o melaço, um sub-produto da fabricação do açúcar, com baixo valor comercial, era utilizado como substrato fermentativo. No início da década de setenta, a crise mundial do petróleo motivou a produção de etanol para sua utilização como combustível alternativo, devido ao alto preço da gasolina no mercado interno e ao risco de desabastecimento. O primeiro programa para a produção de álcool combustível a partir da cana-de-açúcar, o Proálcool, surgiu no Brasil em 1975. Nos Estados Unidos em 1978, e mais recentemente no Canadá, foram criados programas para a produção de etanol a partir do milho. Embora muitos outros países produzam etanol como combustível e para outros fins,ⁱ a produção de

ⁱ <http://www.distill.com/berg/>

etanol em larga escala só pode ser adotada por países de agricultura favorável e economicamente viável. Atualmente, apenas os incentivos fiscais governamentais tornam o álcool combustível comercialmente viável, em decorrência da diminuição do preço do barril de petróleo. Além da produção de álcool combustível a partir da cana-de-açúcar, algumas usinas tem utilizado a vinhaça para a produção de biogás, o bagaço de cana autolizado para ração animal; comercializado leveduras secas, e gerado energia elétrica a partir da queima do bagaço da cana.^{8,28-30}

A fermentação em condições anaeróbicas consiste na metabolização da glicose em etanol por microrganismos. Essa conversão pode ser representada estequiometricamente por: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$. A glicose é degradada pelo microrganismo em 10 etapas, até a produção de piruvato, que é transformado em CO_2 e etanol em processo anaeróbico. Glicerol e outros álcoois podem ser produzidos dependendo da linhagem do microrganismo e condições de fermentação. O rendimento teórico de etanol é de 51,1 g, obtido a partir de 100 g de glicose. Em processos industriais, o rendimento varia entre 80 a 91%. A redução no rendimento é atribuída ao substrato empregado no crescimento celular e à formação de subprodutos. Entretanto, o processo de fermentação depende de parâmetros do meio ambiente, como pH, temperatura, e dos microrganismos utilizados.³¹⁻³⁴

Na década de 80, surgiram as primeiras publicações que relacionavam o aumento nos valores de produção de etanol, por células de *Saccharomyces* sp, ao meio de fermentação utilizado. A diminuição na produção de etanol pelas leveduras estaria relacionada com o acúmulo de etanol durante a fermentação, que levaria a inibição do metabolismo celular.^{35,36} A adição de suplementos como extrato de levedura, peptona, íons cálcio e magnésio em meios de fermentação de glicose, aumentava a tolerância a etanol pelas células, ocasionando aumento de sua produção.³⁷ Dombek e Ingram,³⁸ atribuíram o aumento da tolerância das células de *Saccharomyces* sp ao etanol produzido a presença de íons magnésio no meio de fermentação. Outros autores também comprovaram que a adição de íons magnésio em meio de fermentação de glicose, ocasionavam melhora no crescimento celular, e aumento na produção de etanol.³⁹⁻⁴²

O caldo extraído da cana-de-açúcar e o melaço apresentam, respectivamente, valores médios de 15 e 65% (m/V) de açúcar redutor total (ART), que após ajustes dos níveis de açúcares adequados para a fermentação, apresentam quantidades suficientes de minerais e nutrientes orgânicos necessários para a produção imediata de etanol por células

de *Saccharomyces cerevisiae*. Alguns destes nutrientes são: o inositol, ácido pantotênico, biotina, magnésio, cálcio, zinco, manganês, ferro, cobre, molebidênio, cobalto e boro. Entretanto, nem todos os constituintes são benéficos para o processo, dentre eles podemos citar: o alumínio, mercúrio, chumbo, estanho, sódio, lítio, flúor, ouro, prata, cádmio, paládio, ósmio, cromo, tório, urânio, vanádio e potássio em níveis elevados; além da decantação de substâncias que não são fermentáveis.²⁸

1.5 – Imobilização de células para a produção de etanol

Imobilização de células é um termo utilizado quando as células são impedidas de se mover livremente em todas as partes da fase aquosa, por métodos naturais ou artificiais. O método de imobilização e o tipo de suporte depende das características do microrganismo e das condições de uso do sistema. Os principais fatores que afetam esses sistemas são pH, natureza do solvente e da substância a ser imobilizada, força iônica e a proporção adsorvente/substância imobilizada.⁴³⁻⁴⁷

Estudos realizados com sistemas de células de microrganismos imobilizados mostraram-se atrativos e promissores para a produção econômica de etanol, uma vez que a produção em sistema contínuo com células imobilizadas é superior ao processo convencional que utiliza células livres. O primeiro processo que utilizou o sistema de células imobilizadas foi para a produção de vinagre no início do século. Atualmente, as enzimas e/ou células imobilizadas são utilizadas em estudos de produção de etanol, ácidos orgânicos, aminoácidos, antibióticos, esteróides, entre outros produtos.⁴⁸⁻⁵¹

As células podem estar imobilizadas pela ligação ao suporte (adesão), onde ocorre a ligação direta das células com o suporte a partir de forças de van der Waals, pontes de hidrogênio ou ligações hidrofóbicas, de modo a causar pouca alteração a estrutura das células.^{32,48,49} Como suportes, podemos citar: madeira, ágar, resina aniônica, bagaço de cana, carvão ativado, celulose, partículas de cerâmicas e suportes inertes.⁴⁸⁻⁵¹ No entanto, estes métodos apresentam grande problema de dessorção das células durante os processos de lavagem e operação. Outro método utilizado para imobilização é o de ligação cruzada, onde ocorrem ligações intermoleculares entre as próprias células do microrganismo ou das células ao suporte, ao se adicionar um agente reticulante, como o glutaraldeído, formando uma rede polimérica insolúvel. Em outro método conhecido como aprisionamento, as células ocupam os interstícios de um gel ou são encapsuladas por uma membrana

semipermeável, que minimiza a perda de células.^{34,47} Neste caso, a barreira física de gel prejudica a difusão do substrato para o interior das células. São utilizados como suporte: alginato de cálcio, carragena-k, ágar e poliacrilamida.^{46,52}

A imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em kissiris, um mineral de composição semelhante ao granito, foi relatada por Kana e colaboradores.⁵³ Kissiris é um material poroso, que apresenta em sua composição: SiO₂, Al₂O₃, TiO₂, Fe₂O₃, FeO, MnO, MgO, CaO, Na₂O, K₂O e P₂O₅. As células imobilizadas em kissiris produziram etanol em maior quantidade do que as células livres, a partir de melão e de glicose.

O principal método de imobilização para a produção de etanol é por adesão. As vantagens apresentadas por este método são: a imobilização pode ser feita em condições brandas; a possibilidade de reutilização do suporte e do biocatalisador; maior quantidade de células pode ser utilizada em suporte com grande área superficial; produção em regime contínuo por um longo tempo; aumento da estabilidade enzimática e da produtividade; a reação pode ser interrompida com a remoção do suporte e a diminuição dos riscos de contaminação.^{43,54}

A imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* sobre crisotila para a produção de etanol foi estudada em nosso grupo de pesquisa. Os resultados mostraram que as células imobilizadas apresentaram rendimento 20% superior a produção de etanol utilizando células livres. Este sistema é eficiente para a produção de etanol em alta concentração e, com a otimização das condições de fermentação pode vir a reduzir os custos de fabricação do produto.¹¹

Prakasham e colaboradores⁵⁵ observaram que ao adicionar pequena quantidade de suportes inertes ao meio de fermentação, as células de *Saccharomyces cerevisiae* aceleram a produção de etanol. A adição de suportes em quantidades menores pode fazer com que grande parte das células não esteja diretamente aderida ao suporte. Os autores sugerem que a adição de menor quantidade de suporte seria um sistema mais facilmente implementado e de menor custo, se comparado ao processo de imobilização celular.

A interação célula/suporte, bem como o aumento da quantidade de células suportadas, muitas vezes necessita de um pré-tratamento do suporte, a fim de aumentar sua área superficial e o número de sítios ativos.

2 – OBJETIVOS

A utilização dos reatores de batelada com vazão de gás para a ativação da superfície da crisotila surgiu com a observação dos reatores montados para a produção de etanol durante Convênio FUNCAMP/SAMA 95.1/96, e da necessidade de substituição do processo de sonicação na ativação da crisotila. Este novo processo possibilitará sua montagem em escala de planta piloto, em etapa futura. Nos reatores montados durante a vigência do Convênio em 1998, as células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em crisotila ativada por ultra-som, foram submetidas a um fluxo ascendente de melão. Durante o processo de fermentação do melão, foi observado o depósito de material empacotado no fundo do reator, abaixo da região sob fluxo ascendente. O material empacotado, aparentemente, apresentava baixa quantidade de células aderidas sobre sua superfície e “parecia se desprender” da crisotila, durante o processo de fermentação.

Assim, os objetivos deste trabalho são:

→ Tratar a crisotila em reatores com água destilada ou solução tampão de HAc/NaAc utilizando fluxo de gases, para retirar o material empacotado e fibrilar a crisotila;

→ Avaliar a fibrilização da crisotila tratada nos reatores, utilizando o método de adsorção de azul de metileno e o modelo de Langmuir;

→ Determinar a quantidade de células de *Saccharomyces cerevisiae* aderida sobre as crisotilas tratadas;

→ Verificar, durante a fermentação de glicose, a atividade fermentativa das células livres e das células suportadas nas crisotilas tratadas;

→ Avaliar a atividade fermentativa das células em sistemas contendo pouca crisotila, proporção de 1:10 crisotila/células, na fermentação de melão.

3 - EXPERIMENTAL

3.1 – Materiais e instrumentos

Os materiais utilizados foram: HAc 99,7%, HCl 36,5-38,0%, HNO₃ 65%, Uréia PA-ACS, MgSO₄ PA-ACS (Nuclear); H₂SO₄ 95,0-98,0%, NaCl PA-ACS, NaAc PA-ACS, Azul de metileno PA-ACS, D-glucose PA-ACS (Labsynth); álcool comercial, melão proveniente da Usina Ester (Arthur Nogueira-SP), cedido por Maurício Rigo; papel indicador de pH Sigma[®] Chemical Company, nas faixas de 0 a 6 (P-4661) e de 7 a 14 (P-4411), sensibilidade de 0,5; e na faixa de 0 a 7 (P-4786), sensibilidade de 1,0; cilindros contendo CO₂ comercial e argônio comercial (White Martins); cubeta de quartzo SUPRASIL[®], caminho óptico de 10 mm (Hellma); garrafas PET, do refrigerante Coca-Cola[®] de 600 mL e 2 L; peneira tipo Tyler com tela de aço inoxidável de 250 mesh; telas de aço inoxidável de 250 mesh; “glass filter holder” Millipore e fumil de pirex adaptado; membrana Millipore RA em éster de celulose, 1,2 µm de poro, 47 mm de diâmetro.

A cepa de *Saccharomyces cerevisiae* utilizada é a FEA 01, da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP. Foram utilizados os fermentos biológico seco e biológico seco instantâneo provenientes da Produtos Alimentícios Fleischmann e Royal Ltda.

Os instrumentos utilizados foram: balança analítica Fisher-Scientific A-250; balança semi-analítica Marte AS 2000 C; ultra-som Sonifier B-12 (25 kHz); banho termostático tipo Dubnoff Nova Técnica; incubadora refrigeradora orbital Marconi MA 830; centrifugador Excelsa Baby Fanem[®] 204 N; espectrofotômetro digital Micronal B 342 II; estufa convecção gravidade Fanem[®] 311 CG; capela de fluxo laminar vertical Veco HLFS 09; reguladores de pressão Concoa para argônio e CO₂ placa agitadora com aquecimento Corning Brasil PC-320; pipeta automática de volume variável (1-5 mL), SEALPETTE[®] [Jencons (Scientific) Ltd] e pipetas automáticas de 10 e 50 µL, Kacil Indústria e Comércio Ltda.

3.2 – Rota experimental

A Figura 2 mostra um esquema da rota experimental desenvolvida neste trabalho.

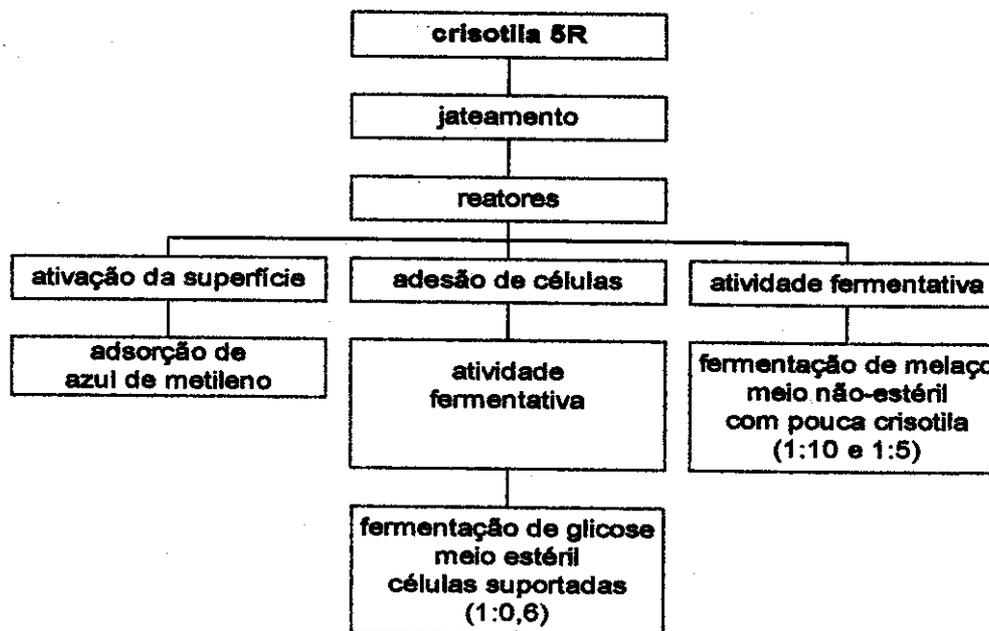


Figura 2: Esquema da rota experimental desenvolvida neste trabalho.

3.3 - Crisotila

Foi utilizada a crisotila brasileira proveniente da mina de Cana Brava (Minaçu-GO), cedida pela SAMA Mineração de Amianto Ltda. As fibras utilizadas foram do tipo 5, subgrupo R, classificadas de acordo com o padrão de classificação canadense e baseado em ensaio granulométrico realizado em uma máquina denominada *Quebec Standard Testing Machine*. Neste ensaio, 16 onças (1 onça = 28,35 g) de crisotila seca são adicionadas a uma peneira de meia polegada, a qual é sobreposta à outras duas peneiras de 4 e 10 mesh (nesta ordem) e a um fundo. As fibras são classificadas de acordo com a fração retida em cada uma das peneiras, após peneiramento vibratório por um determinado tempo. No caso da crisotila 5R utilizada neste trabalho, sob informação do sr. Wilton, do laboratório de classificação da SAMA, a retenção varia entre 0,95 a 2,0 onças na peneira de 4 mesh; de 9 a 10 onças na peneira de 10 mesh; e o restante é recolhido no fundo.

A crisotila recebida da mina, de coloração acinzentada, apresenta pó de rocha e de fibra em sua superfície, que representa aproximadamente 38% de sua massa bruta.¹⁴ Para a crisotila ser utilizada como suporte, é necessária a remoção do pó de rocha e de fibra,

através do processo de jateamento, e ativação de sua superfície, através do processo de ativação.¹³

3.3.1 - Obtenção de crisotila jateada

Amostras de aproximadamente 5 g de crisotila *in natura* foram colocadas sobre peneira Tyler de 250 mesh e lavadas com um jato de água de torneira por 10 minutos para eliminação de impurezas. As fibras retidas na peneira foram colocadas sobre vidro de relógio e secas em estufa em torno de 120°C, por 24 horas. O material foi retirado da estufa e mantido em dessecador até seu resfriamento completo, antes de ser guardado em embalagens de PVC, para ser utilizada em outros tratamentos e experimentos. A crisotila obtida neste processo será denominada crisotila jateada

3.3.2 - Obtenção de crisotila ativada

A ativação da crisotila foi feita de acordo com a Patente BR. 8.903.849 (1989) do nosso grupo de pesquisa.¹³ O processo se inicia com a obtenção de crisotila jateada, como descrito em 3.3.1. Em seguida, foi preparada uma suspensão de 2 g de crisotila jateada em 400 mL de uma solução tampão de HAc/NaAc $3,3 \times 10^{-2} M$ (equimolar), que foi submetida ao ultra-som de 25 kHz por 30 minutos. Esta crisotila foi recolhida por filtragem em peneira Tyler de 250 mesh e lavada com água destilada para eliminar o excesso de tampão. A crisotila retida na peneira foi colocada em vidro de relógio e seca em estufa em torno de 120°C, por 24 horas. O material foi retirado da estufa e mantido em dessecador até seu resfriamento completo, antes de ser guardado em embalagens de PVC, para ser utilizada posteriormente. A crisotila obtida neste tratamento será denominada crisotila ativada.

3.3.3 - Obtenção de crisotila tratada com fluxo de gases

Para obter a crisotila tratada com fluxo de gás, foi necessária a eliminação do pó de rocha e de fibra presentes na crisotila, pelo processo de jateamento. Ao adicionar a crisotila 5R como recebida da mina nos reatores, foi observado que o pó de rocha e de fibra permaneceram suspensos na água destilada e na solução tampão, inviabilizando o tratamento da crisotila, antes do processo de jateamento.

As crisotilas tratadas com fluxo de gases foram obtidas a partir da crisotila jateada. Inicialmente, a crisotila foi tratada em reatores montados com garrafas PET de 600 mL,

contendo água destilada ou solução tampão de HAc/NaAc (equimolar) sob fluxo de ar. Em uma segunda etapa, foram montados reatores de 2 L visando o tratamento de uma quantidade maior de crisotila, utilizando ar, CO₂ e argônio. A montagem dos reatores será descrita em 3.4.

3.4 – Reatores para tratamento de crisotila jateada

3.4.1 - Reatores de 600 mL com fluxo de ar

Como ensaio preliminar, foram montados quatro reatores de garrafas PET de 600 mL, para o tratamento da crisotila previamente jateada, com fluxo de ar de 2 L/h, contendo água destilada ou solução de HAc/NaAc, como mostra o esquema de montagem apresentado na Figura 3.

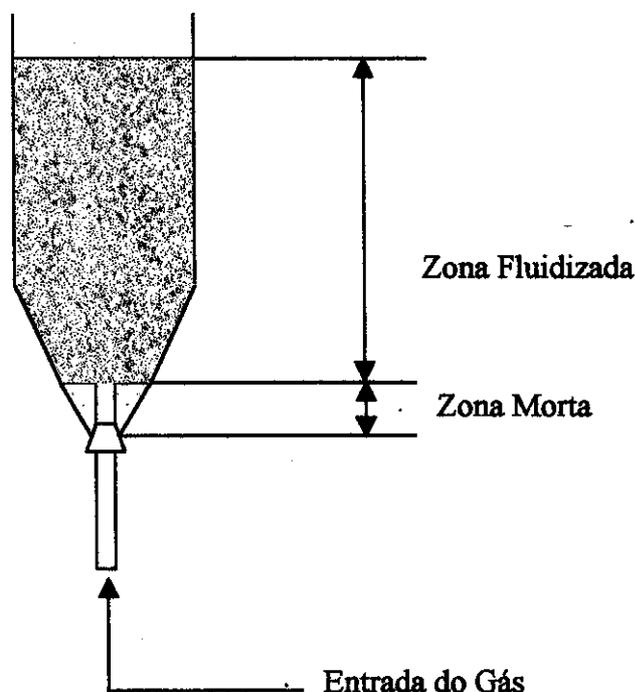


Figura 3: Esquema dos reatores montados para o tratamento de crisotila jateada, utilizando fluxo de ar, em água destilada ou solução tampão de HAc/NaAc. Dimensão aproximada: $d_{máx} = 65$ mm; $d_{mín} = 22$ mm; $h_{cone} = 67$ mm; $h_{zona\ morta} = 30$ mm

Para saturar o meio, foi realizada a passagem de gás durante 10 minutos, antes da adição da crisotila jateada. Esta crisotila foi adicionada ao meio de uma vez e, com o auxílio de uma bagueta, foi suspensa. As proporções de crisotila jateada e de meio utilizadas em cada reator montado estão listadas na tabela I.

Tabela I: Características dos reatores de 600 mL montados

Reator	Meio	Volume do meio(mL)	Massa de crisotila (g)
1	ar / água / 1h	430	15,0 (3,5% m/V)
2	ar / tampão / 1h ^a	430	15,0 (3,5% m/V)
3	ar / água / 1h	330	7,5 (2,3% m/V)
4	ar / tampão / 1h ^b	350	7,5 (2,1% m/V)

^a. solução tampão a $3,3 \times 10^{-2}$ mol/L

^b. solução tampão a $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L

Foram realizadas medidas de pH dos meios utilizados nos reatores antes da adição de crisotila jateada e ao final do tempo de aeração de 1 hora. O pH foi medido com fitas indicadoras, nas faixas de 0 a 6 e de 0 a 7, com sensibilidade de 0,5 e 1, respectivamente.

A crisotila suspensa no meio foi mantida sob fluxo de ar durante 1 hora. Após este período, o fluxo foi desligado e o reator foi inclinado sobre uma peneira Tyler de 250 mesh, para recolher as fibras de crisotila que permaneceram na zona fluidizada e separá-las do meio, por filtração. A crisotila retida sobre a peneira foi lavada com água destilada e transferida para um vidro de relógio. O material depositado na zona morta foi retirado pela parte inferior do reator e colocado numa placa de Petri. O material recolhido das zonas fluidizada e morta foi seco em estufa, em torno de 105°C, por 3 dias, e após este período, foi mantido em dessecador antes de ser pesado e guardado em embalagens de PVC.

Para fins comparativos, um sistema sem aeração foi montado utilizando um béquer de 600 mL, com 430 mL de água destilada. O pH do meio foi medido antes da adição da crisotila. Foram adicionados ao meio, 15,0 g de crisotila jateada (3,5% m/V) suspensos com o auxílio de uma bagueta. Após 1 hora de contato em repouso, o pH do meio foi medido e a crisotila foi recolhida sobre peneira Tyler de 250 mesh. A crisotila recolhida foi colocada sobre um vidro de relógio e seca em estufa, em torno de 105°C, por 3 dias. Após este período, foi mantida em dessecador antes de ser pesada e guardada em embalagem de PVC.

3.4.2 - Reatores de 2 L com fluxo de ar, CO₂ e argônio

Foram montados 12 reatores com garrafas de PET de 2 L, com volume reacional de 1 L, contendo meio de água destilada ou de solução tampão HAc/NaAc 10^{-2} M e fluxo de diferentes gases, como listado na tabela II. O esquema de montagem segue o mesmo padrão apresentado na Figura 1, com as seguintes dimensões: $d_{\text{máx}} = 98$ mm; $d_{\text{mín}} = 22$ mm; $h_{\text{cone}} = 110$ mm; $h_{\text{zona morta}} = 40$ mm; $h_{\text{zona fluidizada}} = 200$ mm.

Para saturar o meio com o gás, foi realizada a passagem de ar, CO₂ ou argônio por

10 minutos, antes da adição de 20,0 g de crisotila jateada (2% m/V), como listado na tabela II.

Tabela II: Características dos reatores de 2 L montados para o tratamento de crisotila. Volume do meio = 1 L, fluxo do gás = 2L / h, crisotila jateada = 20 g.

Reator	Meio	Gás	Tempo (h)
5	água destilada	ar	1h
6	solução tampão	ar	1h
7	água destilada	ar	5h
8	solução tampão	ar	5h
9	água destilada	CO ₂	1h
10	solução tampão	CO ₂	1h
11	água destilada	CO ₂	5h
12	solução tampão	CO ₂	5h
13	água destilada	argônio	1h
14	solução tampão	argônio	1h
15	água destilada	argônio	5h
16	solução tampão	argônio	5h

A crisotila jateada adicionada no reator foi suspensa com o auxílio de uma bagueta e mantida sob fluxo de gás durante 1 ou 5 horas. O fluxo de gás foi desligado e o reator foi inclinado sobre uma peneira Tyler de 250 mesh, para recolher as fibras da crisotila que permaneceram na zona fluidizada e separá-las do meio, por filtração. A crisotila retida sobre a peneira foi lavada com água destilada e transferida para um vidro de relógio. O material presente na zona morta foi retirado pela parte inferior do reator e recolhido sobre uma placa de Petri. O material recolhido das zonas fluidizada e morta foi seco em estufa em torno de 105°C, por 24 horas. Após este período, foi mantido em dessecador antes de ser pesado e guardado em embalagens de PVC.

Foram realizadas medidas de pH dos meios utilizados nos reatores, antes da adição de crisotila jateada e ao final do tempo de aeração de 1 ou de 5 horas. O pH foi medido com fitas indicadoras, nas faixas de 0 a 6 e de 0 a 7, com sensibilidade de 0,5 e 1, respectivamente.

3.5 - Isotermas de adsorção de azul de metileno sobre crisotila

O método de adsorção de azul de metileno foi utilizado para avaliar a ativação da superfície das crisotilas tratadas nos reatores de 600 mL e 2L, retiradas das zonas fluidizadas.

Para o preparo das soluções de azul de metileno utilizadas neste ensaio, foi preparada uma solução estoque de 1L de azul de metileno $1,0 \times 10^{-4}M$, com a dissolução de 0,0374 g de azul de metileno em água destilada. A partir desta solução foram preparadas, por diluição, soluções nas seguintes concentrações listados na tabela III.

Tabela III: Solução estoque, diluições e respectivas concentrações finais usadas nos ensaios de adsorção de azul de metileno sobre crisotila.

Diluição - V_f/V_r (mL / mL)	Concentração final de azul de metileno (mol / L)
estoque	$1,00 \times 10^{-4}$
200 / 250	$8,00 \times 10^{-5}$
150 / 250	$6,00 \times 10^{-5}$
100 / 250	$4,00 \times 10^{-5}$
50 / 250	$2,00 \times 10^{-5}$
25 / 250	$1,00 \times 10^{-5}$

3.5.1 - Isotermas de adsorção de azul de metileno sobre crisotila jateada e sobre crisotilas retiradas das zonas fluidizadas dos reatores de 600 mL de 2 L

Em 5 erlenmeyers de 50 mL, foram colocadas amostras de 0,05 g de crisotila retiradas da zona fluidizada do reator de 600 mL, tratada com água destilada (Reator 3) ou com solução tampão 10^{-3} mol/L (Reator 4). Com uma pipeta volumétrica, 10 mL das soluções diluídas de azul de metileno, listadas na tabela III, foram adicionados aos erlenmeyers, os quais foram agitados manualmente até a suspensão da crisotila. Os erlenmeyers foram colocados num banho tipo Dubnoff a $25^\circ C$, com agitação mecânica, por 10 horas, tempo mínimo para a cinética de adsorção de azul de metileno sobre crisotila.⁶ Após este período, os erlenmeyers foram retirados do banho e de cada um, foi retirada uma alíquota do sobrenadante que foi transferida para um tubo de ensaio. As alíquotas foram centrifugadas por 5 minutos a 3500 rpm nominais, e quando necessário, antes de se fazer as medidas de absorbância dos sobrenadantes, as amostras foram diluídas em água destilada, utilizando uma pipeta automática de 1 mL, em balão volumétrico de 10 mL.

Para a construção das isotermas de adsorção de azul de metileno, utilizando crisotila jateada e as crisotilas retiradas da zona fluidizada dos reatores de 2 L, foram empregados 0,50 g de crisotila e 50 mL das soluções de azul de metileno, listadas na tabela III, em erlenmeyers de 250 mL.

3.6 - Adesão de fermento de pão sobre crisotila jateada, ativada e retirada das zonas fluidizadas dos reatores de 600 mL e de 2L

Para avaliar a utilização da crisotila como suporte de células de *Saccharomyces cerevisiae*, foram realizados ensaios de adesão de fermento de pão sobre as crisotilas jateada, ativada e tratada nos reatores de 600 mL e de 2 L.

Em banho tipo Dubnoff, a 32°C, foram colocados 5 erlenmeyers de 250 mL contendo 20 mL de água destilada. Em cada erlenmeyer, foi adicionado 1,0 g de fermento seco de pão, com cuidado para não aderir à parede. Após 5 minutos, um a um, os erlenmeyers foram retirados do banho, e 0,10 g de crisotila foi suspenso com movimentos circulares. A parede interna do erlenmeyer foi lavada com 10 mL de água destilada, adicionada por uma pipeta Pasteur, para retirar as fibras de crisotila aderidas à parede. Os erlenmeyers foram colocados no banho tipo Dubnoff a 32°C, sem agitação por 1 ou 2 horas. Após este período, cada mistura de crisotila-água-fermento foi filtrada a vácuo, utilizando funil de fundo removível e tela de aço inoxidável de 250 mesh, que permite a passagem das células não aderidas à crisotila. O material retido sobre a tela foi lavado com 100 mL de água destilada utilizando uma pisseta, para promover a remoção das células não aderidas à crisotila. A tela contendo o material lavado foi retirada do funil e colocada em um béquer de 50 mL que, em seguida, foi levado a uma estufa em torno de 100°C, por 24 horas. Antes da pesagem, o material foi mantido em dessecador até seu resfriamento completo. Este ensaio foi realizado em quintuplicatas.

Este procedimento foi, também, realizado com fermento seco instantâneo de pão, apenas para a adesão sobre crisotila ativada.

3.7 – Atividade fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* suportadas em crisotila

Este ensaio foi realizado para avaliar a atividade de células de *Saccharomyces cerevisiae* suportadas na crisotila tratada no reator ar/tampão/1h. O experimento foi realizado como descrito por Fregonesi,⁸ em sua Dissertação de Mestrado, para a crisotila ativada. Por se tratar de um ensaio realizado em condições assépticas, os materiais utilizados na manipulação das células e dos meios de fermentação foram esterilizados, devidamente embalados com papel kraft, presos com fita para autoclave e “rolha” feita com algodão. A esterilização foi realizada em autoclave em torno de 120°C e 1 atm, por 10 minutos. Os materiais que não puderam ser submetidos a esterilização em autoclave, foram

limpos com uma solução de álcool a 70%, e levados imediatamente à câmara de fluxo laminar.

3.7.1 - Preparo das células de *Saccharomyces cerevisiae*

As células de *Saccharomyces cerevisiae* são provenientes de uma cepa isolada da Usina S^{ta} Délia, denomina cepa FEA 01, da Faculdade de Engenharia de Alimentos-UNICAMP. As células utilizadas nos ensaios de atividade fermentativa foram gentilmente preparadas por Maurício Rigo.

O microrganismo foi conservado em meio inclinado, composto por extrato de levedura (3 g/L) e de malte (3 g/L), peptona (5 g/L), glicose (10 g/L) e ágar bacto (20 g/L). O crescimento e preparo das células para a fermentação foi realizado em dois meios de pré-fermentação.

Meio de pré-fermentação I: glicose (50 g/L), KH_2PO_4 (5 g/L), NH_4Cl (1,5 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,7 g/L) KCl (1,2 g/L) e extrato de levedura (5 g/L). O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C, por 15 minutos, antes da inoculação de uma alçada do microrganismo mantido em meio inclinado. O meio inoculado foi mantido numa incubadora orbital a 150 rpm e 30°C, por 12 horas.

Meio de pré-fermentação II: sacarose (150 g/L), KH_2PO_4 (5 g/L), NH_4Cl (1,5 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,7 g/L) KCl (1,2 g/L) e extrato de levedura (5 g/L). O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C, por 15 minutos, antes que o material obtido no meio de pré-fermentação I fosse inoculado assepticamente. O meio inoculado foi mantido numa incubadora orbital a 150 rpm e 30°C, por 12 horas. Após este período, o material foi filtrado a vácuo e as células recolhidas em papel de filtro.

3.7.2 - Meios de fermentação de D-glucose enriquecido

Em chapa de aquecimento com agitação magnética, foram dissolvidos D-glucose, uréia e sulfato de magnésio em água destilada, a aproximadamente 40°C. Esta mistura foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL, que foi completado com água destilada até a marca do menisco. O pH do meio foi ajustado em 4,5 com H_2SO_4 concentrado, após a esterilização.

Meio de fermentação de D-glucose enriquecido a 250 g/L: D-glucose (250 g/L), uréia (3 g/L) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L).

Meio de fermentação de D-glucose enriquecido a 300 g/L: D-glucose (300 g/L), uréia (3 g/L) e MgSO₄.7H₂O (0,5 g/L).

3.7.3 – Preparo dos discos de crisotila contendo células de *Saccharomyces cerevisiae* suportadas

Em 12 erlenmeyers de 250 mL, foram esterilizadas 06 amostras de 1,0 g de crisotila ativada e outras 06 amostras de 1,0 g de crisotila retirada da zona fluidizada do reator ar/tampão/1h. Em câmara de fluxo vertical, sob condições assépticas, foram adicionados, em cada erlenmeyer, 200 mL de água destilada para a suspensão da crisotila, e 0,6 g de células de *Saccharomyces cerevisiae*, que haviam permanecido por uma semana em geladeira a aproximadamente 5°C. Para promover o 'choque' das células com a crisotila, uma agitação vigorosa foi feita com uma bagueta. Em seguida, os erlenmeyers foram tampados com algodão e colocados em banho tipo Dubnoff a 30°C, por 1 hora. Após este período, os erlenmeyers foram levados a câmara de fluxo laminar. As crisotilas submetidas a adesão das células foram recuperadas por filtração a vácuo, sobre a tela de aço inox de 250 mesh acoplada a um funil de fundo removível. Desta maneira, a crisotila forma uma espécie de disco que é facilmente removível da tela de aço inox.

3.7.4 - Montagem dos sistemas de batelada para fermentação de meio estéril de D-glucose por células suportadas em discos de crisotila

Os 12 discos de crisotila contendo células, que foram recuperados na filtração, foram acomodados no fundo de erlenmeyers de 25 mL com o auxílio de uma pinça. Os discos foram cobertos por pérolas de vidro, para evitar o entupimento da agulha cirúrgica, utilizada para a saída do CO₂, produzido durante a fermentação. Outros 6 erlenmeyers foram preparados como sistemas controles, com a adição 0,6 g de células de *Saccharomyces cerevisiae*. Os 18 erlenmeyers foram colocados num banho de gelo por 20 minutos, para diminuir o metabolismo das células até a realização da primeira pesagem. Foram adicionados 15 mL de meio estéril de D-glucose enriquecido a 250 g/L em 9 erlenmeyers (3 dos sistemas controles, 3 contendo discos crisotila ativada contendo células e 3 contendo discos de crisotila do reator ar/tampão/1h contendo células). Nos outros 9 erlenmeyers, foram adicionados 15 mL de meio estéril de D-glucose enriquecido a 300 g/L. Após cada adição, o sistema foi tampado com um septo de borracha, contendo uma agulha

cirúrgica para saída de CO₂, sendo colocado de volta no banho de gelo. Os sistemas foram pesados e suas massas iniciais foram anotadas. Em seguida, os sistemas foram colocados num banho tipo Dubnoff com agitação, a 30°C. A tempos regulares, os sistemas foram retirados do banho para a realização das pesagens. A massa seca de células foi obtida por gravimetria, após a filtração de 2 a 5 mL da suspensão de células em papel de éster de celulose de 1,2 µm de poro, secos em estufa por 4 horas em torno de 70°C. A Figura 4 mostra um esquema de montagem do sistema de batelada utilizado nos ensaios de fermentação alcoólica:

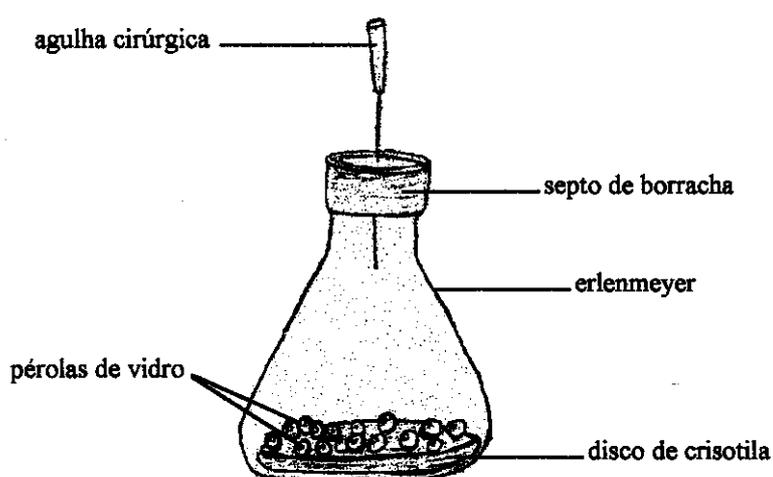


Figura 4: Esquema de montagem do sistema de batelada utilizado nos ensaios de fermentação alcoólica.

3.7.5 - Montagem dos sistemas de batelada para fermentação de meloço por células de *Saccharomyces cerevisiae* suportadas em crisotila nas proporções 1:0,6 crisotila/células

Este ensaio preliminar foi realizado para se medir a atividade fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação de meloço, em condições não-estéreis. Os sistemas de batelada foram montados nas proporções crisotila/células de 1:0,6.

Em erlenmeyers de 25 mL, foram colocadas 3 amostras de 1,0 g de crisotila ativada e outras 3 de crisotila jateada, juntamente com uma suspensão de 0,6 g de células de *Saccharomyces cerevisiae*, em 2,0 mL de água destilada, adicionados com uma pipeta volumétrica. Em seguida, foi realizada a seguinte seqüência para a preparação dos sistemas de fermentação: em cada erlenmeyer contendo crisotila e células, foram adicionados 5,0 mL de meio de meloço a 250 g de ART/L. O sistema foi tampado com um septo com uma agulha cirúrgica, seguindo para a primeira pesagem.. Foi estabelecido o tempo de 1 minuto

entre a adição do meio e a pesagem de um sistema para outro. Como controle, foram montados sistemas contendo uma suspensão de 0,6 g de células de *Saccharomyces cerevisiae* em 2,0 mL de água e 5,0 mL de melão a 250 g de ART/L, sem a adição de crisotila.

3.8 – Atividade fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* usando crisotila como acelerador na fermentação de melão em sistemas de batelada

Estes ensaios foram realizados como descrito por Maurício Rigoⁱⁱ nos ensaios exploratórios de sua Dissertação de Mestrado. Estes ensaios foram realizados para se avaliar a atividade das células de *Saccharomyces cerevisiae* durante a fermentação de melão, através da perda de massa do sistema devido à produção de CO₂, utilizando uma quantidade de crisotila muito menor que a necessária para a imobilização das células.

Alguns resultados preliminares de fermentação de melão nos levaram a acreditar que a utilização de crisotila como acelerador aumentaria em até 55% a velocidade de produção de CO₂ nos primeiros 30 minutos, como mostram os gráficos do Anexo I. Durante a realização dos ensaios de fermentação, foi possível observar que algumas práticas de preparação são fundamentais para garantir a reprodução dos ensaios. Estas práticas devem sempre ser ressaltadas ao se realizar ensaios de fermentação:

- a) a utilização de agitação mecânica para suspensão de células durante a inoculação, para a quantidade de células variar pouco entre a primeira e a última inoculação;
- b) o preparo dos sistemas em 3 séries de 3 erlenmeyers, de modo que cada série apresentasse uma amostra de cada sistema utilizado;
- c) a inoculação e adição de melão devem ter o mesmo intervalo de tempo em cada sistema, para garantir os tempos de fermentação iguais em cada um dos sistemas.

ⁱⁱ Maurício Rigo estagiou em nosso laboratório durante o Convênio FUNCAMP/SAMA em 1997/1998. Atualmente, Maurício é aluno de Mestrado da Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, e está trabalhando no desenvolvimento de reatores de fluxo contínuo para fermentação alcoólica, por *Saccharomyces cerevisiae* (cepa FEA-01) utilizando crisotila. Ao visitar uma usina produtora de açúcar e álcool, Maurício se deparou com uma dorna de fermentação de 1 milhão de litros e imaginou que a adição de uma pequena quantidade de crisotila à dorna poderia ser bastante interessante. Enquanto Maurício realizava ensaios exploratórios para a determinação da quantidade de crisotila mais adequada a fermentação de melão com 10% de células, tive a oportunidade de conhecer o projeto que está desenvolvendo. Fiquei bastante interessada em testar as crisotilas tratadas nos reatores com fluxo de gases, ao constatar que a adição de 1% de crisotila era capaz de aumentar a velocidade produção de CO₂ pelas células. Maurício, além de me conceder sua metodologia e me acompanhar nos primeiros ensaios, forneceu o melão e realizou o crescimento das células de todos os ensaios que utilizei com a cepa FEA 01.

3.8.1 - Preparo das células de *Saccharomyces cerevisiae*

As células de *Saccharomyces cerevisiae* foram preparadas como descrito em 3.7.1, sem a necessidade da utilização da câmara de fluxo laminar, por se tratar de ensaios realizados com meio de melaço não-estéril.

3.8.2 - Meios de fermentação de melaço

O melaço utilizado nos ensaios de fermentação alcoólica foi obtido na Usina Ester, sendo fornecido por Maurício Rigo.

O meio de fermentação de melaço utilizado nos ensaios de fermentação alcoólica foi preparado de acordo com as concentrações finais de ART desejada, levando-se em conta a quantidade de água destilada utilizada na suspensão de células. A quantidade de ART por grama de melaço foi estimada em 65% em ensaios de determinação de ART, realizados por Maurício Rigo.

Meio 1 - melaço a 200 g de ART/L: em balança semi-analítica, foram pesados 115,4 g de melaço em béquero de 400 mL. O melaço foi transferido, após a adição de um pouco de água destilada, para um balão volumétrico de 250 mL com o auxílio de uma bagueta. Antes de se completar o menisco, o balão foi sonicado por 5 minutos para a retirada do ar presente na mistura, permitindo maior precisão. Em seguida, o meio 1 foi transferido para um béquero de 400mL e seu pH foi ajustado a 4,5; com a adição de gotas de H₂SO₄ concentrado.

Meio 2 - melaço a 250 g de ART/L: foi preparado como descrito em *Meio 1*, utilizando 144,2 g de melaço.

Meio 3 - melaço a 300 g de ART/L: foi preparado como descrito em *Meio 1*, utilizando 173,0 g de melaço.

3.8.3 - Montagem dos sistemas de batelada para fermentação de melaço por células de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando crisotila como aditivo nas proporções 1:10 e 1:5 crisotila/células

Em erlenmeyers de 25 mL, foram colocadas amostras de crisotila (0,15 e 0,30g) juntamente com uma suspensão de 1,5 g de células de *Saccharomyces cerevisiae* (aproximadamente 10% em massa do volume final de 15 mL de meio) em 5,0 mL de água destilada, utilizando um pipeta volumétrica. Aos erlenmeyers do sistema controle, apenas a

suspensão de células foi adicionada. Em seguida, foi realizada a seguinte seqüência para a preparação dos sistemas de fermentação: num sistema, foram adicionados 10 mL de meio de meloço, em concentração final de açúcar redutor total por litro (ART/L) entre 200 a 300 g. O sistema foi tampado com um septo com uma agulha cirúrgica e, imediatamente, submetido a primeira pesagem. A adição do meloço e a pesagem dos sistemas seguintes foram feitos a intervalos de 1 minuto. Para cada ensaio, um sistema controle foi preparado com a mesma quantidade de células e meloço, sem a adição de crisotila. Os erlenmeyers foram colocados numa incubadora orbital a 200 rpm e 32°C. A tempo regulares, os sistemas foram retirados da incubadora para a pesagem, que foi realizada com intervalos de 1 minuto, para garantir o mesmo tempo de fermentação em cada um dos sistemas montados. A atividade celular foi obtida de forma indireta, por gravimetria, a intervalos de 30 minutos durante as primeiras 5 horas de fermentação e a intervalos maiores até completar, aproximadamente, 24 horas.

A Tabela IV mostra a quantidade das crisotilas e de ART/L no meloço e as quantidades de ART/L no meloço empregadas nestes ensaios.

A massa seca de células foi obtida por gravimetria, após centrifugar 10 mL da suspensão de células, e secar em estufa por 1 dia em torno de 70°C, após descartar o sobrenadante.

Tabela IV: Quantidades de crisotila e de ART/L no meloço, utilizadas nos ensaios de atividade fermentativa das células de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa FEA 01) em 15 mL de meloço, a 200 rpm e 32°C.

crisotila	massa de crisotila (g)	quantidade de ART/L
jateada	0,15	200
ativada	0,15	
argônio/água/1h	0,15	300
CO ₂ /água/1h	0,15	
jateada	0,15 e 0,30	250
ativada	0,15 e 0,30	
ar/água/1h	0,15 e 0,30	
ar/tampão/1h	0,15 e 0,30	
CO ₂ /água/5h	0,15	250
argônio/tampão/1h	0,15	
CO ₂ /tampão/1h	0,15	

3.9 – Micrografias Eletrônicas de Varredura

As micrografias foram realizadas no laboratório de microscopia eletrônica do Instituto de Física da USP em São Paulo, por Flávia Maria Cassiola. Foram verificadas as crisotilas após os tratamentos nos reatores ar/tampão/1h, CO₂/água/1h, CO₂/água/5h e argônio/água/1h, e as células de *Saccharomyces cerevisiae* da cepa FEA 01 suportadas nas crisotilas, após fermentação de melão a 250 e 300 g de ART/L.

A preparação das amostras de crisotila foi feita com a deposição de Au, pelo método de "Sputtering", antes de serem levadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL-JSM-840A.

As células de *Saccharomyces cerevisiae* suportadas nas crisotilas tratadas nos reatores CO₂/água/1h, CO₂/água/5h e argônio/água/1h, após a fermentação de melão na proporção 1:10 crisotila/células, foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% (v/v) e pós fixação em solução de OsO₄ 1:3 (m/m). A seguir, foi feita desidratação usando álcool etílico a 50, 80, 95 e 100% e a secagem foi feita pelo método do ponto crítico. Posteriormente, foi feita a deposição de Au, pelo método de "Sputtering" e levadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL-JSM-840A.

4 – RESULTADOS

A apresentação dos resultados obtidos neste trabalho foi dividida em três etapas. A primeira trata da ativação da superfície da crisotila utilizando os reatores de fluxo de gases e avaliação da fibrilação da crisotila pelo método de adsorção de azul de metileno. A segunda diz respeito à adesão de células de *Saccharomyces cerevisiae* à crisotila tratada e avaliação da atividade celular na presença de crisotila, através de medidas de perda de massa (produção de CO₂), durante a fermentação de açúcares. A terceira diz respeito a Microscopia Eletrônica de Varredura de amostras de crisotilas e de células suportadas em crisotila.

4.1 – Ativação da superfície da crisotila e avaliação da fibrilação

4.1.1 – Tratamento da crisotila

A montagem dos reatores foi realizada para o tratamento da crisotila após o jateamento, visando eliminar as fibras empacotadas e os fragmentos de rocha presentes na crisotila, que não são desejáveis na utilização deste material como suporte de células, bem como ativar sua superfície. Atualmente, este processo é realizado através da sonificação da crisotila jateada em solução tampão de HAc/NaAc $3,3 \times 10^{-2}$ mol./L.¹³

4.1.1.1 – Ensaios exploratórios para o tratamento de crisotila jateada em reatores de 600 mL, com fluxo de ar

Para avaliar o tratamento da crisotila jateada utilizando reatores contendo água destilada ou solução tampão de HAc/NaAc $3,3 \times 10^{-2}$ mol./L e fluxo de ar, foram realizados ensaios exploratórios em reatores de 600 mL.

Após a adição da crisotila jateada no reator de 600 mL contendo água destilada, foi observado que parte das fibras empacotadas e dos fragmentos de rocha presentes na crisotila foram depositados na zona morta do reator, enquanto as fibras mais abertas permaneceram suspensas na zona fluidizada. Foi observada pequena quantidade de fibras abertas na zona morta do reator.

Ao utilizar a solução tampão de HAc/NaAc $3,3 \times 10^{-2}$ mol/L, em reator de 600 mL com crisotila jateada, foi observado aspecto mais denso na zona fluidizada, em relação ao reator montado com água destilada, provavelmente devido a maior abertura das fibras da crisotila. Na zona morta, foi observada a presença de fibras empacotadas e fragmentos de rocha, além de uma quantidade maior de fibras abertas do que no reator montado com água destilada,

semelhantes às fibras que permaneceram em suspensão na zona fluidizada.

No reator de 600 mL contendo solução tampão de HAc/NaAc $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L apresentando a proporção crisotila/meio em torno de 3,3% (m/V), não foi observada a formação das zonas fluidizada e morta. As fibras empacotadas e os fragmentos de rocha não foram separados das fibras mais abertas como observado nos demais reatores. Nesta proporção, a crisotila parece “gelificar”, formando um bloco único de fibras. Com a adição de mais solução tampão ao reator, as fibras empacotas e os fragmentos de rocha foram separados ao se atingir, aproximadamente, a proporção crisotila/meio em torno de 2,1% (m/V). As quantidades de crisotila retirada das zonas fluidizada e morta dos reatores de 600 mL estão relacionadas na tabela V.

Tabela V: Quantidade de crisotila retirada das zonas fluidizada e morta dos reatores de 600 mL com água destilada ou solução tampão de HAc/NaAc com fluxo de ar, após processo de tratamento, filtração e secagem em estufa.

Reator	Meio	Massa inicial de crisotila (g)	Massa da zona fluidizada (g)	Massa da zona morta (g)
1 ^a	ar / água / 1h	15,0	12,7 ± 0,6 (85%)	2,1 ± 0,6 (14%)
2	ar / tampão / 1h ^b	15,0	13,1 (87%)	1,8 (12%)
3	ar / água / 1h	7,5	6,4 (85%)	0,9 (12%)
4	ar / tampão / 1h ^c	7,5	6,7 (89%)	0,7 (9%)

^a. experimento realizado em duplicatas

^b. solução tampão a $3,3 \times 10^{-2}$ mol/L

^c. solução tampão a $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L

Os valores apresentados na tabela V mostram que as quantidades de material retirados das zonas fluidizada e morta dos reatores são muito semelhantes, mesmo utilizando meios diferentes, água destilada e solução tampão; ou de massas de crisotila jateada iniciais distintas, 15,0 e 7,5 g. Este processo se mostrou eficiente na separação do pó de rocha de fibra.

4.1.1.2 - Tratamento de crisotila jateada em reatores de 2 L com fluxo de ar, CO₂ e argônio

Uma vez observada a eficiência do tratamento da crisotila com fluxo de gás, foram montados reatores de 2 L com água destilada ou com solução a fim de aumentar a quantidade de crisotila jateada a ser tratada num único ensaio. A influência de diferentes gases e tempos de contato no tratamento da crisotila nos reatores também foi avaliada. O gás CO₂ foi escolhido por ser um dos produtos formados durante o processo de fermentação de açúcares

por células de *Saccharomyces cerevisiae*, e o argônio por ser um gás inerte, que possibilitaria avaliar alterações provocadas por possíveis reações químicas entre o CO₂ e a superfície da crisotila.

As quantidades de crisotila retiradas das zonas fluidizada e morta dos reatores de 2 L, após o tratamento, estão relacionadas na tabela VI.

Tabela VI: Quantidade de crisotila retirada das zonas fluidizada e morta dos reatores de 2 L, com fluxo de ar, argônio e CO₂, após processo de tratamento, filtração e secagem em estufa. Massa inicial de crisotila = 20 g.

Nº do reator	Reator	Massa da zona fluidizada (g)	Massa da zona morta (g)
5	ar / água / 1h	15,1 (76%)	4,2 (21%)
6	ar / tampão / 1h	15,0 (75%)	4,4 (22%)
7	ar / água / 5h	12,4 (62%)	7,2 (36%)
8	ar / tampão / 5h	14,5 (73%)	4,9 (25%)
9	CO ₂ / água / 1h	12,6 (63%)	4,5 (23%)
10	CO ₂ / tampão / 1h	13,3 (67%)	6,2 (31%)
11	CO ₂ / água / 5h	10,5 (53%)*	5,8 (29%)
12	CO ₂ / tampão / 5h	14,3 (72%)	5,0 (25%)
13	argônio / água / 1h	15,0 (75%)	4,5 (23%)
14	argônio / tampão / 1h	15,0 (75%)	4,3 (22%)
15	argônio / água / 5h	13,9 (70%)	5,6 (28%)
16	argônio / tampão / 5h	14,4 (72%)	4,9 (25%)

experimentos únicos

*. perda de massa

Os valores apresentados na tabela VI mostram que as quantidades de material retirados das zonas morta e fluidizada dos reatores não variam muito, mesmo com o uso de diferentes gases e tempos de fluxo, exceto para o reator ar/água/5h. Quando comparada aos reatores de 600mL, a quantidade de material retirado da zona morta dos reatores de 2L foi maior.

4.1.1.3 - Medidas de pH dos meios utilizados nos reatores de água destilada e de solução tampão com fluxo de ar, CO₂ e argônio e na ausência de aeração

O pH dos meios foi medido para verificar possíveis mudanças de pH durante o processo de tratamento da crisotila nos diferentes sistemas montados. Estas alterações poderiam acarretar em mudanças das propriedades superficiais da crisotila.

Nas montagens de todos os reatores e do sistema sem aeração, descritos em 3.4.1 e 3.4.2, o pH inicial da água destilada foi igual a 5,5; e das soluções tampão de HAc/NaAc foi

igual a 4,5.

No reator de 600 mL com água destilada e fluxo de ar, o pH final do meio foi igual a 8,3. No sistema sem aeração foi igual a 8,6. Nos reatores de 2 L com água destilada e tempo de aeração de 1 hora, o pH final foi igual a 7,7; e para os reatores de 2 L com água destilada e tempo de aeração de 5 horas, o pH final foi igual a 8,0. Em todos os reatores contendo solução tampão de HAc/NaAc, foi observado pH final igual a 5,0; após 1 e 5 horas de fluxo.

A utilização de diferentes gases nos reatores não acarretou em diferenças nos valores de pH dos meios, após os tratamentos da crisotila.

4.1.2 – Medida da ativação da superfície de crisotila tratada

Para avaliar a fibrilização da crisotila jateada após o tratamento nos reatores com fluxo de gases, foi utilizado o método de adsorção de azul de metileno e o modelo de Langmuir, originalmente deduzido para gases, descrito por Parizotto,⁶ em sua dissertação de mestrado. A partir dos valores de adsorção dos sobrenadantes, medidos por espectroscopia, a 550 nm, foram calculados a concentração da solução de azul de metileno, após atingido o equilíbrio (C_{eq}), e o número de mols de azul de metileno adsorvido por grama de crisotila. As isotermas de adsorção foram construídas a partir dos valores de C_{eq} contra o número de mols adsorvido. As isotermas linearizadas segundo o modelo de Langmuir foram feitas a partir dos valores de C_{eq} dividido pelo número de mols adsorvido contra C_{eq} . De posse do valor calculado com a inclinação da reta das isotermas linearizadas, utilizando apenas os pontos anteriores ao patamar de adsorção, foi possível calcular o valor do número de mols de azul de metileno adsorvidos por grama de crisotila (V_m), para a crisotila jateada e para as crisotilas retiradas das zonas fluidizadas dos reatores de batelada montados.

4.1.2.1 - Isotermas de adsorção de azul de metileno sobre crisotila jateada

Para fins comparativos, foi calculado o número de mols de azul de metileno adsorvidos sobre a superfície da crisotila jateada, empregando o método de adsorção de azul de metileno e o modelo de Langmuir (Figura 5), como descrito em 4.1.2. O valor calculado de V_m para a crisotila jateada, a partir das isotermas 1 e 2, foi de 2,2 e 2,1 $\times 10^{-6}$ mol/g, respectivamente. Os pontos referentes ao maior valor de C_{eq} apresentaram valores abaixo do esperado devido a problemas de diluição durante a preparação da amostra para leitura no espectrofotômetro.

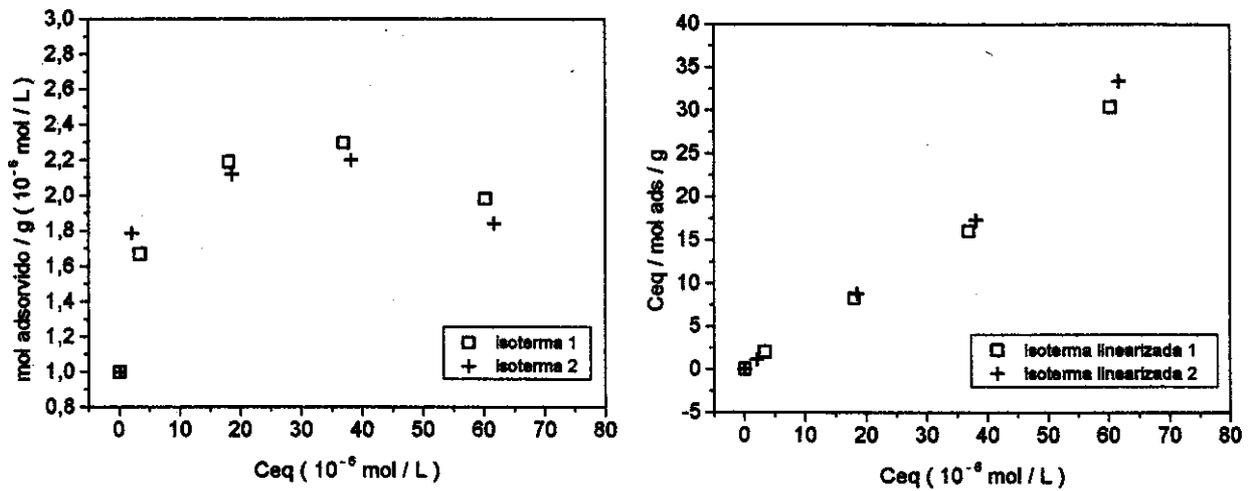


Figura 5: Isothermas de adsorção de azul de metileno sobre crisotila jateada e isothermas linearizadas segundo modelo de Langmuir. Tempo de adsorção = 10 h, massa de crisotila = 0,50 g, V = 50,0 mL, T = 25°C. Experimento realizado em duplicatas.

4.1.2.2 - Isothermas de adsorção de azul de metileno sobre crisotila retirada das zonas fluidizadas dos reatores de 600 mL e 2 L

Para avaliar a ativação da superfície da crisotila retirada da zona fluidizada de cada um dos reatores, foi empregado o método de adsorção de azul de metileno e o modelo de Langmuir (Figuras 6 e 7), como descrito em 4.1.2. Os valores de V_m , que foram calculados apenas com os valores de adsorção que se encontravam abaixo do patamar da isoterma, estão relacionados na tabela VII.

Tabela VII: Número de mols de azul de metileno adsorvidos por grama de crisotila (V_m) para as crisotilas retiradas das zonas fluidizadas dos reatores de 600 mL. Cálculo usando o modelo de Langmuir, a partir dos dados das Figuras 4 e 5.

Nº do reator	Reator	α (10^5 g / mol)	V_m (10^{-6} mol / g)
3	ar / água / 1h	5,2	1,9
4	ar / tampão / 1h*	5,8	1,7
		7,5	1,3
		3,3	3,0

* solução tampão a $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L.

Como observado na tabela VII, os valores de V_m calculados para as crisotilas retiradas das zonas fluidizadas dos reatores de 600 mL, apresentam valores próximos ao calculado para a crisotila jateada. A diferença no valor de V_m calculado para a crisotila tratada no reator 4, se

deve a pouca quantidade da crisotila (0,05 g) em relação ao volume de solução de azul de metileno utilizado (10,0 mL).

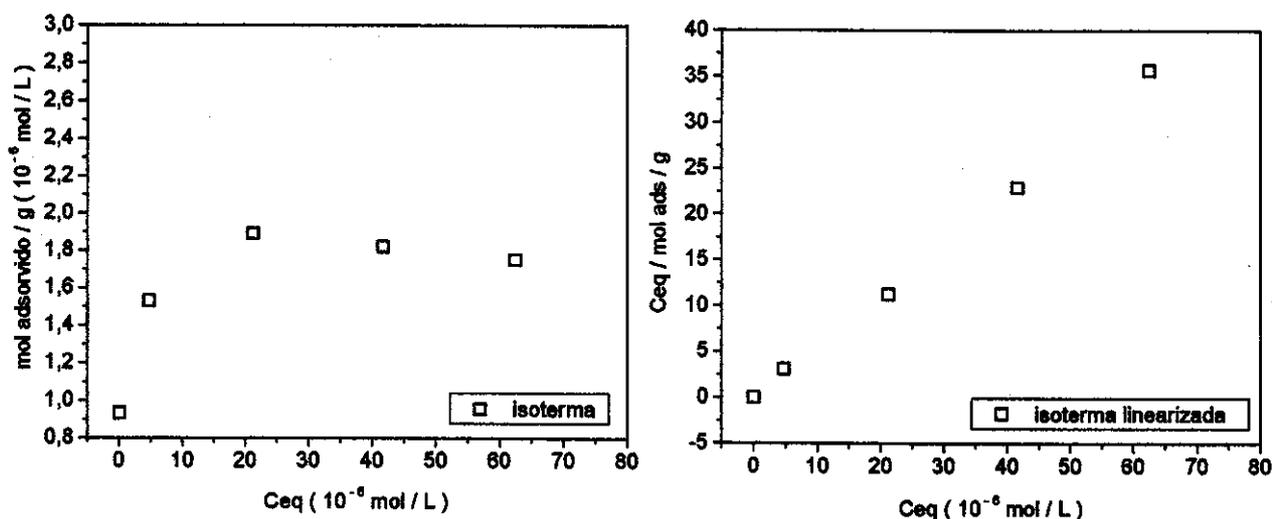


Figura 6: Isotherma de adsorção de azul de metileno sobre crisotila do reator de 600 mL com água destilada e fluxo de ar; e isoterma linearizada segundo modelo de Langmuir. Tempo de adsorção = 10 h, massa de crisotila = 0,50 g, V = 50,0 mL, T = 25°C. Experimento único.

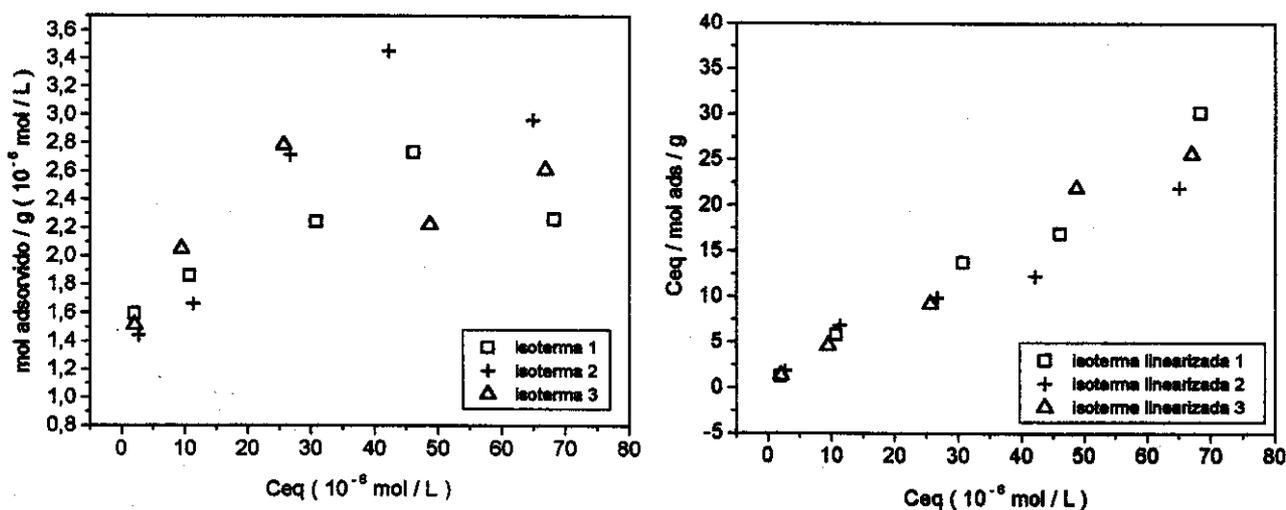


Figura 7: Isotermas de adsorção de azul de metileno sobre crisotila do reator de 600 mL com solução tampão e fluxo de ar; e isothermas linearizadas segundo modelo de Langmuir. Tempo de adsorção = 10 h, massa de crisotila = 0,05 g, V = 10,0 mL, T = 25°C. Experimento realizado em triplicatas.

Para avaliar a ativação da superfície da crisotila retirada da zona fluidizada de cada um dos reatores de 2 L, foi novamente empregado o método de adsorção de azul de metileno e o modelo de Langmuir (Figuras 8 a 19), como descrito em 4.1.2. Os valores de V_m calculados para as crisotilas dos reatores de 2 L estão relacionados na tabela VIII. Alguns pontos referentes ao maior valor de C_{eq} apresentaram valores abaixo do esperado devido a problemas de diluição durante a preparação da amostra para leitura no espectrofotômetro.

Tabela VIII: Número de mols de azul de metileno adsorvidos por grama de crisotila (V_m) para as crisotilas retiradas das zonas fluidizadas dos reatores de 2 L. Cálculo usando o modelo de Langmuir, a partir dos dados das Figuras 6 a 17. Duplicatas.

Nº do reator	Reator	α (10^5 g/mol)	V_m (10^{-6} mol/g)
5	ar / água / 1h	4,2	2,4
		4,1	2,5
6	ar / tampão / 1h	3,9	2,6
		4,2	2,4
7	ar / água / 5h	3,6	2,8
		3,5	2,9
8	ar / tampão / 5h	3,7	2,7
		4,9	2,0
9	CO ₂ / água / 1h	3,1	3,2
		3,5	2,9
10	CO ₂ / tampão / 1h	3,7	2,7
		4,2	2,4
11	CO ₂ / água / 5h	3,1	3,1
		3,2	3,1
12	CO ₂ / tampão / 5h	3,7	2,7
		3,8	2,6
13	argônio / água / 1h	3,8	2,7
		3,8	2,7
14	argônio / tampão / 1h	4,0	2,5
		4,6	2,2
15	argônio / água / 5h	3,4	2,9
		3,6	2,8
16	argônio / tampão / 5h	4,2	2,4
		4,0	2,5

Como observado na tabela VIII, em média, todos os valores de V_m calculados para as crisotilas retiradas das zonas fluidizadas dos reatores são maiores do que o valor calculado para a crisotila jateada. Isto indica um aumento na área superficial da crisotila jateada após

tratamento nos reatores de 2 L com fluxo de ar, CO₂ e argônio. O maior valor de V_m foi observado nas crisotilas retiradas dos reatores CO₂/água/1h e CO₂/água/5h

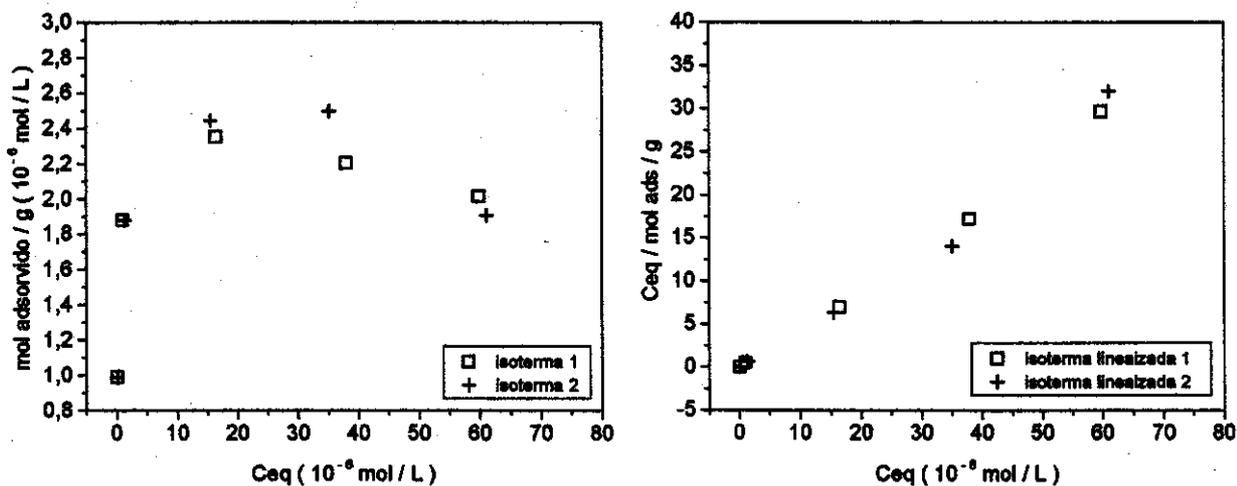


Figura 8: Isothermas de adsorção de azul de metileno sobre crisotila do reator ar/água/1h e isothermas linearizadas segundo modelo de Langmuir. Tempo de adsorção = 10 h, massa de crisotila = 0,50 g, V = 50,0 mL, T = 25°C. Experimento realizado em duplicatas.

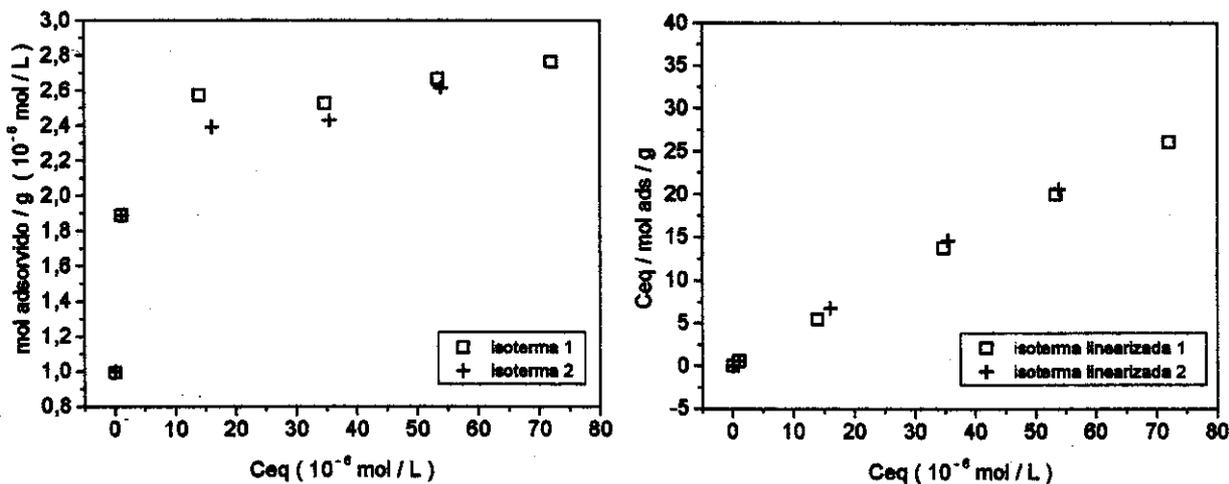


Figura 9: Isothermas de adsorção de azul de metileno sobre crisotila do reator ar/tampão/1h e isothermas linearizadas segundo modelo de Langmuir. Tempo de adsorção = 10 h, massa de crisotila = 0,50 g, V = 50,0 mL, T = 25°C. Experimento realizado em duplicatas.

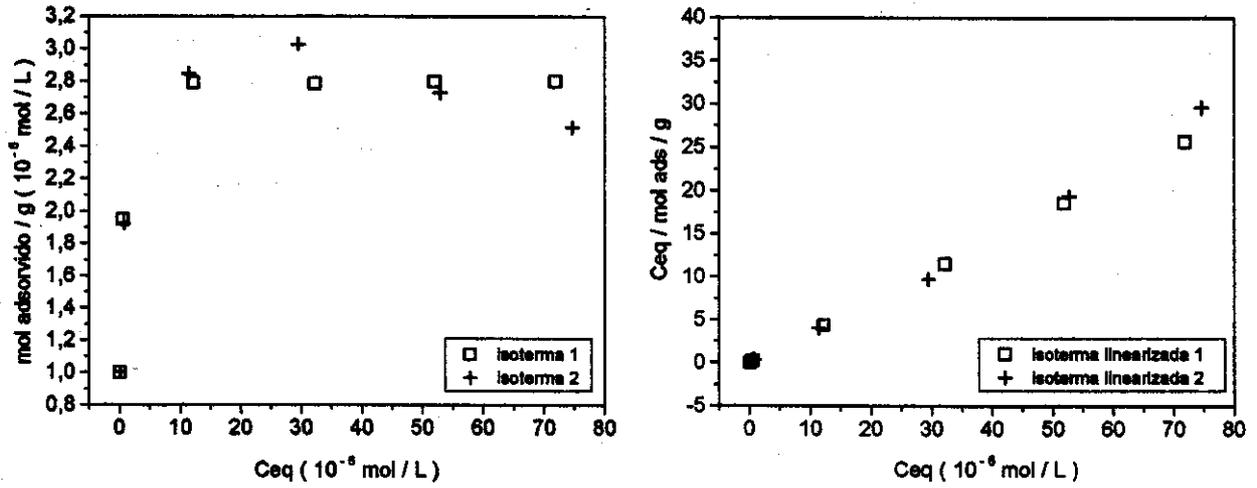


Figura 10: Isoterma de adsorção de azul de metileno sobre crisotila do reator ar/água/5h e isotermas linearizadas segundo modelo de Langmuir. Tempo de adsorção = 10 h, massa de crisotila = 0,50 g, V = 50,0 mL, T = 25°C. Experimento realizado em duplicatas.

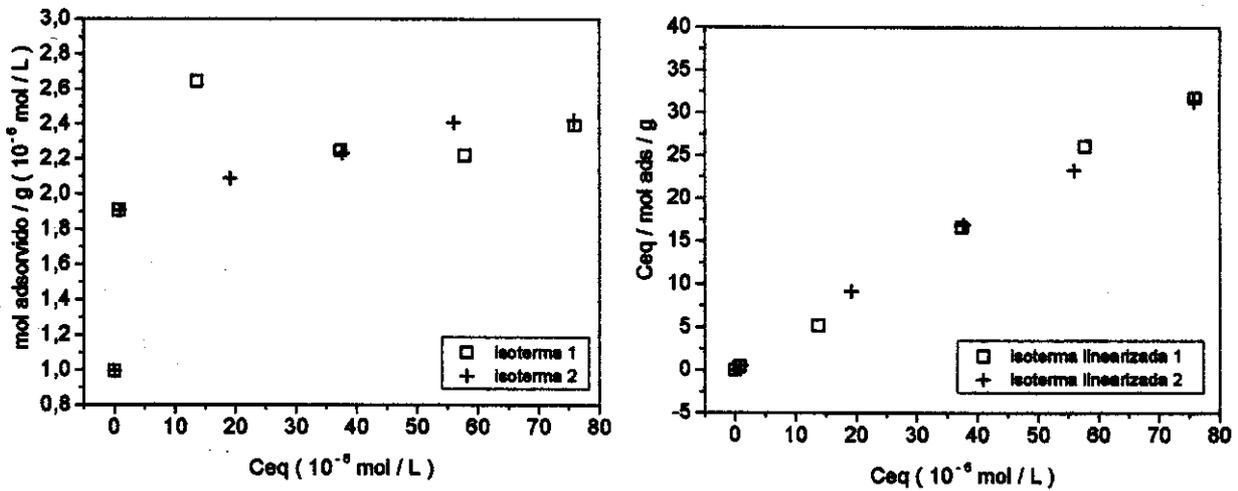


Figura 11: Isotermas de adsorção de azul de metileno sobre crisotila do reator ar/tampão/5h e isotermas linearizadas segundo modelo de Langmuir. Tempo de adsorção = 10 h, massa de crisotila = 0,50 g, V = 50,0 mL, T = 25°C. Experimento realizado em duplicatas.

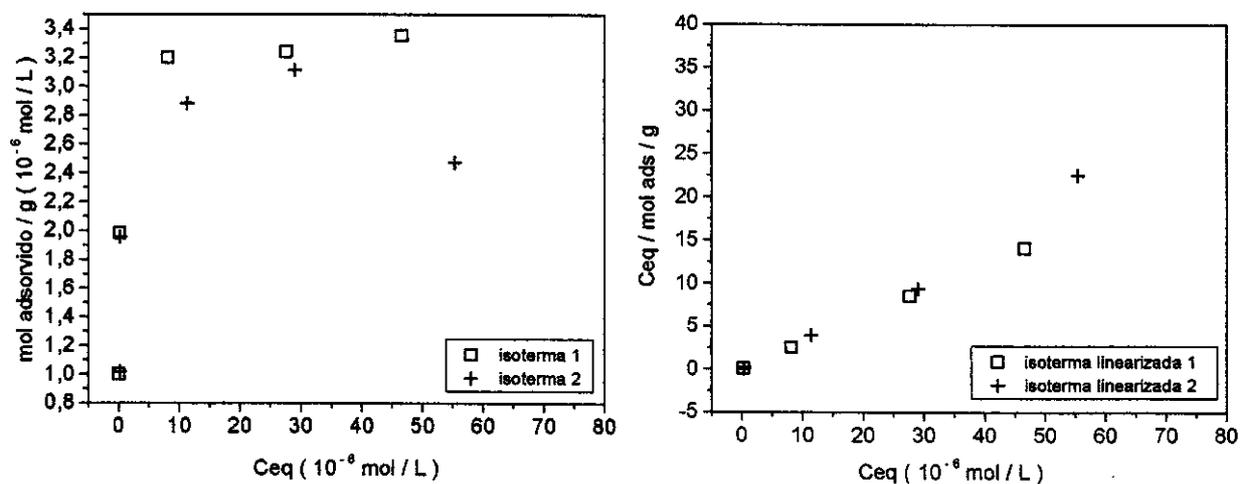


Figura 12: Isothermas de adsorção de azul de metileno sobre crisotila do reator CO₂/água/1h e isothermas linearizadas segundo modelo de Langmuir. Tempo de adsorção = 10 h, massa de crisotila = 0,50 g, V = 50,0 mL, T = 25°C.

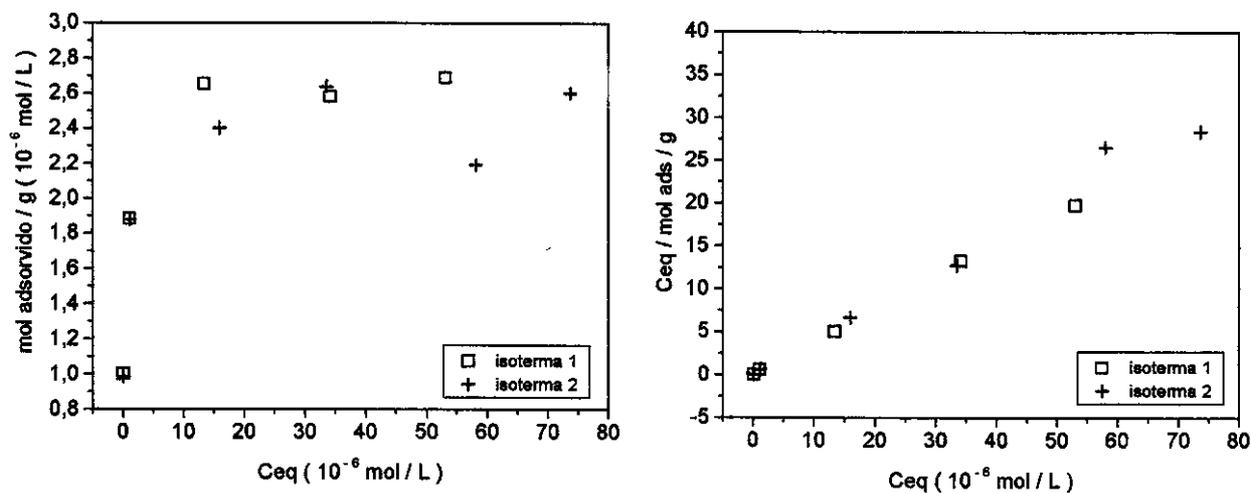


Figura 13: Isothermas de adsorção de azul de metileno sobre crisotila do reator CO₂/tampão/1h e isothermas linearizadas segundo modelo de Langmuir. Tempo de adsorção = 10 h, massa de crisotila = 0,50 g, V = 50,0 mL, T = 25°C.

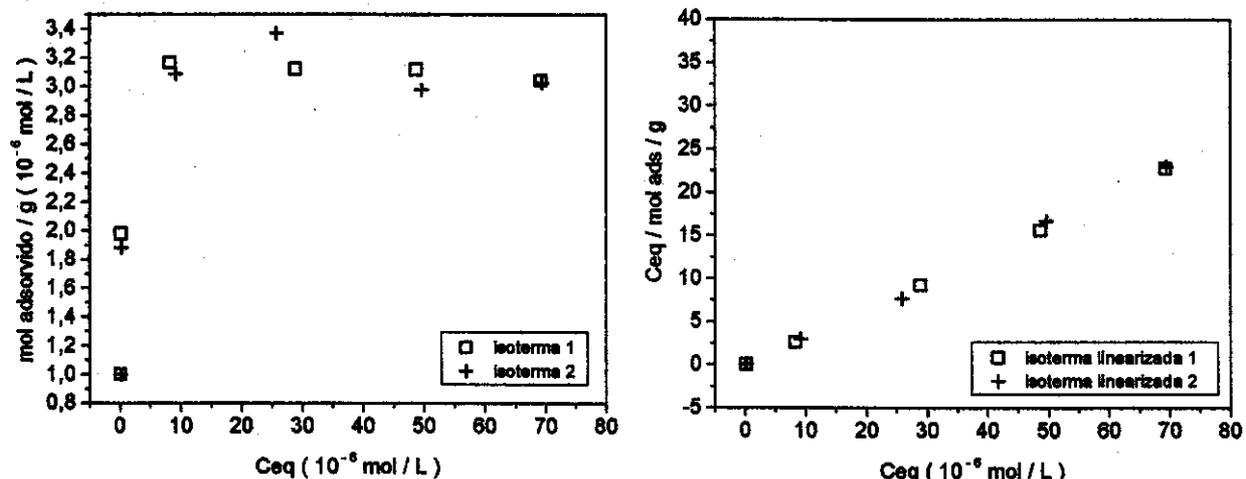


Figura 14: Isothermas de adsorção de azul de metileno sobre crisotila do reator CO₂/água/5h e isothermas linearizadas segundo modelo de Langmuir. Tempo de adsorção = 10 h, massa de crisotila = 0,50 g, V = 50,0 mL, T = 25°C.

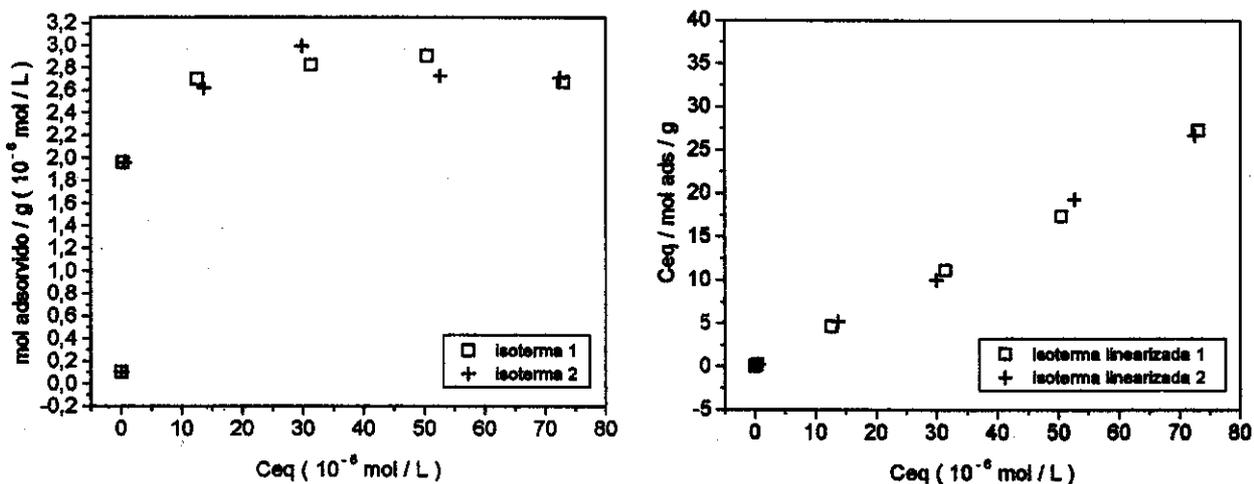


Figura 15: Isothermas de adsorção de azul de metileno sobre crisotila do reator CO₂/tampão/5h e isothermas linearizadas segundo modelo de Langmuir. Tempo de adsorção = 10 h, massa de crisotila = 0,50 g, V = 50,0 mL, T = 25°C.

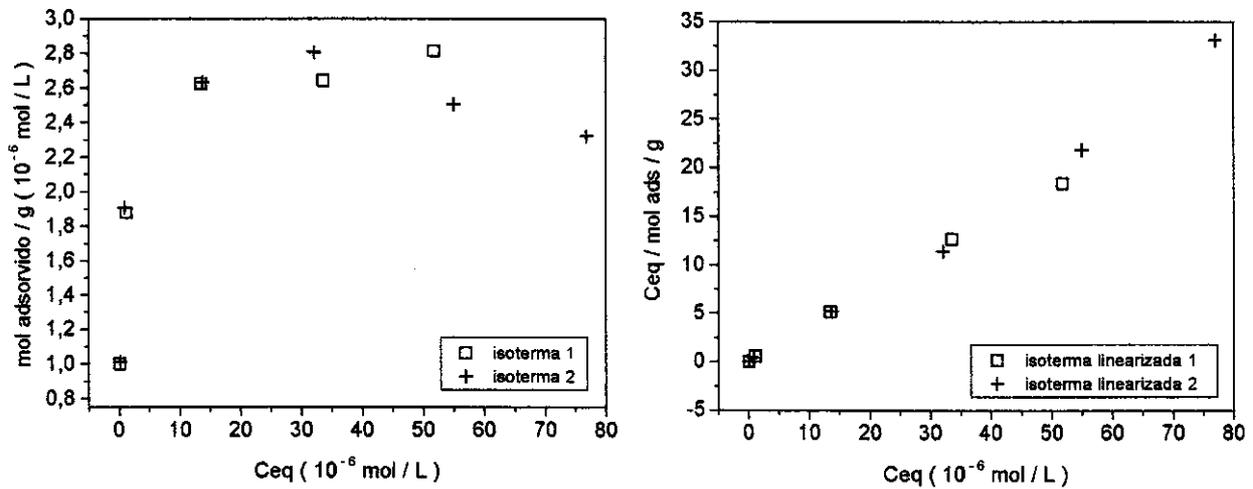


Figura 16: Isothermas de adsorção de azul de metileno sobre crisotila do reator argônio/água/1h e isothermas linearizadas segundo modelo de Langmuir. Tempo de adsorção = 10 h, massa de crisotila = 0,50 g, V = 50,0 mL, T = 25°C.

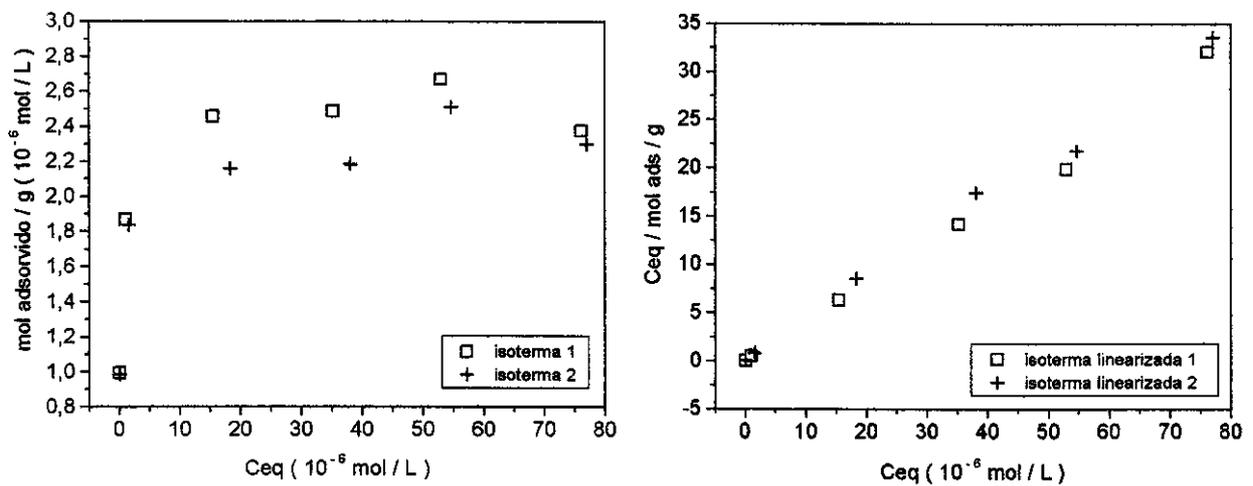


Figura 17: Isothermas de adsorção de azul de metileno sobre crisotila do reator argônio/tampão/1h e isothermas linearizadas segundo modelo de Langmuir. Tempo de adsorção = 10 h, massa de crisotila = 0,50 g, V = 50,0 mL, T = 25°C.

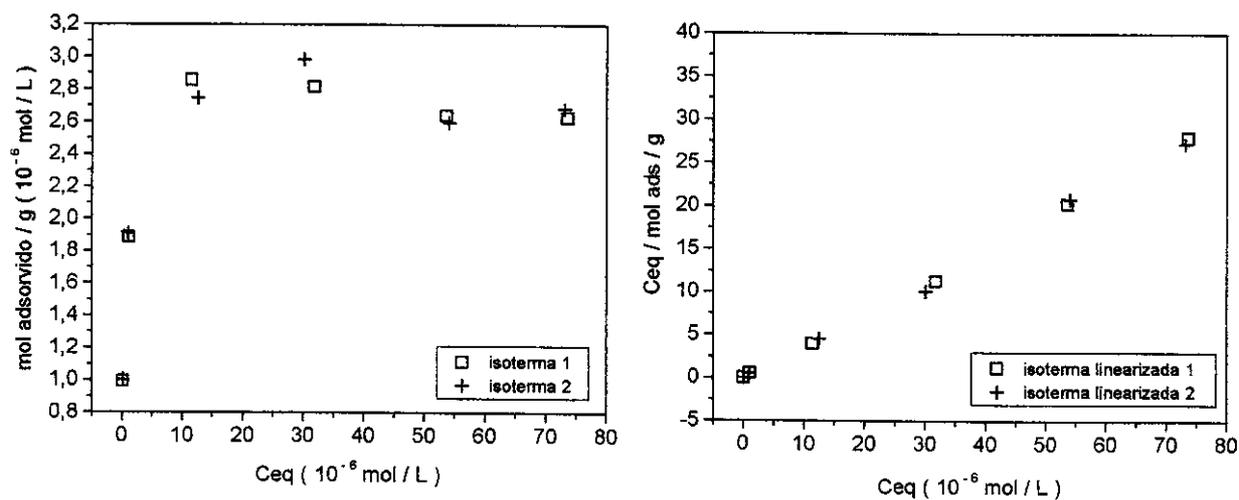


Figura 18: Isothermas de adsorção de azul de metileno sobre crisotila do reator argônio/água/5h e isothermas linearizadas segundo modelo de Langmuir. Tempo de adsorção = 10 h, massa de crisotila = 0,50 g, V = 50,0 mL, T = 25°C.

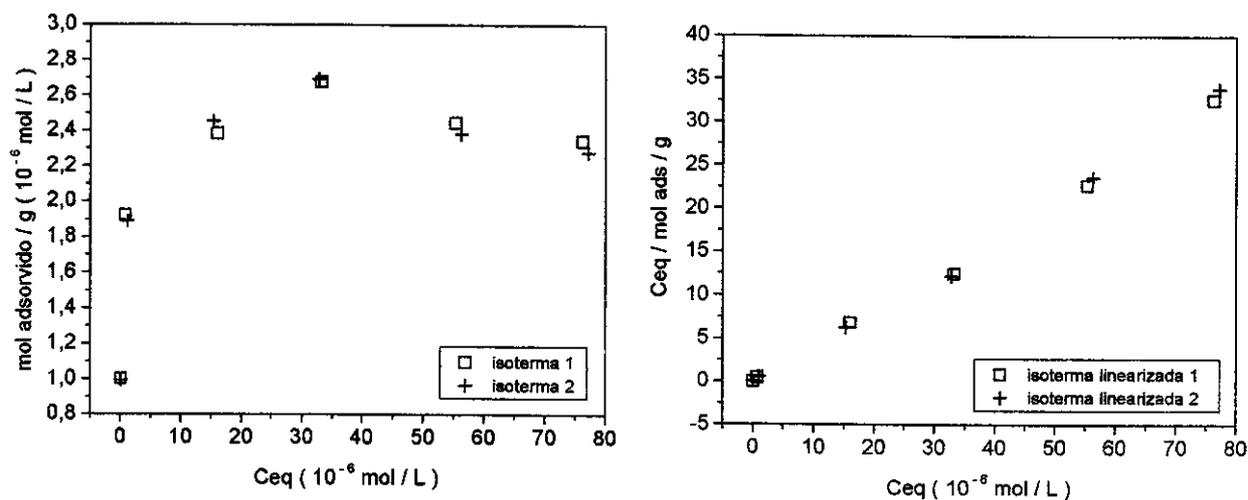


Figura 19: Isothermas de adsorção de azul de metileno sobre crisotila do reator argônio/tampão/5h e isothermas linearizadas segundo modelo de Langmuir. Tempo de adsorção = 10 h, massa de crisotila = 0,50 g, V = 50,0 mL, T = 25°C.

4.2 – Adesão de células e avaliação da atividade celular na presença de crisotila

4.2.1 - Adesão de fermento de pão sobre crisotila

Este experimento foi realizado para se determinar a quantidade de fermento de pão capaz de aderir sobre as crisotilas. Os inúmeros resultados obtidos por este grupo sobre a adesão de fermento de pão sobre crisotilas mostram que a quantidade aderida pode variar de um lote de fermento para outro.

4.2.1.1 - Adesão de fermento seco de pão e fermento seco instantâneo de pão sobre crisotila jateada e ativada

Este experimento foi realizado para se determinar a quantidade de fermento seco de pão e fermento seco instantâneo de pão capaz de aderir sobre a crisotila jateada e a crisotila ativada por ultra-som.

Tabela IX: Valores de massa seca de fermento de pão aderido por grama de crisotila jateada e ativada. Ensaio realizado em quintuplicatas.

Crisotila	Valor médio da relação $m_{\text{fermento}}/m_{\text{crisotila}} \text{ (g / g)}$	Tempo de contato
jateada ^a	$0,33 \pm 0,03$	1h
ativada ^a	$0,58 \pm 0,21$	1h
ativada ^a	$0,47 \pm 0,14$	2h
ativada ^b	$0,30 \pm 0,05$	2h20min

^a. resultado obtido com a utilização de fermento seco de pão

^b. resultado obtido com a utilização de fermento seco instantâneo de pão

Os valores apresentados na tabela IX mostram que o fermento seco de pão adere sobre crisotila ativada em maior quantidade se comparado à crisotila jateada. Os resultados de adesão utilizando fermento seco instantâneo de pão mostram menor quantidade de fermento aderido sobre crisotila ativada.

Durante o tempo de contato, grande parte do fermento seco instantâneo de pão permaneceu suspenso em água. Dados do fabricante indicam a adição de um “agente de dissolução” às células de *Saccharomyces cerevisiae*, o qual pode estar atuando como agente de dispersão neste sistema.

4.2.1.2 - Adesão de fermento de pão sobre as crisotilas retiradas das zonas fluidizadas dos reatores

Este experimento foi realizado para se determinar a quantidade de fermento seco de pão aderido sobre as crisotilas retiradas das zonas fluidizadas dos reatores de 600 mL e de 2L, a fim de comparar aos valores obtidos de adesão sobre as crisotilas jateada e ativada. As Tabelas X e XI apresentam os valores de adesão de fermento de pão sobre as crisotilas retiradas das zonas fluidizadas dos reatores de 600 mL e de 2 L, respectivamente.

Tabela X: Massa seca de fermento de pão aderido por grama de crisotila retirada das zonas fluidizadas dos reatores de 600 mL. Experimentos realizados em quintuplicatas.

Crisotila utilizada	Valor médio da relação $m_{\text{fermento}}/m_{\text{crisotila}} \text{ (g/g)}$	Tempo de contato (h)
ar / água / 1h	$0,62 \pm 0,07$	1
ar / tampão / 1h*	$0,47 \pm 0,08$	1
ar / água / 1h	$0,49 \pm 0,09$	6
ar / tampão / 1h*	$0,63 \pm 0,07$	6

* solução tampão a $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L

Os valores apresentados na tabela X mostram que a quantidade de fermento de pão aderido sobre as crisotilas retiradas das zonas fluidizadas de todos os reatores são maiores do que a adesão observada sobre a crisotila jateada. Os maiores valores são apresentados pelas crisotilas retiradas dos reatores montados com água destilada e 1 hora de contato com as células e, para as crisotilas retiradas dos reatores montados com solução tampão de HAc/NaAc 10^{-3} mol/L e 6 horas de contato com as células, onde se observa um aumento de 100% na quantidade de fermento aderido, em relação à crisotila jateada.

Tabela XI: Valores de massa seca de fermento de pão aderido por grama de crisotila retirada dos reatores de 2L, com água destilada e solução tampão HAc/NaAc $3,3 \times 10^{-2}$ mol/L com fluxo de ar, CO₂ e argônio. Ensaios realizados em quintuplicatas.

Reator	Crisotila	Valor médio da relação $m_{\text{fermento}}/m_{\text{crisotila}}$ (g/g)	Tempo de contato (h)
5	ar / água / 1h	$0,44 \pm 0,05$	2
6	ar / tampão / 1h	$0,51 \pm 0,08$	2
7	ar / água / 5h	$0,56 \pm 0,10$	2
8	ar / tampão / 5h	$0,56 \pm 0,08$	1
9	CO ₂ / água / 1h	$0,46 \pm 0,09$	2
10	CO ₂ / tampão / 1h	$0,39 \pm 0,07$	2
11	CO ₂ / água / 5h	$0,50 \pm 0,17$	1
12	CO ₂ / tampão / 5h	$0,51 \pm 0,08$	1
13	argônio / água / 1h	$0,50 \pm 0,14$	1
14	argônio / tampão / 1h	$0,45 \pm 0,04$	1
15	argônio / água / 5h	$0,58 \pm 0,06$	1
16	argônio / tampão / 5h	$0,46 \pm 0,11$	1

Os valores apresentados na tabela XI mostram que a quantidade de fermento de pão aderido por grama de crisotila retirada das zonas fluidizadas de todos os reatores é maior do que a quantidade aderida sobre a crisotila jateada. Os melhores resultados de adesão são observados nas crisotilas dos reatores 7, 8 e 15, que representam um aumento na quantidade de fermento aderido de até 75%. Em média, a quantidade de fermento aderido sobre crisotila aumentou em 50%. O menor valor de adesão é observado sobre a crisotila do reator 10.

4.2.2 – Atividade fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* suportada em crisotila

4.2.2.1 - Atividade fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* suportada em crisotila, na fermentação de D-glucose

Este ensaio foi realizado para avaliar a atividade das células de *Saccharomyces cerevisiae* suportadas na crisotila retirada da zona fluidizada do reator ar/tampão/1h e da crisotila ativada, durante a fermentação de meio de D-glucose enriquecido a 250 e 300 g/L, comparada ao sistema controle de células livres, sem adição de crisotila.

O processo de fermentação realizado em condições anaeróbias consiste na metabolização da glicose em etanol, podendo ser representada estequiometricamente por:¹⁶



Com a saída do CO₂ produzido no sistema, é possível utilizar o método gravimétrico para avaliar a atividade fermentativa das células durante a fermentação da D-glucose pela diminuição da massa inicial do sistema. A partir dos valores de diferença de massa, foi estimada a quantidade de CO₂ produzida em função do tempo, durante a fermentação.

Para avaliar a fermentação alcoólica das células, através da produção de CO₂, utilizando a crisotila como suporte, foram construídos gráficos a partir dos valores de massa de CO₂ produzida em função do tempo, para os sistemas com células imobilizadas em crisotila e células livres.

As curvas obtidas nos gráficos apresentados nas Figuras 20 e 21, mostram que ambos sistemas contendo células imobilizadas em crisotila ativada por ultra-som e tratada no reator ar/tampão/1h, aumentaram a velocidade de fermentação quando comparados aos sistemas controles. Os valores calculados da inclinação das retas para os sistemas com células imobilizadas em crisotila foram: 0,06; 0,07 e 0,09 para a fermentação de meios de D-glucose a 300, 250 e 150 g/L, respectivamente. Para os sistemas controles foram: 0,05; 0,06 e 0,07. As velocidades de fermentação em todos os sistemas diminuem com o aumento da concentração de D-glucose do meio.

Na Figura 20, as curvas obtidas nos gráficos mostram que ambos sistemas contendo células imobilizadas em crisotila, ativada por ultra-som e tratada no reator ar/tampão/1h, atingiram a produção máxima de CO₂ em menor tempo, quando comparado ao sistema contendo células livres. A maior diferença observada, cerca de 20%, foi apresentada pelos sistemas contendo células imobilizadas em crisotila, durante a fermentação do meio de D-glucose enriquecido a 300 g/L. A produção de CO₂ apresentada pelas células suportadas na crisotila ativada por ultra-som foi a mesma observada para as células suportadas na crisotila tratada no reator ar/tampão/1h.

A massa seca inicial de células foi de 10,6 g/L ± 0,8 para os ensaios com meio de D-glucose a 250 e 300 g/L. A massa seca de células ao final da fermentação, para os meios contendo 250 e 300 g/L, foi de 11,8 g/L ± 0,2 e de 11,4 g/L ± 0,5; respectivamente. Foi observada a presença de células livres no meio dos sistemas montados com células imobilizadas em crisotila ativada por ultra-som e tratada no reator ar/tampão/1h ao final no experimento. A massa seca destas células, ao final da fermentação, foi da ordem de 3 g/L. Estes ensaios de massa seca foram feitos com membranas de éster de celulose, em duplicatas.

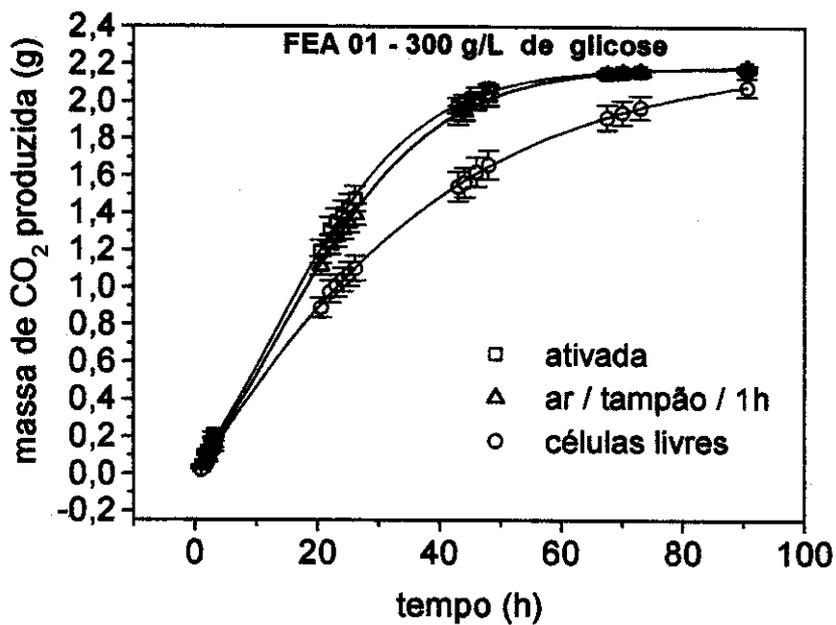
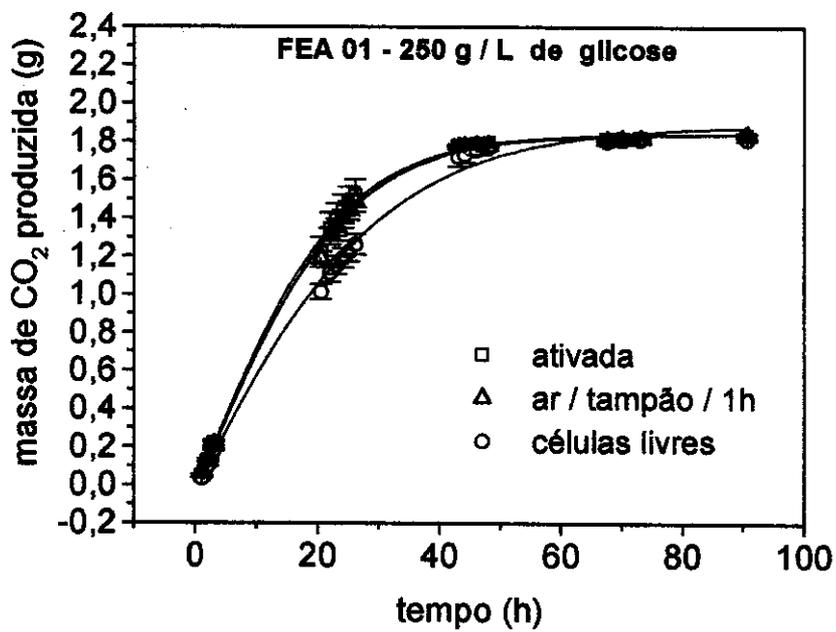


Figura 20: Massas médias de CO₂ (g) produzidas em função do tempo de fermentação. Sistemas com 0,6 g de células livres ou imobilizadas em 1,0 g de crisotila. 15 mL de meio de fermentação de D-glucose enriquecido em concentrações de 250 e 300 g/L, uréia 3 g/L e MgSO₄ 0,5 g/L com pH = 4,5. T = 30°C. Média de triplicatas de amostra.

Durante a preparação de um dos ensaios, o meio de fermentação de D-glucose a 300 g/L foi acidentalmente diluído a 150 g/L. Dado o início do ensaio, resolvemos mantê-lo, uma vez que esta é a quantidade de ART utilizada nas dornas das usinas. Neste caso, também foi possível observar que a produção máxima de CO₂ foi atingida em menor tempo, como mostra a Figura 21. A massa seca inicial de células foi de 11,4 g/L ± 0,4; e a massa seca final foi de 12,0 g/L ± 0,6. A massa seca foi determinada em membranas de éster de celulose, em duplicatas.

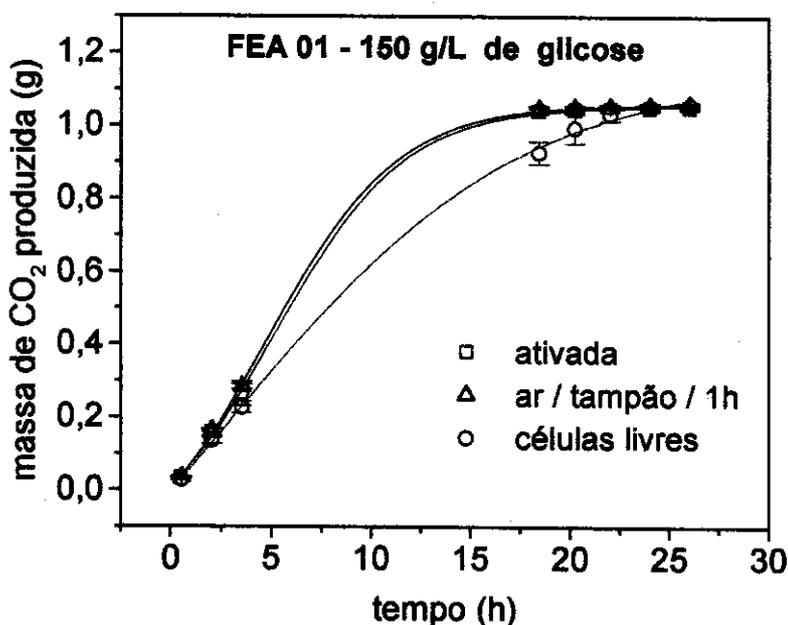


Figura 21: Massas médias de CO₂ (g) produzidas em função do tempo de fermentação. Sistemas com 0,6 g de células livres ou imobilizadas em 1,0 g de crisotila. 15 mL de meio de fermentação de D-glucose enriquecido em concentração de 150 g/L, uréia 1,5 g/L e MgSO₄ 0,25 g/L com pH = 4,5. T = 30°C. Média de triplicatas de amostra.

4.2.2.2 - Atividade fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* suportada em crisotila, na fermentação de melaço

Este ensaio foi realizado para avaliar a velocidade de produção de CO₂ por células de *Saccharomyces cerevisiae* suportadas na proporção 1:0,6 crisotila/células, utilizando meio de melaço.

Para realizar este ensaio como descrito para a fermentação de D-glucose em meio estéril, seria necessário esterilizar o meio de melaço. Entretanto, o processo de esterilização provoca a precipitação de “impurezas”, que altera sua composição inicial. Como não estávamos interessados em utilizar um meio de melaço modificado nos ensaios de atividade

fermentativa, e ao considerar que um ensaio realizado em condições não-estéreis deveria levar menos de 24 horas para atingir a produção máxima de CO_2 , decidimos diminuir o volume de meio de meloço para 10% em relação à massa de células utilizada. Dessa forma, seria possível minimizar o problema de competição de outros microrganismos com a levedura. No entanto, as curvas obtidas no gráfico apresentado na Figura 22, mostram que a velocidade fermentação foi a mesma nos três sistemas.

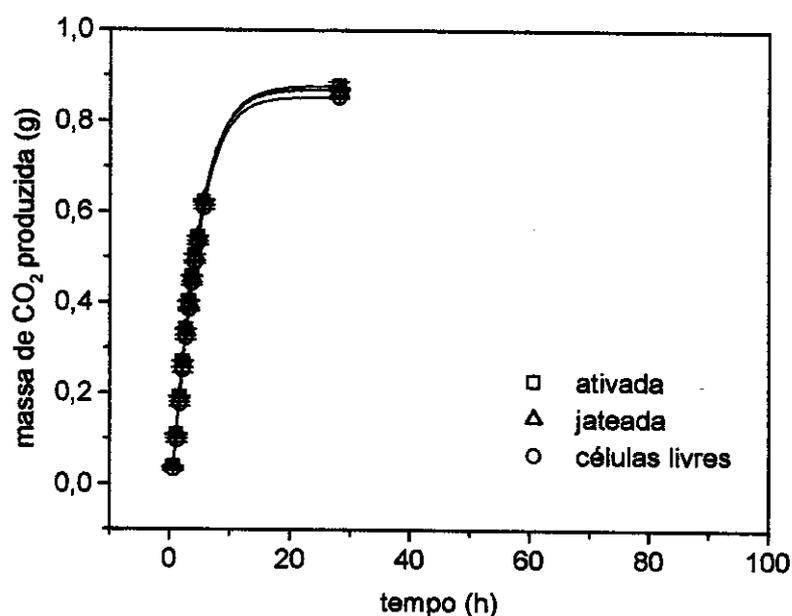


Figura 22: Massas médias de CO_2 (g) produzidas em função do tempo de fermentação. Sistemas com 0,6 g de células livres ou imobilizadas em 1,0 g de crisotila, utilizando 7 mL de meloço a 250g de ART/L, pH = 4,5, T = 30°C. Média de duplicatas de amostra.

Entretanto, ao analisar os valores de massa de CO_2 produzida nas 4 primeiras horas de fermentação, foram observados aumentos de 26 e 18% na velocidade de produção de CO_2 , respectivamente, para as células suportadas na crisotila ativada por ultra-som e na crisotila jateada, em relação às células livres, como mostra a Figura 23.

O processo de ativação da superfície da crisotila faz com que as células suportadas em crisotila ativada por ultra-som produzam mais CO_2 , quando comparadas às células suportadas em crisotila jateada e ao sistema controle, que apresenta células livres.

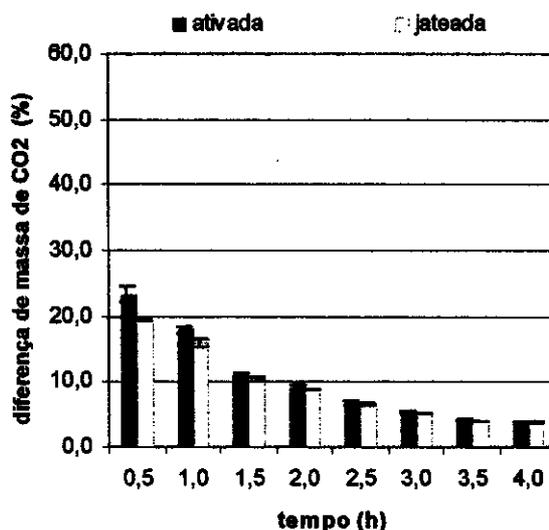


Figura 23: Massa de CO₂ relativa produzida em relação ao sistema controle, durante a fermentação de 7 mL de meloço a 250g de ART/L, utilizando 0,6 g de células em 1,0 g de crisotila ativada e crisotila jateada, T = 30°C e pH = 4,5. Ensaios realizados em duplicatas.

4.2.3 – Atividade fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* usando crisotila como acelerador na fermentação de meloço

As proporções de células/crisotila e de meloço utilizadas foram preparadas de acordo com os ensaios exploratórios realizados por Maurício Rigo em sua Dissertação de Mestrado.

Este ensaio foi realizado para se avaliar a velocidade de produção de CO₂ por células de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando a crisotila como aditivo no processo de fermentação de meloço, visando a produção de etanol em sistema de batelada, em valor superior a utilizada nas dornas das usinas, entre 150 e 180 g/L de ART.

4.2.3.1 – Fermentação de meloço por células de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando crisotila como acelerador nas proporções 1:10 e 1:5 crisotila/células

Este ensaio foi realizado para avaliar a atividade fermentativa das células livres de *Saccharomyces cerevisiae*, durante a fermentação de meloço, utilizando as crisotilas retiradas das zonas fluidizadas dos reatores, comparado-os aos sistemas utilizando crisotila ativada por ultra-som e ao sistema controle, sem adição de crisotila. A utilização de um sistema controle a cada novo ensaio é fundamental em sistemas que utilizam células. Alterações nas condições necessárias para o crescimento das células, bem como a forma de inoculação no meio, podem ocasionar alterações significativas no metabolismo celular.

A partir da inclinação das retas dos sistemas montados em presença de crisotila e nos sistemas controles (Figuras 24 e 25), foram calculadas as velocidades iniciais de fermentação de 30 a 120 minutos. Os valores calculados estão listados na tabela XII.

Os valores de massa seca inicial de células para cada ensaio foram obtidos a partir de um volume conhecido da suspensão de células, após a secagem em estufa a vácuo. Estes valores estão listados na tabela XII.

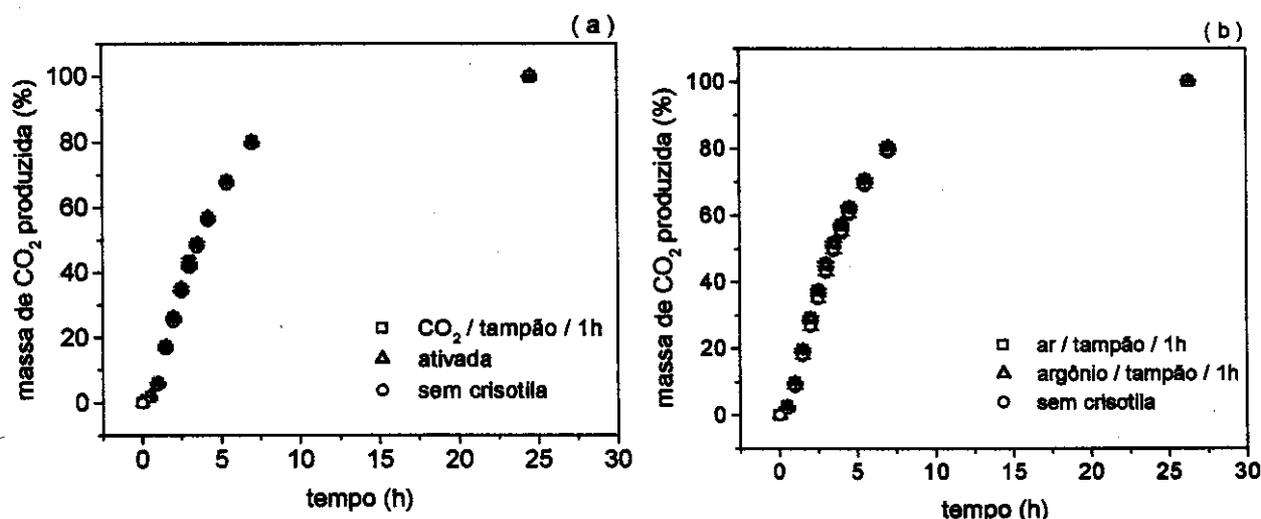


Figura 24: Massa de CO₂ produzida por massa de CO₂ teórica em porcentagem durante a fermentação de melão diluído em presença de crisotila, com 10% (m/V_{final}) de células de *Saccharomyces cerevisiae* (base úmida) e 15 mL de melão a 250 g/L. Agitação de 200 rpm, T = 32 °C, pH = 4,5, meio não estéril. (a) 1:10 de crisotila tratada em solução tampão com fluxo de CO₂ por 1 hora e crisotila ativada, triplicatas de amostras. (b) 1:10 de crisotila tratada em solução tampão com fluxo de ar e de argônio durante 1 hora, duplicatas de amostras.

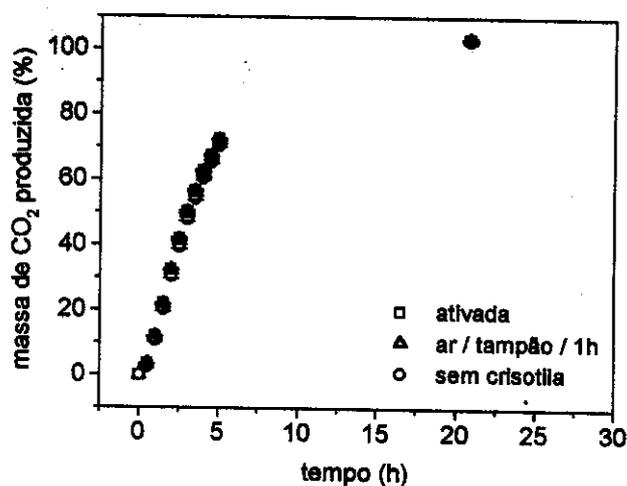


Figura 25: Massa de CO₂ produzida por massa de CO₂ teórica em porcentagem durante a fermentação de melado diluído em presença de crisotila, com 10% (m/V_{final}) de células de *Saccharomyces cerevisiae* (base úmida) e 15 mL de melado a 250 g/L. Agitação de 200 rpm, T = 32 °C, pH = 4,5, meio não estéril, com 1:5 de crisotila ativada e crisotila tratada em solução tampão com fluxo de ar por 1 hora, triplicatas de amostras.

Tabela XII: Velocidades iniciais de fermentação, de 30 a 120 minutos, para os sistemas contendo crisotila e sistemas controle, na fermentação de melado a 250 g/L, e massa seca de células iniciais para cada ensaio.

Crisotila tratada	Velocidade inicial de fermentação (% de CO ₂ / h)	Massa seca inicial de células (g / L)
CO ₂ /tampão/1h (1:10)	16,7	
ativada (1:10)	16,7	27,3
sistema controle	16,0	
ar/tampão/1h (1:10)	17,9	
argônio/tampão/1h (1:10)	17,8	28,9
sistema controle	16,7	
ativada (1:5)	19,4	
ar/tampão/1h (1:5)	19,3	28,7
sistema controle	18,6	

Apesar da adição de crisotila, as velocidades iniciais de fermentação destes sistemas apresentam valores próximos dos sistemas controle. Estes resultados diferem do apresentado por Fregonesi,⁸ aumento da atividade metabólica e do consumo final de glicose, em meio estéril, quando se utiliza células imobilizadas sobre crisotila. É preciso ressaltar que o sistema montado neste trabalho apresenta grande quantidade de células livres e utiliza meio não esterilizado de melado no processo de fermentação.

Entretanto, ao analisar os valores de massa de CO_2 produzida, foram observados aumentos de até 32% na velocidade de produção de CO_2 nos primeiros 30 minutos de fermentação em todos os sistemas contendo crisotila (Figuras 26 e 27).

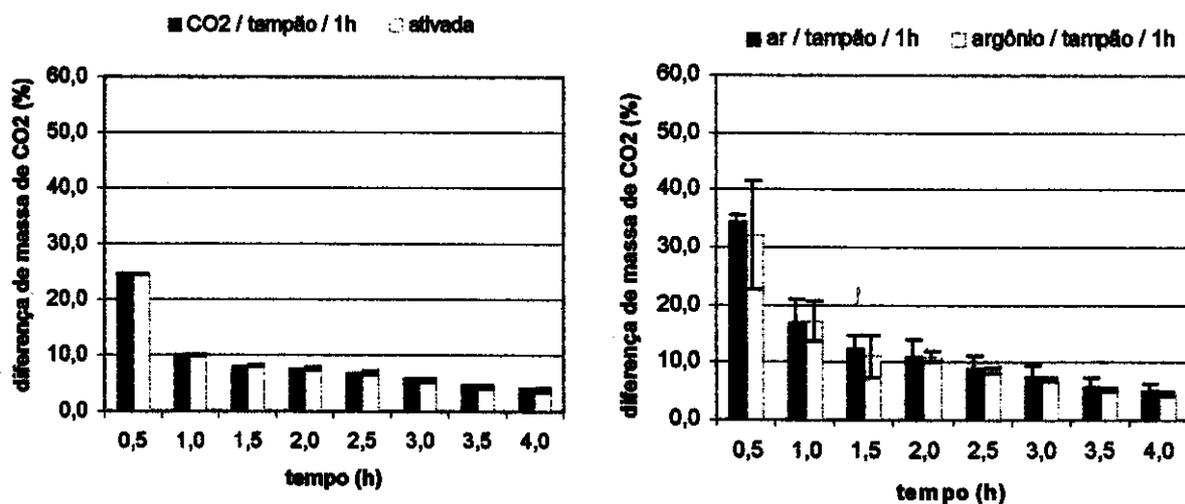


Figura 26: Massa de CO_2 relativa produzida em relação ao sistema controle durante a fermentação de 15 mL de melão (250g de ART/L) em presença de crisotila na proporção de 1:10 crisotila/células, utilizando crisotila ativada por ultra-som e crisotilas tratadas em solução tampão com fluxo de CO_2 , (triplicatas) ar e argônio (duplicatas) por 1 hora.

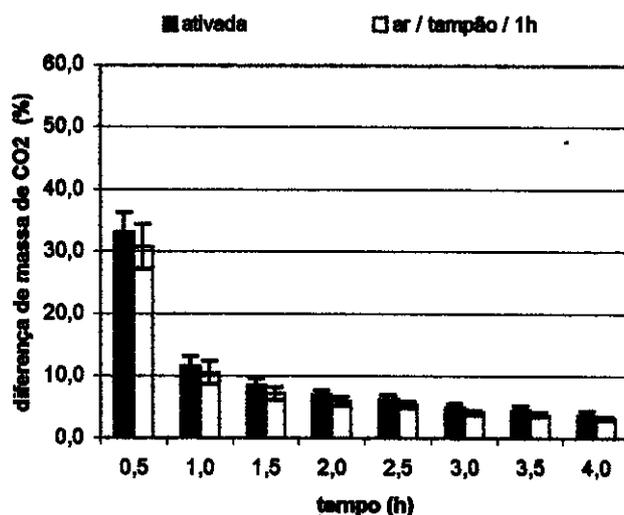


Figura 27: Massa de CO_2 relativa produzida em relação ao sistema controle durante a fermentação de 15 mL de melão (250g de ART/L) em presença de crisotila na proporção de 1:5 crisotila/células, utilizando crisotila tratada em solução tampão com fluxo de CO_2 por 1 hora e crisotila ativada. Ensaios realizados em triplicatas.

Estes resultados mostraram que a adição de crisotila em quantidade menor do que a necessária para a crisotila ser utilizada como suporte de células, também faz com que as células aumentem a velocidade de produção de CO₂, se comparadas ao sistema controle, sem a adição de crisotila. Os resultados obtidos ao se utilizar a crisotila tratada nos reatores mostraram-se semelhantes ao obtido com a utilização da crisotila ativada por ultra-som.

4.3 – Microscopia Eletrônica de Varredura

A Microscopia Eletrônica de Varredura foi realizada para observar as alterações provocadas na crisotila 5R recebida da mina após os processos de jateamento e tratamento nos reatores de gases; bem como verificar a presença e o acomodamento de células de *Saccharomyces cerevisiae* nas crisotilas tratadas nos reatores de gases após a fermentação de melão.

4.3.1 – Microscopia Eletrônica de Varredura das crisotilas 5R tal como recebida da mina e após tratamento

A Figura 28 mostra a crisotila 5R tal como recebida da mina. Na Figura 28a, foi observada a presença de grande quantidade de fragmentos (material que denominamos pó) de diversos tamanhos e formas incorporados às fibras e fibrilas da crisotila. Na Figura 28b, foi observada uma fibra da crisotila 5R parcialmente aberta em maior aumento, recoberta por pó. Apesar da parcial abertura, os feixes e fibrilas da crisotila apresentam-se bem empacotados.

O processo de jateamento da crisotila 5R remove o pó incorporado as fibras e fibrilas, como mostra a Figura 29a. Foi observado que os feixes da crisotila jateada apresentam-se empacotados, com fibrilas um pouco mais abertas, principalmente nas extremidades. A Figura 29b mostra a crisotila tratada no reator CO₂/água/5h. Foi observada maior quantidade de fibrilas abertas após o tratamento da crisotila no reator. Os feixes mostraram-se menos empacotados, com fibrilas bem abertas nas extremidades. Isto justifica o aumento de 50% na adsorção de azul de metileno sobre a crisotila tratada no reator CO₂/água/5h, $V_m = 3,0 \times 10^{-6}$ mol/g (Tabela VII) é resultado do aumento da área superficial da crisotila após o tratamento no reator.

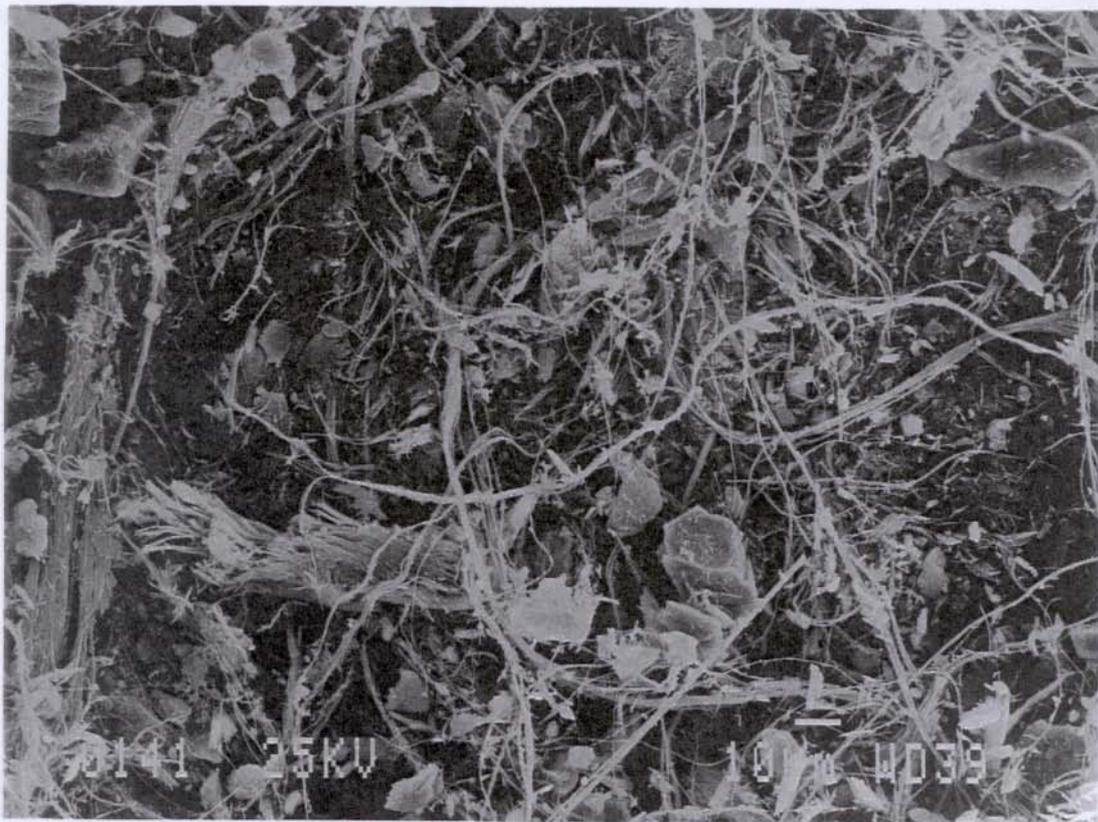
As Figuras 30a e 30b mostram as crisotilas tratadas nos reatores CO₂/água/1h e ar/tampão/1h, respectivamente. Os feixes e fibrilas da crisotila tratada no reator ar/tampão/1h apresentam-se um pouco menos fibriladas do que as tratadas nos reatores CO₂/água/1h e

CO₂/água/5h. Este resultado está de acordo com o obtido para a adsorção de azul de metileno, $V_m = 2,6 \times 10^{-6}$ mol/g (Tabela VII). Foram observadas a presença de enovelamentos nas crisotilas tratadas nos reatores CO₂/água/1h e CO₂/água/5h, e em menor quantidade na crisotila do reator ar/tampão/1h. Cassiolaⁱⁱⁱ observou a presença destes enovelamentos significativamente nas crisotilas tratadas nos reatores de fluxo de gases e que a crisotila ativada por ultra-som não apresenta estes enovelamentos. A passagem de CO₂ por 5 horas parece não aumentar a quantidade de feixes e fibrilas abertas, quando comparadas a crisotila tratada no reator CO₂/água/1h.

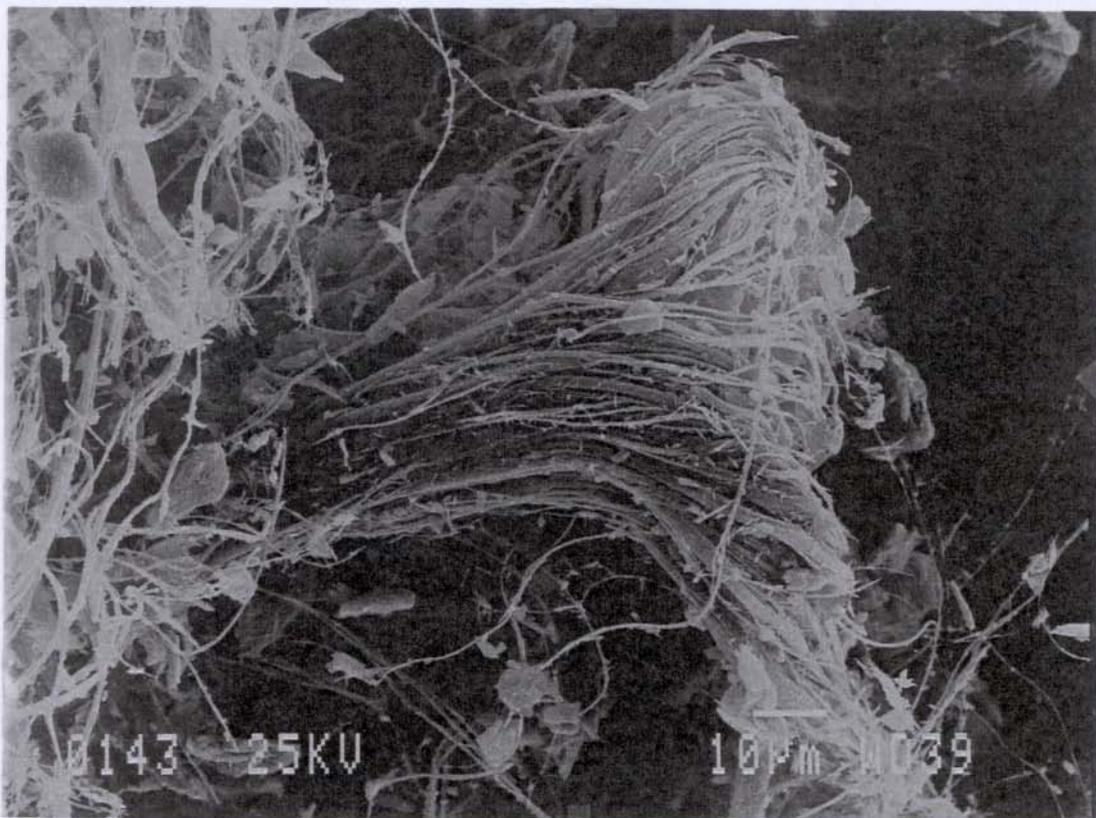
As Figuras 31a, 31b e 31c mostram as fibrilas das crisotilas tratadas nos reatores CO₂/água/1h, CO₂/água/5h e ar/tampão/1h em maior aumento. Apesar dos diferentes meios, gases e tempos de tratamento, as crisotilas dos reatores CO₂/água/1h, CO₂/água/5h e ar/tampão/1h apresentam fibrilas muito semelhantes. Foram observadas, fibras com diferentes graus de fibrilação. Isto pode indicar que a crisotila está sendo fibrilada da mesma maneira nos diferentes reatores.

As Figuras 32a e 32b mostram os enovelamentos presentes nas crisotila tratadas nos reatores CO₂/água/1h e CO₂/água/5h em maior aumento. Os enovelamentos são formados por grande quantidade de fibrilas abertas e enoveladas. A passagem dos gases poderiam estar formando os enovelamentos mecanicamente, ao enovelar as fibrilas após a abertura dos feixes; ou poderiam estar modificando quimicamente a superfície das fibrilas, mantendo-as enoveladas. Os espectros no infravermelho das fibras de crisotilas tratadas nos reatores que poderiam indicar modificação química da superfície das fibrilas foram inconclusivos.

ⁱⁱⁱ comunicação pessoal



(a)



(b)

Figura 28: Micrografias eletrônicas de varredura da crisotila 5R: a) tal como recebida da mina; b) tal como recebida da mina, em maior aumento.

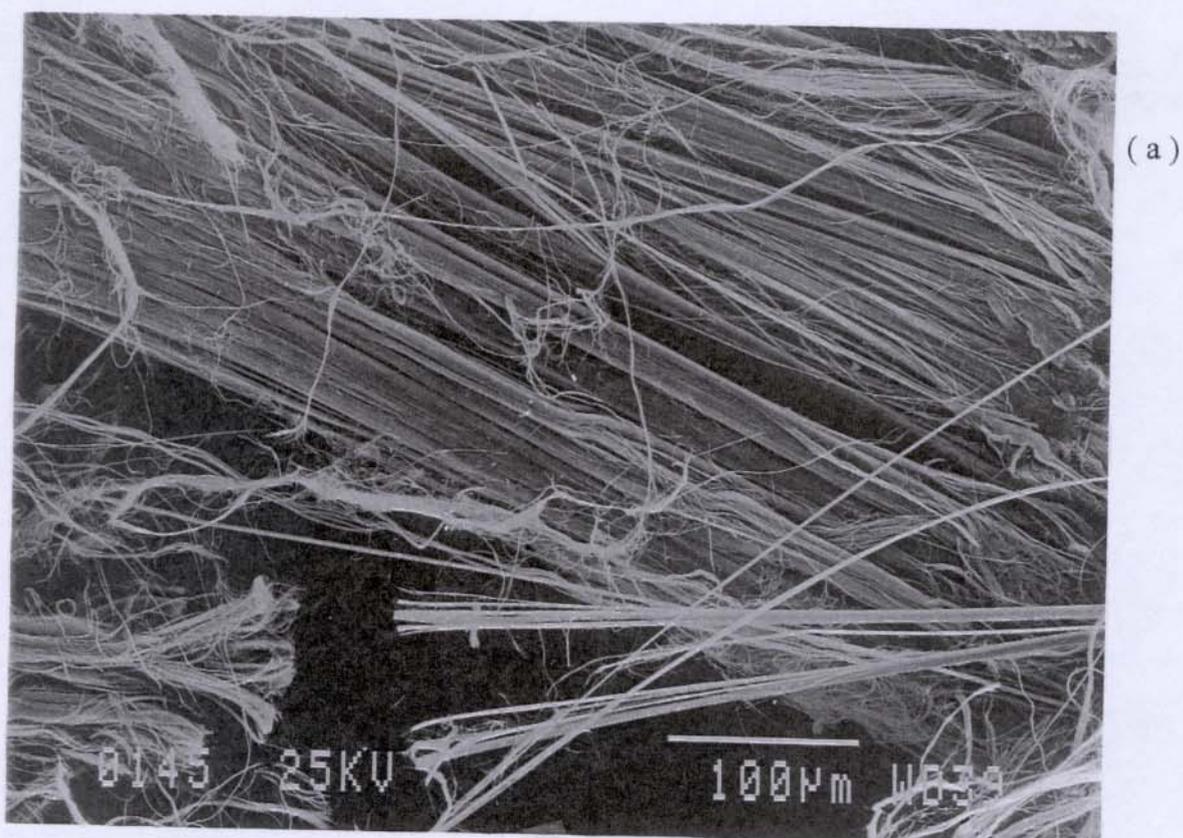


Figura 29: Micrografias eletrônicas de varredura da crisotila: a) jateada; b) tratada no reator CO₂/água/5h.

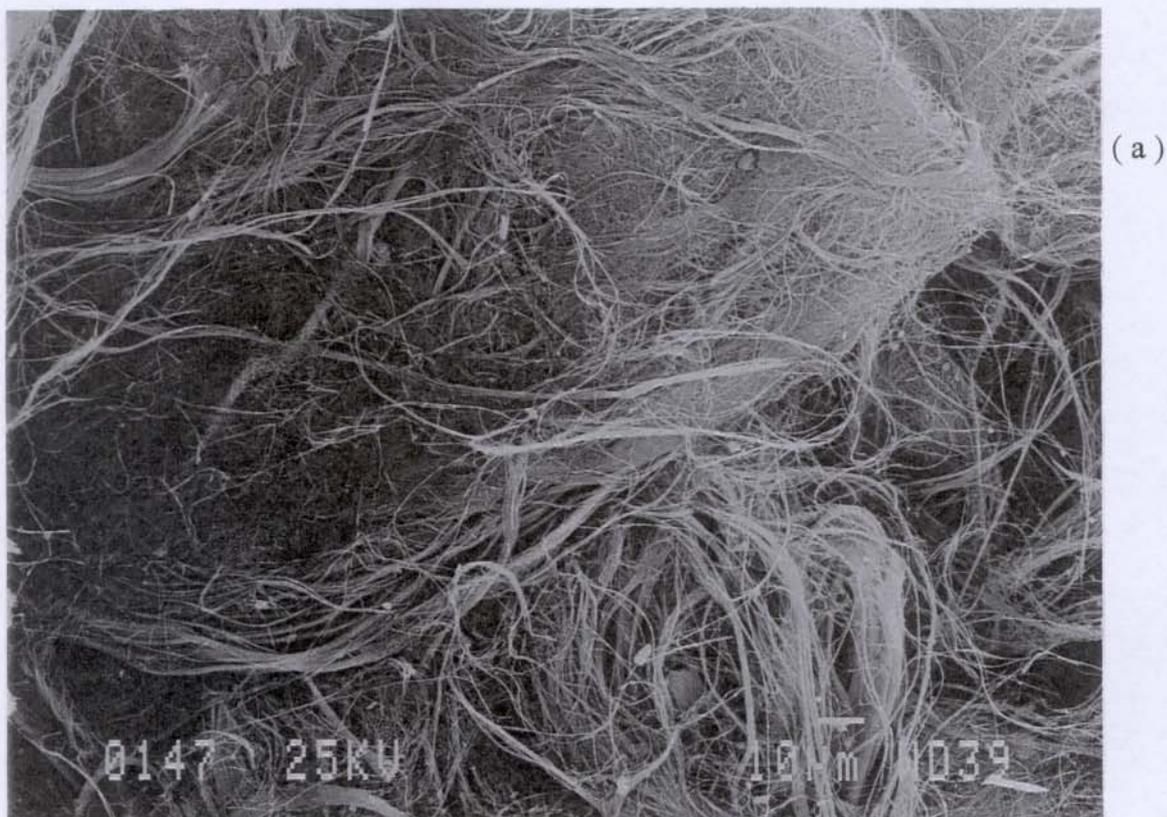


Figura 30: Micrografias eletrônicas de varredura da crisotila: a) tratada no reator CO₂/água/1h; b) tratada no reator ar/tampão/1h.

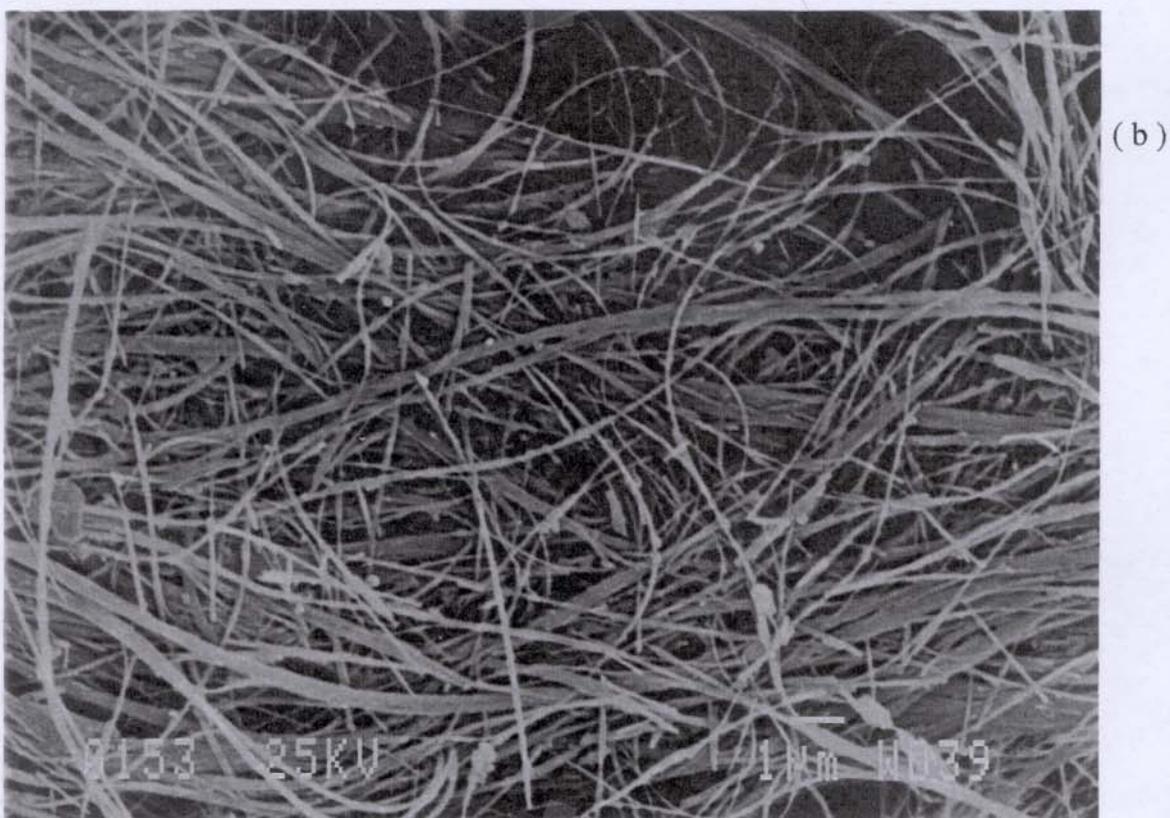
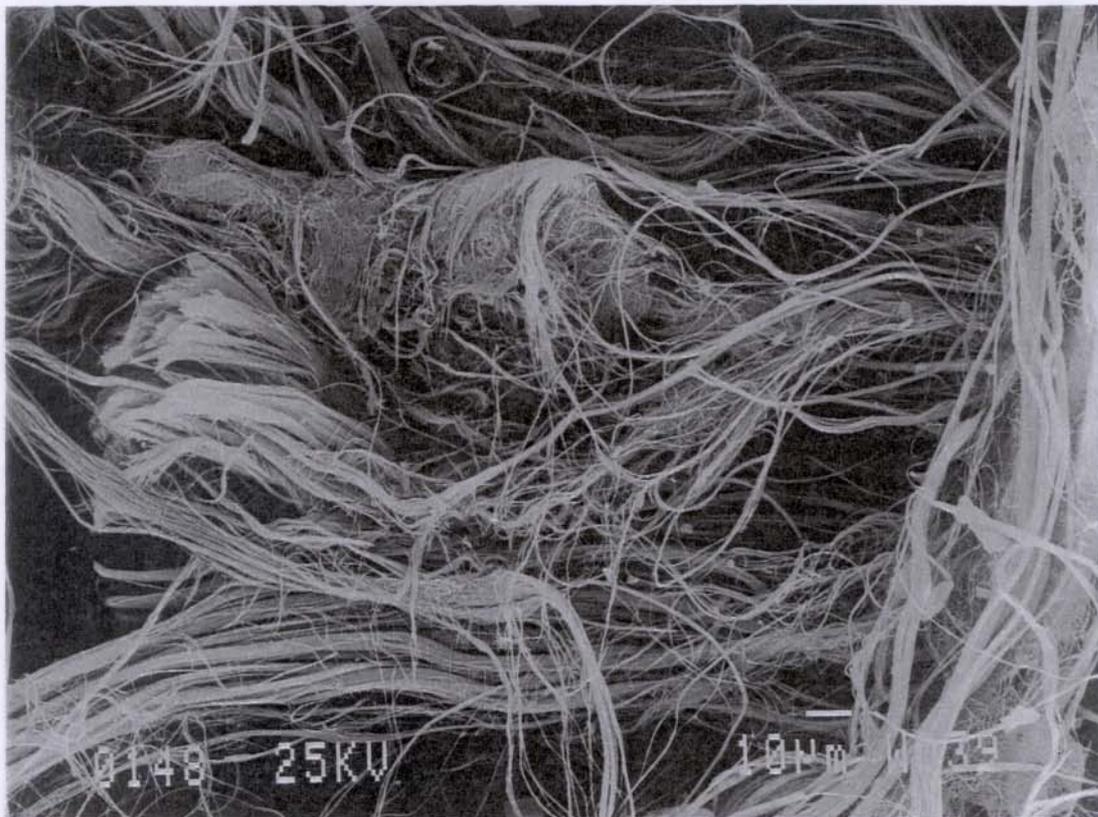


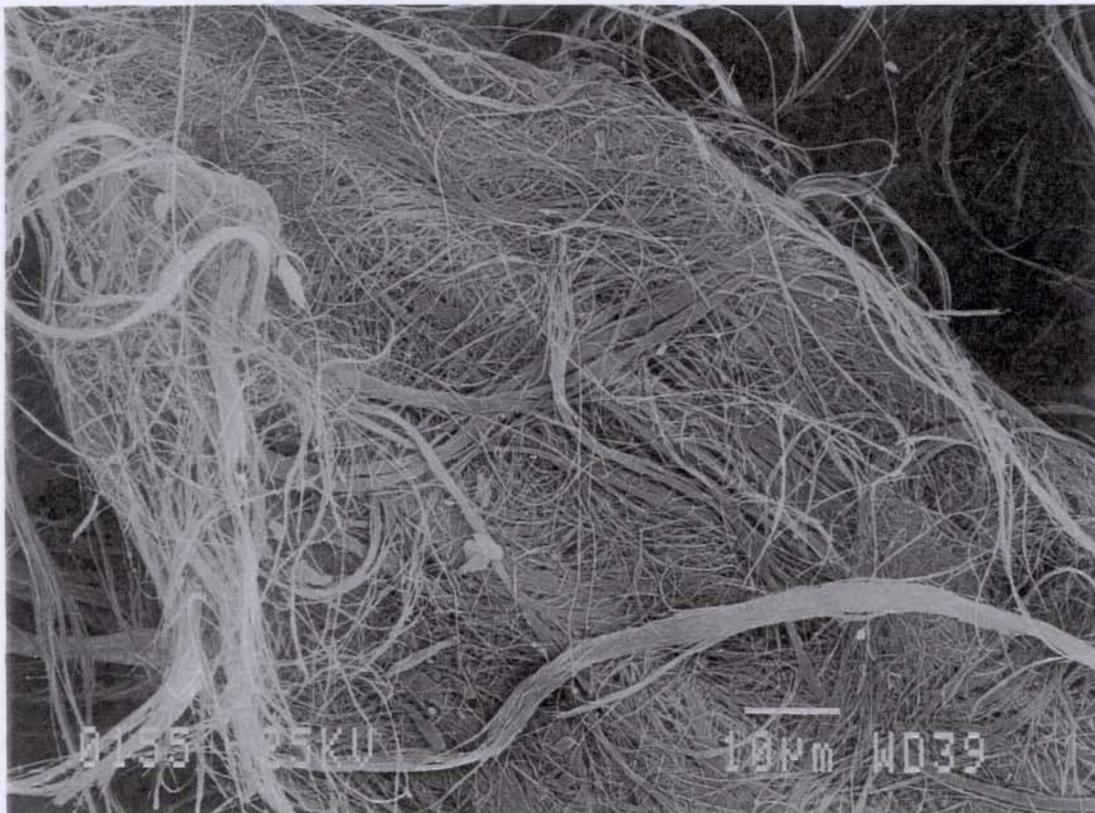
Figura 31: Micrografias eletrônicas de varredura da crisotila: a) tratada no reator CO_2 /água/1h; b) tratada no reator CO_2 /água/5h.



Figura 31 c): Micrografia eletrônica de varredura da crisotila tratada no reator ar/tampão/1h.



(a)



(b)

Figura 32: Micrografias eletrônicas de varredura da crisotila: a) tratada no reator CO₂/água/1h; b) tratada no reator CO₂/água/5h.

4.3.2 – Microscopia Eletrônica de Varredura de células de *Saccharomyces cerevisiae* em crisotila tratada

Foram observadas amostras de crisotilas tratadas nos reatores argônio/água/1h, CO₂/água/5h e ar/tampão/1h, utilizadas como suporte de células de *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação de melado, na proporção de 1:10 crisotila/células.

As Figuras 33a e 33b mostram as células nas crisotilas tratadas nos reatores argônio/água/1h e CO₂/água/5h. O número de células presentes nestas crisotilas é bastante semelhante, entretanto, a crisotila tratada no reator ar/tampão/1h apresenta células em menor número (as micrografias das células na crisotila tratada no reator ar/tampão/1h não serão apresentadas.). Ao considerar o pouco tempo de contato entre as células e a crisotila, cerca de 3 dias e o método de preparação da amostra para ser observada por MEV, as células que não se encontravam aderidas à crisotila, foram retiradas, durante as etapas de lavagens nas soluções usadas para a fixação e desidratação do sistema crisotila/células. A micrografia da crisotila do reator argônio/água/1h (Figura 33a) apresenta fragmentos que não aparecem nas demais crisotilas; estes fragmentos podem estar relacionados com a maior adição de melado no meio de fermentação, para se atingir 300 g de ART/L.

A adesão das células às crisotilas tratadas nos reatores CO₂/água/5h e argônio/água/1h pode ser observada nas Figuras 34a e 34b. As células apresentam-se aderidas preferencialmente às fibrilas que estão recobrendo a superfície da célula. A Figura 34a mostra células envoltas por fibrilas de crisotila tratada no reator CO₂/água/5h. O envelhecimento não é evidente na Figura 34b, que mostra células em crisotila tratada no reator argônio/água/1h. Isto provavelmente se deve a diferença no tempo de contato entre as células e o suporte: enquanto a amostra contendo células e crisotila do CO₂/água/5h permaneceu por 48 horas em geladeira, a amostra contendo células e crisotila do argônio/água/1h permaneceu apenas 24 horas. Cassiolaⁱⁱⁱ observou que o envelhecimento depende do tempo de contato necessário para que ocorra o envelhecimento das fibrilas de crisotila sobre as células que pode ser de 1 semana a 1 mês.

Em aspectos gerais, as células de *Saccharomyces cerevisiae* acomodadas sobre as fibrilas da crisotila tratada nos reatores de fluxo de gases não apresentam diferenças dos envelhecimentos observados entre células de *Saccharomyces cerevisiae* e fibrilas da crisotila ativada por ultra-som.⁸

ⁱⁱⁱ comunicação pessoal

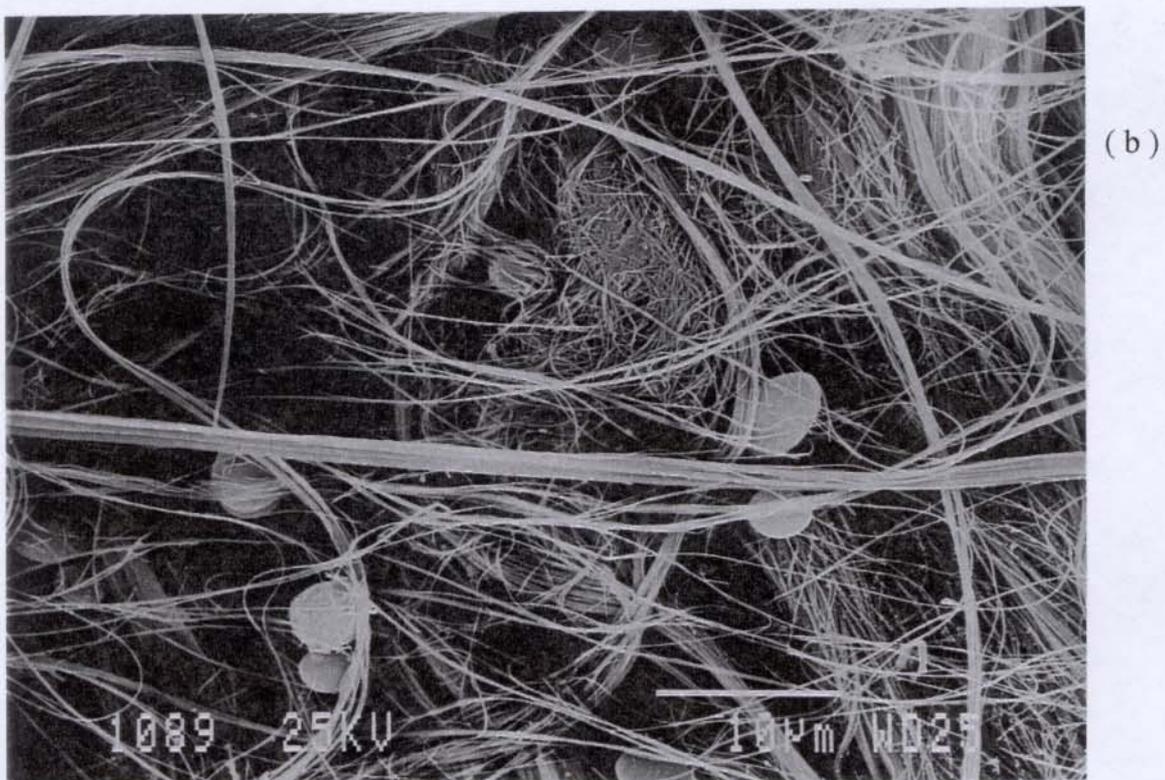
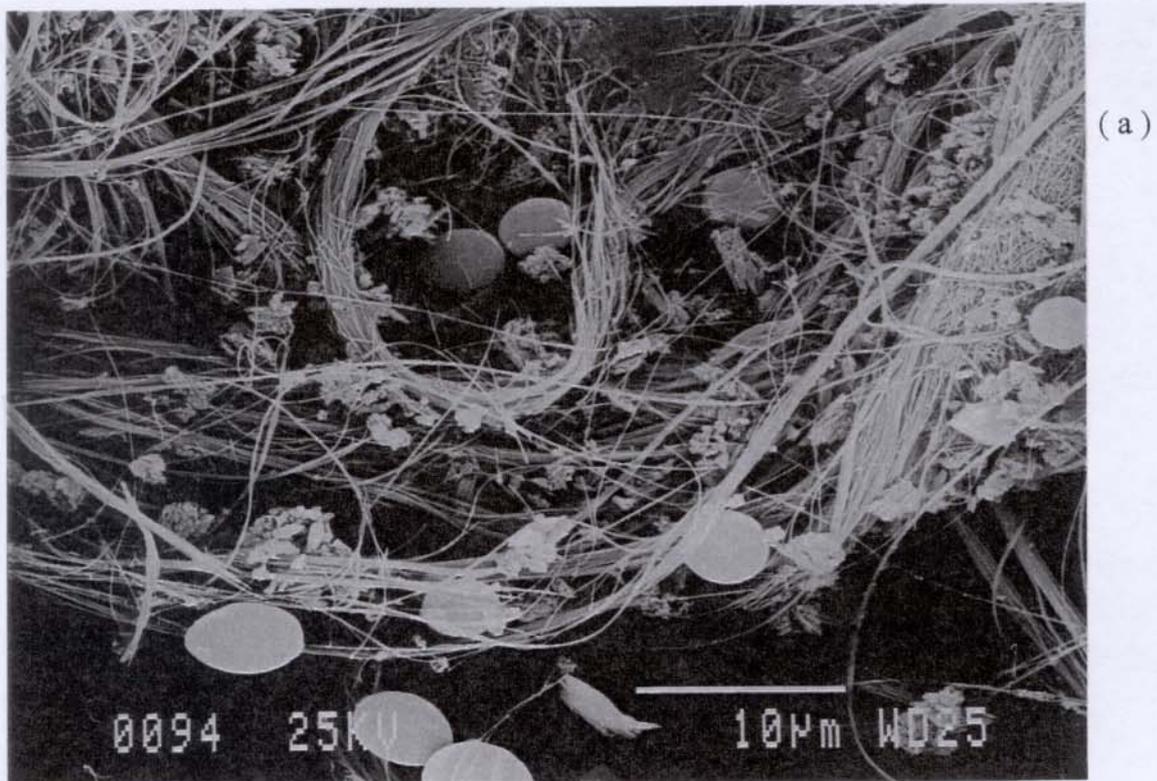
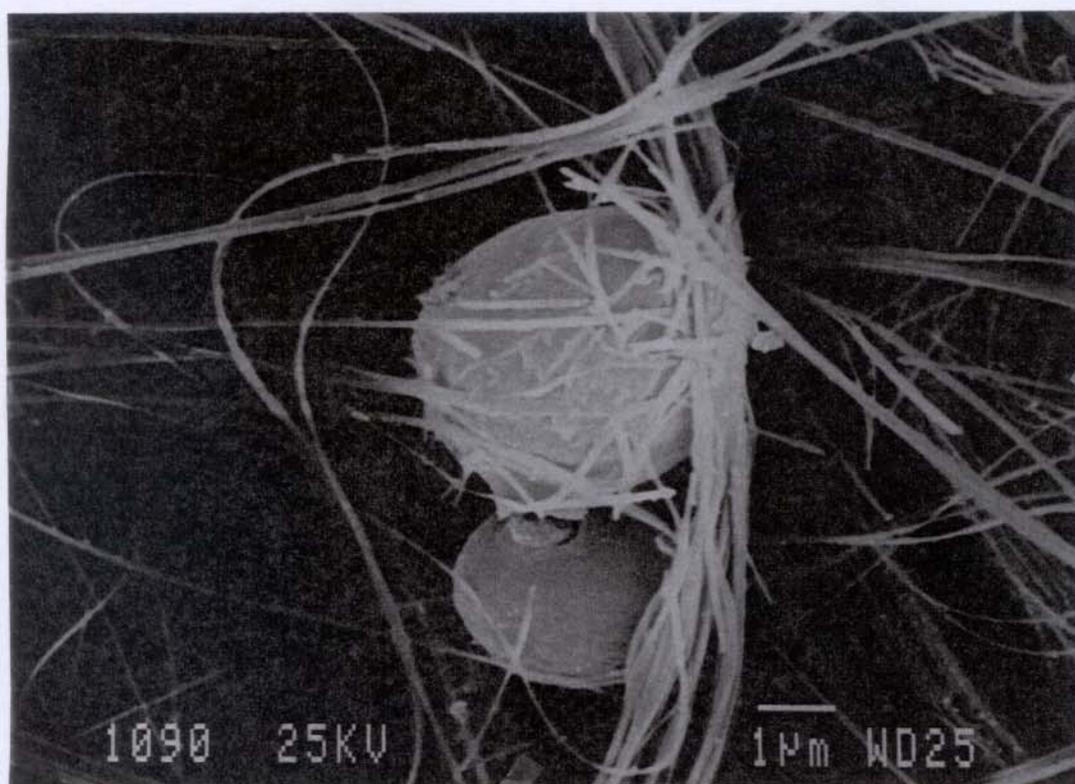
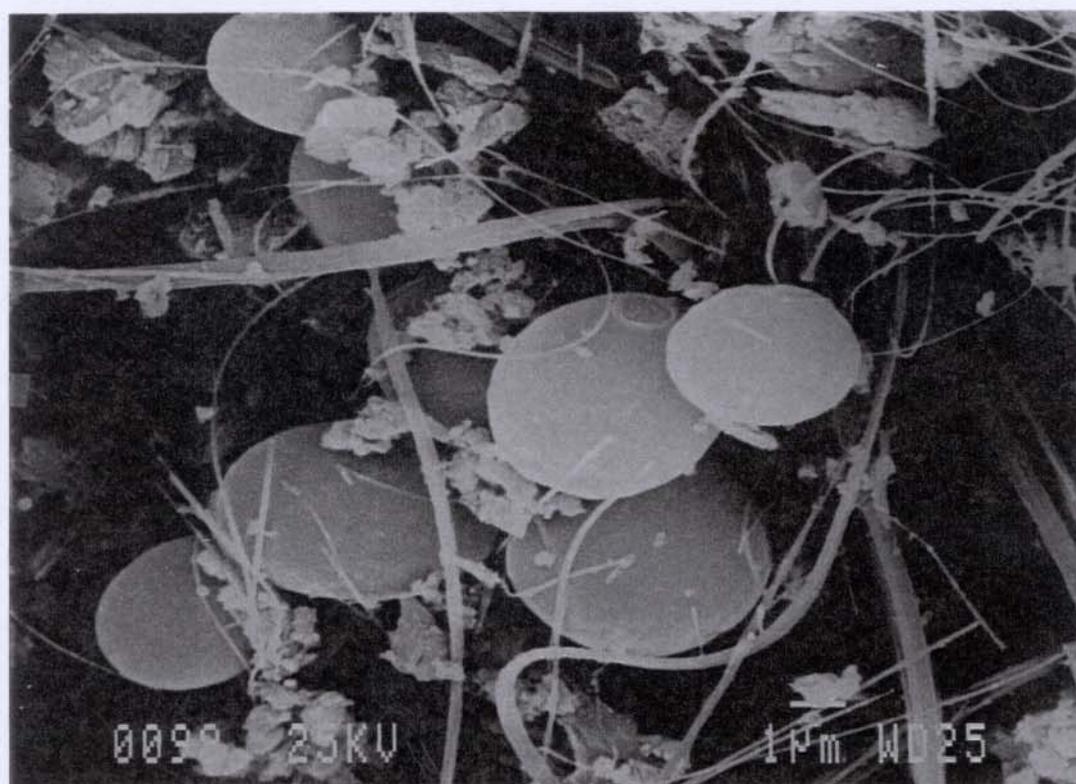


Figura 33: Micrografias eletrônicas de varredura de células da Cepa FEA 01 imobilizadas em crisotila: a) tratada no reator argônio/água/1h, após fermentação de melão a 300 g de ART/L; b) tratada no reator CO₂/água/5h, após fermentação de melão a 250 g de ART/L.



(a)



(b)

Figura 34: Micrografias eletrônicas de varredura de células da Cepa FEA 01 immobilizadas em crisotila: a) tratada no reator CO₂/água/5h, após fermentação de melaço a 250 g de ART/L; b) tratada no reator argônio/água/1h, após fermentação de melaço a 300 g de ART/L.

5 - DISCUSSÃO

5.1 – Homogeneidade da crisotila 5R

Os resultados das Tabelas X e XI mostraram que crisotila jateada tratada em reatores de fluxo de gás apresenta adesão de fermento de pão com valores de erro de 18%, em média. Para a crisotila ativada por ultra-som, a Tabela IX mostra erros entre 17 e 36%, em experimentos semelhantes. Estes erros impedem distinguir entre a crisotila ativada e a crisotila jateada quanto à capacidade de adesão de células. Ensaio preliminares, mesmo em experimentos realizados em quintuplicatas, mostraram erros que variaram entre 20 e 50%.

No jateamento da crisotila 5RL, 38% da massa inicial de crisotila passa em peneira de 250 mesh.¹⁰ Este material é constituído por pó fino, de fibra e de rocha, visto que a abertura da tela é pequena. Os resultados da Tabela VI mostram que 26% da massa de crisotila 5R jateada, em média, é composta por material empacotado: fragmentos de rocha e fibras empacotadas, que são retirados no tratamento utilizando os reatores. Os tratamentos de jateamento e fibrilação por ultra-som não retiram este material.

As fibras empacotadas e os fragmentos de rocha apresentam baixa capacidade de adesão. Fregonesi⁸ usou crisotila lixiviada, isto é, a sílica resultante, em ensaios de adesão, observando adesão de apenas 0,1 g/g (crisotila lixiviada.). Por outro lado, todas as observações feitas por microscopia eletrônica de varredura mostram que as células aderem preferencialmente às fibrilas, e praticamente nunca às fibras empacotadas.

A presença de material empacotado faz das crisotilas jateada e ativada um suporte heterogêneo de menor capacidade de adesão. Os ensaios de adesão realizados com estas crisotilas apresentavam valores muito diferentes na quantidade de material suportado, que impedia a determinação da relação célula/suporte com maior precisão. No tratamento da crisotila jateada nos reatores com fluxo de gás, foi obtido um material mais fibrilado e homogêneo, com maior capacidade de adesão (cerca de 26% da massa inicial de crisotila jateada). Os resultados dos ensaios de adesão foram reprodutíveis, estabelecendo a proporção 0,6 g/g (célula/suporte).

5.2 – Comparação da atividade da crisotila tratada nos reatores com a ativada

As Figuras 20 e 21 mostram que células suportadas em crisotila ativada e tratada no reator ar/tampão/1h aceleram a velocidade de produção de CO₂, comparada as células livres. Uma diferença de 35% na velocidade inicial de conversão de 150 g/L de glicose é mostrada na Figura 21. Em meios com 250 e 300 g/L de glicose, foram observados 16% e 27% de aumento (Figura 20). Fregonesi⁸ observou aumento de 25% na velocidade de produção de CO₂ para o sistema suportado em crisotila ativada de 300 g/L de D-glucose. Apesar de todo cuidado na reprodução do ensaio, que contou com a ajuda de Fregonesi, a velocidade de produção de CO₂ ficou abaixo das expectativas. Uma explicação para esta diferença poderia ser atribuída à presença de células não aderidas observadas nos sistemas, durante os ensaios de adesão.

A adesão de células de *Saccharomyces cerevisiae* em crisotila envolve duas etapas muito importantes: suspensão das fibras na presença das células e a recuperação do material suportado por filtração. Em meio aquoso, as fibras de crisotila entumecem e ficam mais abertas. Isto é observado, principalmente, na interface crisotila-água. Agitação mecânica aumenta a quantidade de fibras entumecidas; entretanto, por longos períodos, acaba por fiá-las. O choque entre fibras e células é feito com agitação vigorosa e pendular com bagueta de vidro. Células que permanecem em suspensão não aderem à crisotila, que decanta ao final da agitação.

Ensaio posteriores de adesão da cepa FEA 01 sobre crisotilas ativada por ultra-som e tratada no reator ar/tampão/1h, realizados após os ensaios de fermentação, mostraram que 80% da massa inicial de células estavam aderidas à crisotila: 0,1956 ± 0,0032 g de células secas (células livres); 0,1493 ± 0,0179 g de células secas aderidas em crisotila ativada e 0,1642 ± 0,0060 g de células secas aderidas em crisotila do reator ar/tampão/1h. Menor quantidade de células leva a diminuição na velocidade de produção de CO₂ se comparado a sistemas com mais células. Mesmo em menor quantidade, o sistema células/crisotila aumentou a velocidade de produção de CO₂ em relação às células livres.

A retirada do material empacotado da crisotila parece não modificar a velocidade de produção de CO₂ nos sistemas de fermentação. Isto pode indicar que a quantidade de células presentes nos sistemas de fermentação utilizando crisotila como suporte são semelhantes, durante a etapa de fermentação.

5.3 – Crisotila como aditivo na fermentação de melaço

Os resultados apresentados na Tabela XII mostram que, durante a fermentação de melaço, a velocidade global de fermentação não aumenta com a adição de pequena quantidade de crisotila em sistemas contendo células livres. Entretanto, ao observar as Figuras 26 e 27, a velocidade de produção de CO₂ aumenta em até 30% nos sistemas contendo crisotila, quando comparado ao sistema contendo células livres, nos 30 primeiros minutos de fermentação.

Dombek e Ingram³⁸ observaram que a adição de extrato de levedura, peptona, MgSO₄ e MgCl₂ ao meio de fermentação, aumentavam a capacidade fermentativa das células, enquanto que a adição de KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, CaCl₂ e Na₂SO₂ não provocava mudanças em relação ao sistema controle. O aumento da capacidade fermentativa das células com a adição das cinzas obtidas na calcinação do extrato de levedura e de peptona ao meio de fermentação, indicaram que sais inorgânicos eram os responsáveis pelo aumento da atividade das células. A adição de 0,5 mM de MgSO₄ ao meio de fermentação de glicose a 200 g/L, aumentou a velocidade de fermentação e diminuiu o tempo necessário para a conversão de glicose a etanol de 72 para 48 horas, sem perda na produção de etanol. Foi verificado que a massa de células aumentou em 53% após 18 horas de inoculação.

Birch e Walker⁵⁶ observaram o número de células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae* L-2226, cepa utilizada na produção de vinhos, após a elevação da temperatura e adição de etanol durante a fermentação. Foram utilizados meios de fermentação e de crescimentos com adição de íons magnésio, em concentrações de 2 a 20 mM. O etanol é responsável pelo aumento da permeabilidade da membrana celular, provocando a perda de íons do interior da membrana, essenciais aos processos bioquímicos, como o magnésio, que pode resultar na morte das células.⁵⁷ Ao dispor de uma quantidade maior de íons magnésio intra e extra-celular, as células manteriam a integridade estrutural da membrana na presença de quantidades de etanol anteriormente não tolerados. Ao se utilizar meio de fermentação com adição de 20 mM de MgSO₄, tanto as células crescidas em meio de crescimento contendo 20 mM de MgSO₄, como as células crescidas sem adição de MgSO₄ mantiveram 60% de células viáveis após 5 horas de fermentação (10% de etanol v/v), mantendo este índice após 24 horas. Ao utilizar meio de fermentação com adição de 2 mM de MgSO₄, menos de 40% das células permaneceram viáveis após 5 horas, sendo que nenhuma célula

viável foi encontrada após 24 horas. Estes resultados podem explicar o aumento de atividade das células observado por Dombek e Ingram.³⁸

Ao verificar se a presença de íons magnésio na superfície da crisotila estaria relacionado com o aumento da velocidade de produção de CO₂ por células de *Saccharomyces cerevisiae* suportadas em crisotila, Joekes e colaboradores⁵⁸ realizaram ensaios de fermentação de glicose para avaliar a atividade das células, substituindo a crisotila por água de crisotila (água que permaneceu em contato com crisotila) e por MgSO₄. Foram montados sistemas com células livres em meio de fermentação contendo glicose a 300 g/L, com a adição de MgSO₄ nas concentrações 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ M; meio com glicose e água de crisotila; além de sistema controle com células suportadas em crisotila e sistemas com células livres e meio com glicose. A velocidade de produção de CO₂ nos sistemas contendo água de crisotila e nos sistemas contendo MgSO₄ apresentaram valores próximos aos do sistema controle com células livres. Os sistemas contendo células suportadas em crisotila apresentaram maior velocidade de produção de CO₂, quando comparados aos demais sistemas. Desse modo, o aumento da atividade das células quando suportadas em crisotila não estaria diretamente relacionado à presença de íons magnésio na crisotila, que diverge do resultado apresentado por Dombek e Ingram.³⁸

A mesma proporção de células/suporte empregada neste presente trabalho foi utilizada por Prakasham e colaboradores⁵⁵. Os autores adicionaram 1% do que chamaram de sólidos inertes: areia de rio, serragem, farelo de trigo, TiO₂, quitina e quitosana, para a fermentação 100 mL de glucose a 150 g/L, com 10% de células de *Saccharomyces cerevisiae* NCIM 3204, em erlenmeyer de 100 mL, sem agitação. Após 60 horas, a produção de etanol foi maior nos sistemas contendo sólidos. Em presença de 1% de quitosana, a produção de etanol aumentou em 40%. Quitina, areia de rio, farelo de trigo e TiO₂ apresentaram aumento de 28%. Os autores atribuíram o aumento da produção de etanol às características físicas dos sólidos, tais como: maior quantidade de células aderidas à superfície do sólido e a flotação do sólido durante a fermentação, que proporcionava maior distribuição das células e agitação do meio de fermentação (efeito observado principalmente com a utilização de quitosana). Este trabalho mostra que a adição de pequenas quantidade de material durante a fermentação aumenta a produção de etanol, sem a necessidade da maioria das células estarem imobilizadas ao suporte.

Dessa maneira, o aumento da velocidade de produção de CO₂ em sistemas contendo 10% de células e 1% de crisotila, apresentados nas Figuras 26 e 27, pode ser atribuído à presença de íons magnésio na superfície da crisotila, que poderia estar atuando como acelerador na produção de CO₂. Os íons magnésio estão envolvidos numa série de processos fisiológicos como: crescimento, divisão celular e atividades enzimáticas.⁵⁶ Os íons magnésio são imprescindíveis durante a via glicolítica (via de Embden-Meyerhof-Parnas) para o metabolismo de pelo menos nove enzimas no catabolismo anaeróbico da glicose.^{59,60} Embora Joeques e colaboradores⁵⁸ tenham comprovado que a presença de íons magnésio não aumentam a atividade das células durante a fermentação, é preciso salientar que as células de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas eram provenientes de fermento de pão. As cepas utilizadas para fermento de pão seriam menos adequadas à produção de etanol do que as células da cepa FEA 01, utilizadas nos ensaios de atividade celular neste presente trabalho. Em sistemas que apresentam grande quantidade de células livres em relação ao suporte, a imobilização das células pode não ser o fator que mais contribui para o aumento da atividade fermentativa das células.

6 - CONCLUSÕES

1 – A utilização de reatores de batelada com vazão de gás para tratamento de crisotila promove a ativação da superfície da crisotila jateada, além de separar as fibras empacotadas e os fragmentos de rochas presentes na crisotila.

2 – A média de fibras empacotas e fragmentos de rochas retirados da zona morta dos reatores foi de aproximadamente 30%. Este valor está dentro do esperado, visto que 60% de pó de rocha e de fibras presentes na crisotila 5R passam por peneira de 10 mesh e, 38% passam por peneira de 250 mesh.

3 – As crisotilas tratadas nos reatores de 2 L apresentaram, em média, valores de V_m de adsorção de azul de metileno maiores do que o valor calculado para a crisotila jateada ($2,2 \times 10^{-6}$ mol/g), indicando que a área superficial das crisotilas aumentam quando submetidas aos tratamentos nos reatores. Os maiores valores de V_m de adsorção de azul de metileno, $3,1 \times 10^{-6}$ mol/g, em média, foram apresentados pelas crisotilas tratadas nos reatores $\text{CO}_2/\text{água}/1\text{h}$ e $\text{CO}_2/\text{água}/5\text{h}$.

4 – As células de *Saccharomyces cerevisiae* suportadas sobre a crisotila tratada no reator ar/água/1h apresentaram aumento de 14% na velocidade de fermentação, se comparado aos sistemas com células livres. O mesmo aumento de 14% foi apresentado pelas células suportadas em crisotila ativada por ultrassom. A maior diferença na velocidade de fermentação foi observada durante a fermentação do meio de D-glucose a 300 g/L. Fregonesi, em sua dissertação de mestrado, observou aumento de 25% na velocidade de fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* suportada em crisotila ativada, superiores aos valores apresentados neste trabalho.

5 – As células de *Saccharomyces cerevisiae* suportadas na crisotila tratada no reator ar/tampão/1h, assim como as células suportadas na crisotila ativada por ultrassom, atingiram 100% da produção de CO_2 em torno de 19 horas após o início da fermentação, enquanto os sistemas contendo células livres levaram 24 horas, durante a fermentação de meio de D-glucose enriquecido a 150 g/L.

6 – A velocidade de produção de CO₂ pelas células de *Saccharomyces cerevisiae* aumentou em 18% com a utilização da crisotila jateada como aditivo (1% m/V), nos primeiros 30 minutos de fermentação de melão a 250g de ART/L. As crisotilas tratadas nos reatores, assim como a crisotila ativada por ultrassom, aumentaram a velocidade de produção de CO₂ em 30%, indicando que as crisotilas tratadas apresentaram-se melhores para a utilização nos processos de fermentação, se comparada a crisotila jateada e ao sistema sem adição de crisotila.

7 – Todas as crisotilas tratadas nos reatores apresentaram aumento na quantidade de fermento de pão aderido, em média, 50% acima do valor observado para crisotila jateada. Os melhores resultados foram apresentados pelas crisotilas tratadas nos reatores ar/água/5h, ar/tampão/5h e argônio/água/5h, com um aumento em torno de 75%, mesmo valor observado para a adesão de fermento de pão sobre crisotila ativada.

7 – REFERÊNCIAS

- ¹ Santos, P.S., “Tecnologia das Argilas”, Edgard Blucher Ltda, vol. 2, 1975.
- ² Eitel, W., “Silicate Science”, Academic Press, vol. 1, 1964.
- ³ Gaze, R., The Physical and Molecular Structure of Asbestos, Annals of the New York Academy of Sciences, v. 132, p. 23, 1965.
- ⁴ Speil, S.; Leineweber, J. P., Asbestos Minerals in Modern Technology, Environmental Research, v.2, p. 166, 1969.
- ⁵ Cozak, D.; DeBlois, C., Olefin Hydrogenation Catalysed by Chrysotile Asbestos Fibres and Supported Titanocene, Canadian Journal of Chemistry, v. 62, p. 392-394, 1984.
- ⁶ Parizoto, O., “Crisotilas Naturais Brasileiras: Ativação da Superfície e Aplicação na Imobilização de Biocatalisadores”. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, 1989.
- ⁷ Giongo, C.V.T., “Estudo da Deposição de TiO_2 sobre Crisotila Brasileira” Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, 1995.
- ⁸ Fregonesi, A.A., “Adesão de Células de *Saccharomyces* sp. em Materiais Inorgânicos para a Produção de Etanol”, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, 1998.
- ⁹ Martinez, E.; Zucker, G.L. “Asbestos ore Body Mineral Studies by Zeta Potential Measurements”, Journal of Physical Chemistry, 64, 924, 1960.
- ¹⁰ Comerlato, M.H., “Imobilização de Enzimas no Suporte Crisotila”, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, 1995.
- ¹¹ Moran, P.J.S.; Wendhausen Jr., R; Rodrigues, J.A.R.; Joekes, I., “Processo de Preparação de Etanol em Alto Rendimento em Regimes Contínuo e de Batelada Via Fermentação, Utilizando Células de *Saccharomyces cerevisiae* Suportadas em Minerais”, Patente BR. 9.700.635 (30/04/1997)
- ¹² Langmuir, I.; The Adsorption of Gases on Plane Surfaces of Glass, Mica and Platinum, Journal of the American Society, vol. 40, p. 1361, 1918.
- ¹³ Joekes, I.; Comerlato, M.H.; Parizotto, O.; Pedroso, P.R., Moran, P.J.S.; Rodrigues, J.A.R.; De Carvalho, M, “Processo de Preparação de Crisotilas Brasileiras de Alta Superfície Específica e Crisotila Obtida”, Patente BR. 8.903.849 (01/08/1989).
- ¹⁴ Comerlato, M.H., “Obtenção e Caracterização de Filtros de Profundidade em Crisotila Brasileiras”, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, 1989.
- ¹⁵ Fachini, A., “Crisotila na Degradação de Dodecilbenzenosulfonato de Sódio”. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, 1999.
- ¹⁶ Parizotto, O., “Crisotilas Brasileiras: Caracterização dos Sítios Superficiais por Cromatografia Inversa, Microscopia de Força Atômica e Espectroscopia no infravermelho”, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, 1995.
- ¹⁷ Canizares, E.M.P.N., “Estudo de Adsorção de Espécies Quirais em Crisotila Brasileira”, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, 1993.

- ¹⁸ Zuchetti, R.A.M., "Crisotila Brasileira Como Suporte de Catalisadores. Aplicação na Oxidação de Álcoois com Radiação de Microondas", Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, 1994.
- ¹⁹ Ram, K., "Surface Modification Engineering", vol. I – Fundamental Aspects, CRC Press, 1989.
- ²⁰ Semsarzadeh, M.A., Fiber Matrix Interactions in Jute Reinforced Polyester Resin, Polymer Composites, vol. 7 (1), p. 23-25, 1986.
- ²¹ Zeronian S.H.; Kawabata, H.; Alger, K.W., Factors Affecting the Tensile Properties of Nonmercerized and Mercerized Cotton Fibers, Textile Research Journal, vol. 60 (3), p. 179-183, 1990.
- ²² Ray, P.K.; Chakravarty, A.C.; Bandyopadhyay, S.B., Fine-Structure and Mechanical-Properties of Jute Differently Dried After Retting, Journal of Applied Polymer Science, vol. 20 (7), p. 1765-1767, 1976.
- ²³ Tanaka, A.; Nakajima, H., "Advances in Biotechnology Engineering / Biotechnology", Editor: Fiechter, A.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, vol. 42, p. 99, 1990.
- ²⁴ Bledzi, A.K.; Reinmane, S.; Gassan, J., Properties and Modification Methods for Vegetable Fibers for Natural Fiber Composites, Journal of Applied Polymer Science, vol. 59, p. 1329-1336, 1996.
- ²⁵ Sun, B.; Skyllaskacos, M., Chemical Modification of Grafite Electrode Materials for Vanadium Redox Flow Battery Application. 2. Acid Treatments, Electrochimica Acta, vol. 37 (13), p. 2459-2465, 1992.
- ²⁶ Gonzalezpradas, E.; Villafrancasanchez, E.; Villafrancasanchez, M.; Delreybueno, F.; Valverdegarcia, A.; GarciaRodriguez, A., Evolution of Surface-Properties in a Betonite as a Function of Acid and Heat-Treatments, Journal of Chemical Tecnology and Biotechnology, vol. 52 (2), p. 211-218, 1991.
- ²⁷ Vansant, E.F.; Van Der Voortand,P.; Vrancker, K.C., "Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface", vol. 93, cap. 8-14, Elsevier, 1995.
- ²⁸ Rodrigues, R.A.F., "Avaliação de Técnicas Analíticas no Monitoramento do Rendimento da Fermentação Alcoólica", Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, 1998.
- ²⁹ Wheals, A.E.; Basso, L.C.; Alves, D.M.; Amorim, H.V., Fuel Ethanol After 25 Years, Trends in Biotechnology, vol. 17(12), p.482-487, 1999.
- ³⁰ Laluce, C., Current Aspects of Fuel Ethanol Production in Brazil, Critical Reviews in Biotechnology, vol. 11(2); p.149-161, 1991.
- ³¹ Jones, R.P.; Pamment, N.; Greenfiel, P.F., Alcohol Fermentation by Yeast – The Effect of Environmental and Other Variables, Process Biochemistry, April/May, p. 42-49, 1981.
- ³² Kolot, F.B., New Trends in Yeast Technology-Immobilized Cells, Process Biochemistry, Oct/Nov, p. 2-8, 1980.
- ³³ Taillandier, P.; Gilis, F.; Portugal, F.R.; Laforce, P.; Strehaiano, P., Influence of Medium Composition, pH and Temperature on the Growth and Viability of *Lactobacillus acidophilus*, Biotechnology Letters, vol. 18(7), p. 775-780, 1996.

- ³⁴ Xu, P.; Thomas, A.; Gilson, C.D., Combined Use of Three Methods for High Concentration Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*, Biotechnology Letters, vol. 18(12), p. 1439-1440.
- ³⁵ Casey, G.P.; Engledew, W.M., Ethanol Tolerance in Yeast, CRC Critical Reviews in Microbiology, vol. 13, p. 219-290, 1986.
- ³⁶ Stewart, G.G.; D'Amore, T.; Panchal, C.J.; Russel, I., Factors that Influence the Ethanol Tolerance of Brewer's Yeast Strains During High Gravity Wort Fermentations, MBAA Technical Quarterly, vol. 25, p. 47-53, 1988.
- ³⁷ Jones, R.P., Effect of the Relative Concentration of Ion Species on Yeast Growth and Ethanol Production, Process Biochemistry, December, p.183-187, 1986.
- ³⁸ Dombek, K.M., Ingram, L.O., Magnesium Limitation and Its Apparent Toxicity of Ethanol during Yeast Fermentation, Applied and Environmental Microbiology, November, p. 975-981, 1986.
- ³⁹ Ciesarova, Z.; Smmogrovicova, D.; Domeny, Z., Enhancement of Yeast Ethanol Tolerance by Calcium and Magnesium, Folia Microbiologica, vol. 41(6), p. 485-488, 1996.
- ⁴⁰ Rees, E.M.R.; Stewart, G.G., The Effects of Increased Magnesium and Calcium Concentrations on Yeast Fermentation Performance in High Gravity Worts, Journal of Institute of Brewing, vol. 103, p. 287-291, 1997.
- ⁴¹ Beeler, T.; Bruce, K., Dunn, T.; Regulation of Cellular Mg^{2+} by *Saccharomyces cerevisiae*, Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1323, p. 310-318, 1997.
- ⁴² Walker, G.M.; Maynard, A.; Accumulation of Magnesium Ions During Fermentative Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, vol. 18, p. 1-3, 1997.
- ⁴³ Chibata, I.; Tosa, T.; Fujimura, M., Immobilized Living Microbial Cells in Annual Reports on Fermentation Process, cap. 1, vol. 6, 1985.
- ⁴⁴ Tyagi, R.D.; Ghose, T.K., Studies on Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* I – Analysis of Continuous Rapid Fermentation in Immobilized Cell Reactor, Biotechnology and Bioengineering, XXIV, p. 781-795, 1982.
- ⁴⁵ Holcberg, I.B.; Margalith, P., Alcoholic Fermentation by Immobilized Yeast at High Sugar Concentrations, European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 13, p. 133-140, 1981.
- ⁴⁶ Norton, S.; D'Amore, T., Physiological Effects of Yeast Cell Immobilization: Applications for Brewing, Enzyme and Microbial Technology, vol.16, p. 365-375, 1994.
- ⁴⁷ Hultin, H., Current and Potential Uses of Immobilized Enzymes, Food Technology, October, p. 62-82, 1983.
- ⁴⁸ Faber, K. "Biotransformations in Organic Chemistry: a Textbook", Ed. Springer, 3rd ed., p. 345, 1997.
- ⁴⁹ Chaudhary, A.B.; Chincholkar, S.B., Cell Immobilization: A Critical Approach to Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, Indian Journal of Microbiology, vol.36, p. 75-83, 1996.
- ⁵⁰ Dias, J.M.C.S., "Aplicação do Método Dinâmico de Medida da Velocidade Específica Máxima de Crescimento Celular à fermentação Alcoólica Contínua de Mosto de Melaço", Dissertação de Mestrado, Escola Politécnica, USP, 1982.

- ⁵¹ Kana, K.; Kanellaki, M.; Papadimitriou, A.; Psarianos, C.; Koutinas, A., Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* on γ -Alumina Pellets and Its Ethanol Production in Glucose and Raisin Extract Fermentation, Journal of Fermentation and Bioengineering, vol. 68(3), p. 213-215, 1988.
- ⁵² Wisema, A., "Handbook of Enzyme Biotechnology", Ed. England, Ellis Horwood, 2nd, 1987.
- ⁵³ Tsoutsas, T.; Kamellaki, M.; Psarianos, C.; Kalliafas, A.; Koutinas, A., Kissiris: A Mineral Support for the Promotion of Ethanol Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Fermentation and Bioengineering, vol. 69(2), p. 93-97, 1990.
- ⁵⁴ Willians, D.; Munnecke, M.; The Production of Ethanol by Immobilized Yeast Cells, Biotechnology and Bioengineering, XXIII, p. 1813-1825, 1981.
- ⁵⁵ Prakasham, R.S.; Kuriakose, B.; Ramakrishna, S.V., "The Influence of Inert Solids on Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*", Applied Biochemistry and Biotechnology, vol. 82, p. 127-134, 1999.
- ⁵⁶ Birch, R.M.; Walker, G.M., "Influence of Magnesium Ions on Heat Shock and Ethanol Stress Responses of *Saccharomyces cerevisiae*", Enzyme and Microbial Technology, 26, p. 678-687, 2000.
- ⁵⁷ Petrov, V.V., Okorokov, L.A., "Increase of the Anion and Proton Permeability of *Saccharomyces carlsbergensis* plasmalemma by n-Alcohols as a Possible Cause of Its Deenergization", Yeast, 6, p.311-318, 1990.
- ⁵⁸ Joekes, I.; Moran, P.J.S.; Rodrigues, A.R.; Wendhausen, R.; Tonella, E.; Cassiola, F., "Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized onto Chrysotile for Ethanol Production", Journal Chemical Technology and Biotechnology, 73, p. 54-58, 1998.
- ⁵⁹ Volpe, P.L.O., "Estudo da Fermentação Alcoólica de Soluções Diluídas de Diferentes Açúcares Utilizando Microcalorimetria", Química Nova, 20(5), p. 528-534, 1997.
- ⁶⁰ Voet, D.; Voet, J.G., "Biochemistry", cap. 16, John Wiley & Sons, Inc.; 2^a ed., 1995.

8 - ANEXO

8.1 – Fermentação de melão por células de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando crisotila como acelerador nas proporções 1:10 e 1:5 crisotila/células

Este ensaio foi realizado para avaliar a velocidade de produção de CO_2 por células livres de *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando as crisotilas retiradas das zonas fluidizadas dos reatores, durante a fermentação de melão, comparado-os aos sistemas utilizando crisotila ativada por ultra-som e jateada, e ao sistema controle, sem adição de crisotila.

A partir da inclinação das retas dos sistemas montados em presença de crisotila e nos sistemas controle, foram calculadas as velocidades iniciais de fermentação de 30 a 120 minutos. Os valores calculados estão listados na tabela I-8.

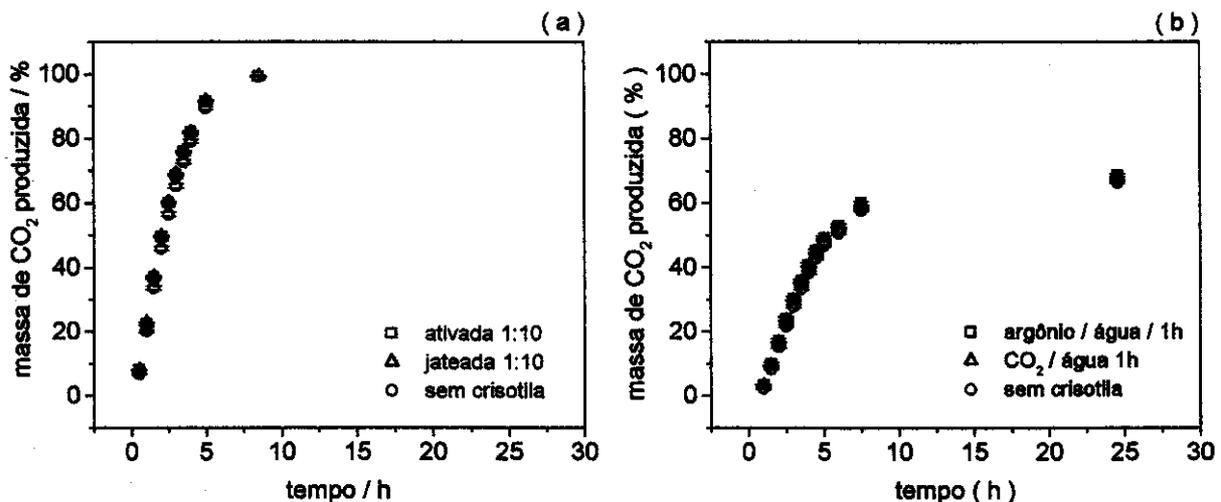


Figura 1.8.1: Massa de CO_2 produzida por massa de CO_2 teórica em porcentagem durante a fermentação de melão diluído em presença de crisotila, com 10% ($\text{m}/\text{V}_{\text{final}}$) de células de *Saccharomyces cerevisiae* (base úmida). Agitação de 200 rpm, $T = 32^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 4,5$, meio não estéril. (a) 15 mL de melão a 200g de ART/L e 1:10 de crisotila ativada e de crisotila jateada (triplicatas). (b) 15 mL de melão a 300g de ART/L e 1:10 de crisotila tratada em água com fluxo de argônio e de CO_2 durante 1 hora (duplicatas).

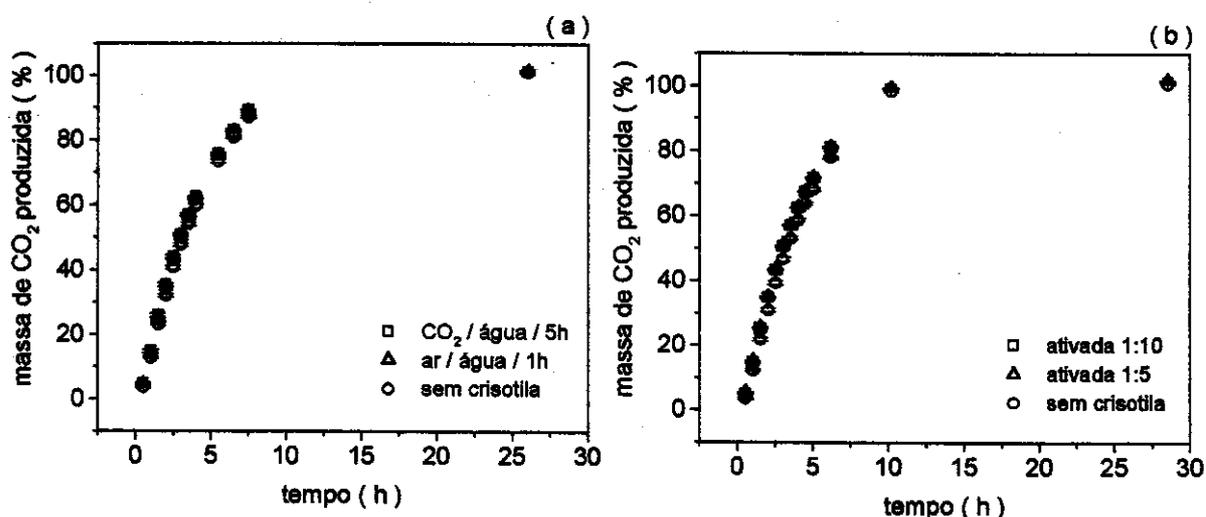


Figura 1.8.2: Massa de CO₂ produzida por massa de CO₂ teórica em porcentagem durante a fermentação de 15 mL de melão (250g de ART/L) em presença de crisotila, com 10 % (m/V_{final}) de células de *Saccharomyces cerevisiae* (base úmida). Agitação de 200 rpm, T = 32 °C, meio não estéril, pH = 4,5. Ensaios realizados em triplicatas. (a) 1:10 de crisotila tratada em água, com fluxo de CO₂ e ar durante 5 e 1 hora; (b) 1:10 e 1:5 de crisotila ativada.

Tabela I-8: Velocidades iniciais de fermentação, de 30 a 120 minutos, para os sistemas contendo crisotila e sistemas controle.

crisotila tratada ^a	quantidade inicial de ART no melão (g/L)	velocidade inicial de fermentação (%/h)
ativada	200	28,0
jateada		27,8
sistema controle		26,3
ativada	250	20,0
ativada (1:5)		19,9
sistema controle		18,4
CO ₂ /água/1h	250	20,6
ar/água/1h		20,4
sistema controle		19,1
argônio/água/1h	300	26,1
CO ₂ /água/1h		26,1
sistema controle		25,6

^a proporção 1:10 crisotila/células

Apesar da adição de crisotila, as velocidades iniciais de fermentação destes sistemas apresentam valores próximos dos sistemas controles. Estes resultados diferem do apresentado por Fregonesi:⁸ aumento da atividade metabólica e do consumo final de glicose, em meio estéril, quando se utiliza células imobilizadas sobre crisotila. É preciso ressaltar que o sistema montado neste trabalho, apresenta grande quantidade de células livres e utiliza meio não esterilizado de melação no processo de fermentação. Nos sistemas contendo 250g de ART/L inicial, as velocidades iniciais de fermentação nos sistemas com adição de crisotila tratada em água por fluxo de ar e CO₂ apresentam valores semelhantes aos sistemas com adição de 1:10 e 1:5 de crisotila ativada. No sistema contendo 300g de ART/L, foi observada que a quantidade máxima de ART consumido está em torno de 65% ao final de 25 horas. Nos sistemas contendo 250g de ART/L, a conversão de ART é de quase 100%, após 10 horas do início da fermentação.

Entretanto, ao analisar os valores de massa de CO₂ produzida, foram observados aumentos de até 55% na velocidade de produção de CO₂ nos primeiros 30 minutos de fermentação em todos os sistemas contendo crisotila. A quantidade de massa de CO₂ produzida varia de acordo com a quantidade de ART presente no meio e com a quantidade e o tipo de crisotila utilizada no sistema.

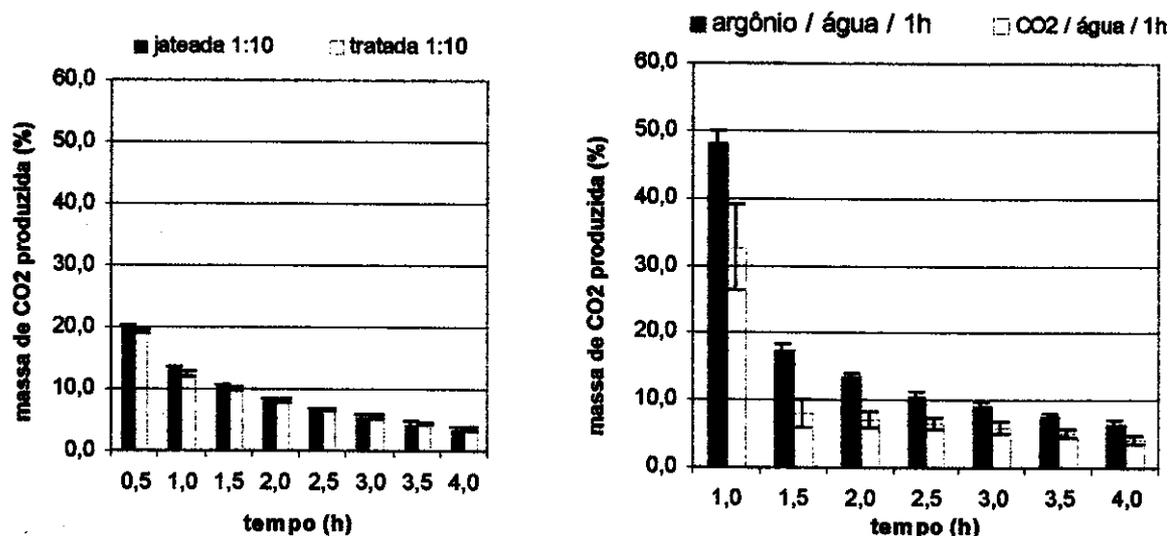


Figura 1.8.3: Massa de CO₂ relativa produzida em relação ao sistema controle, durante a fermentação de 15 mL de melação em presença de crisotila. (a) 200g de ART/L, 1:10 de crisotilas jateada e ativada (triplicatas); (b) 300g de ART/L, 1:10 de crisotilas tratadas em água destilada com fluxo de argônio e CO₂ por 1 hora (duplicatas).

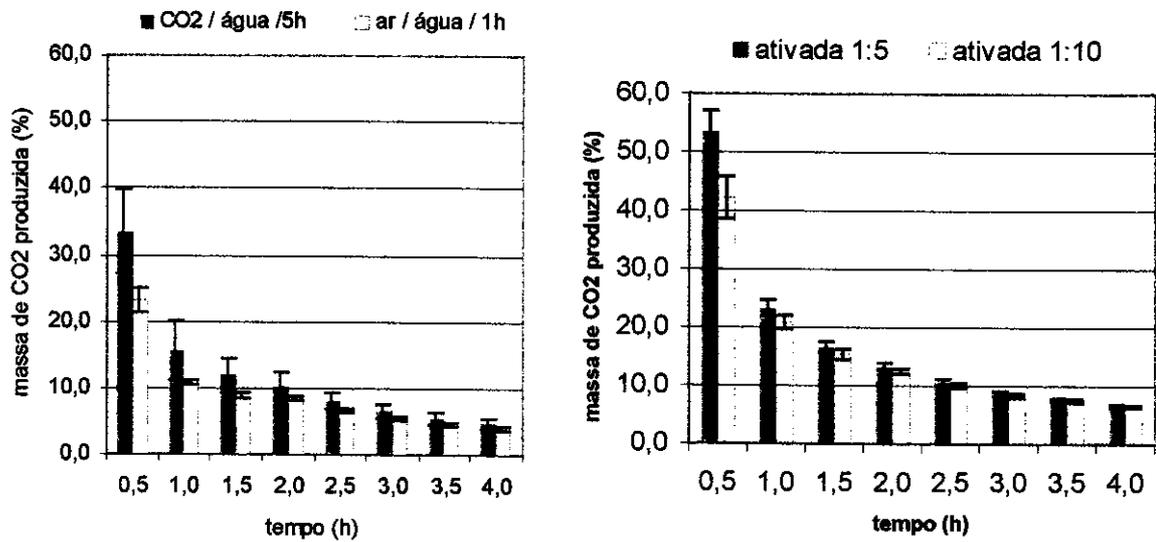


Figura 1.8.4: Massa de CO₂ relativa produzida em relação ao sistema controle durante a fermentação de 15 mL de melaço (250g de ART/L) em presença de crisotila. (a) 1:10 de crisotilas tratadas em água destilada com fluxo CO₂ e ar por 5 e 1 hora. (b) 1:5 e 1:10 de crisotila ativada. Ensaio realizado em triplicatas.