



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE
Saccharomyces cerevisiae **EM GEL DE ALGINATO DE CÁLCIO**
NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

MESTRANDO: Eng. Químico Márcio de Andrade Batista

ORIENTADOR: Prof. PhD. Luís Cláudio Oliveira Lopes

Co-Orientador: Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro

UBERLÂNDIA – MG
AGOSTO – 2005



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química



**ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE *Saccharomyces cerevisiae*
EM GEL DE ALGINATO DE CÁLCIO NO PROCESSO DE
FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA**

Márcio de Andrade Batista

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, Área de concentração em Desenvolvimento de Processos Químicos.

Uberlândia
2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

B333e Batista, Márcio de Andrade, 1974-

Estudo da imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em gel de alginato de cálcio no processo de fermentação alcoólica / Márcio de Andrade Batista. - Uberlândia, 2005.

114f. : il.

Orientador: Luís Cláudio Oliveira Lopes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui bibliografia.

1. Álcool - Teses. 2. Fermentação - Teses. I. Lopes, Luís Cláudio Oliveira. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

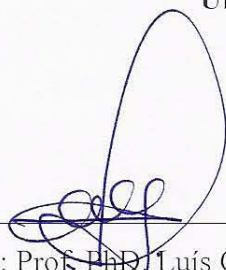
CDU: 662.754

ESTUDO DA IMOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE *Saccharomyces cerevisiae*
EM GEL DE ALGINATO DE CÁLCIO NO PROCESSO DE
FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

Dissertação de Mestrado submetida ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Banca Examinadora

Uberlândia, 31 de Agosto de 2005.



ORIENTADOR: Prof. PhD. Luís Cláudio Oliveira Lopes - PPG/FEQUI-UFU



Co-Orientador: Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro - PPG/FEQUI-UFU



Prof. Dr^a. Valéria Viana Murata - PPG/FEQUI-UFU



Prof. Dr. Sílvio Silvério da Silva - PPG/DEBIQ - Faenquil

AGRADECIMENTOS

A realização de uma dissertação de mestrado constitui-se uma tarefa de tal magnitude, que se torna impossível realizá-la sem a ajuda de outras pessoas e gostaria de certificar que as mesmas soubessem de meu apreço.

Agradeço ao Deus Jeová, que em sua onisciência, onipotência e onipresença tem guiado meus caminhos;

Aos meus irmãos **Mauri Andrade, Maurílio Andrade e Maércio Andrade** pela ajuda econômica nos “duros” anos de graduação e que sem eles, esse mestrado não seria possível;

A minha irmã **Márcia Andrade** pelo apoio constante e por acreditar em meu trabalho;

Ao hialotecnista Gentil pela confecção das “células” usadas nos ensaios experimentais;

Ao Prof. Dr. Luís Cláudio, que com paciência mostrou como as equações diferenciais podem ser “poderosas” na solução de problemas de Engenharia;

Ao Prof. Dr. Eloízio, Prof. Dr. Damasceno, Prof. Dr. Marcos Barroso, Prof. Dr. Adilson, Prof. Dr. Moilton e Prof. Dr. Sílvio Silvério da Silva. Professores que não só compreendem a ciência, mas também são capazes de explicá-la;

A técnica química Roberta, pela vidraria utilizada;

Ao Doutorando Cláudio “Mezenga” pelo treinamento no software Global Lab[®].

À empresa Torre - Materiais para panificação, pela doação do fermento utilizado nos ensaios fermentativos;

À Capes, pelo apoio financeiro;

A todos aqueles que embora não citados, contribuíram de maneira direta ou indireta nesse trabalho.

Recebam meus melhores agradecimentos.

“Se ensinarmos a todo mundo, inclusive a estudantes de segundo grau, os hábitos do pensamento cético, eles provavelmente não vão restringir o seu ceticismo aos UFOS, aos comerciais de aspirina e as mentes canalizadas de 35 mil anos de idade. Talvez comecem a fazer perguntas incômodas sobre as instituições econômicas, sociais, políticas ou religiosas. Talvez desafiem as opiniões de quem está no poder. Então o que aconteceria conosco?”

Carl Sagan

“Não devemos acreditar nos muitos que dizem que só as pessoas livres devem ser educadas, deveríamos antes acreditar nos filósofos que dizem que apenas as pessoas educadas são livres.”

Epicteto, Filósofo e ex-escravo romano.

“Sucesso: 1% inspiração e 99% transpiração.”

Thomas Edison (1847-1931)

“Ubi dubium ibi libertas”

Provérbio latino

CONTEÚDO	
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE SIMBOLOS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
CAPÍTULO 01 - INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS.....	1
1.1- O etanol e seu potencial de utilização.....	1
1.2- Bioprocessos conduzidos em células imobilizadas.....	4
1.3- Objetivos.....	7
1.4- Estrutura da dissertação.....	7
CAPÍTULO 02 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1- Introdução.....	9
2.1.1- Microorganismo: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
2.1.2 - Cinética de fermentação.....	12
2.2 - Meios de cultura.....	14
2.2.1- Aspectos de assepsia e desinfecção.....	15
2.3 - Rendimentos em processos fermentativos.....	16
2.4 - Fluxograma simplificado do processo de produção de etanol.....	17
2.5 - Descrição ilustrativa do processo industrial de produção de etanol.....	18
2.6 - Imobilização celular.....	18
2.7 - Coeficiente de partição.....	21
2.8 - Projeto de experimentos.....	24
2.8.1- Aplicação da função <i>desirability</i> em bioprocessos.....	26
2.9- Modelagem e simulação.....	29
CAPÍTULO 03 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1- Microrganismo e preparo do inóculo.....	32
3.2- Técnicas utilizadas nos ensaios.....	33
3.2.1- Métodos analíticos.....	33
3.2.2- Procedimentos experimentais.....	34
3.3- Planejamento de experimentos.....	37
3.3.1- Planejamento varredura.....	37
3.3.2- Planejamento tipo fatorial composto central.....	39
3.3.3- Investigação da função <i>desirability</i> em bioprocessos.....	40
CAPÍTULO 04 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1-Avaliação dos diferentes tipos de fermento biológico.....	42
4.2-Avaliação das distribuições dos diâmetros dos <i>pellets</i> obtidos.....	42
4.3-Avaliação do planejamento fatorial completo dois níveis do tipo 2^3	44
4.4-Planejamento do tipo 2^4	48
4.5-Planejamento composto central do tipo 3^{4-1}	54
4.6-Aspectos introdutórios para a modelagem do Fermentador.....	65
CAPÍTULO 05-CONCLUSÕES.....	75

CAPÍTULO 06-SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
APÊNDICES.....	84
Apêndice A - Curvas de Calibração.....	85
Apêndice B - Resultados dos Ensaios de Fermentação Realizados.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 01- Representação da síntese bioquímica do microrganismo <i>Escherichia coli</i> para a conversão de glicose a etanol.....	4
Figura 02- Fluxograma simplificado para a produção de etanol com levedura imobilizada.....	6
Figura 03- Representação esquemática das estruturas típicas da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
Figura 04- Microfotografia com as diversas fases de crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
Figura 05- Representação das diversas fases de crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
Figura 06- Etapas de redução da glicose a etanol.....	14
Figura 07- Fermentação contaminada com cultura de <i>Lactobacilos</i> e formação de espuma.....	16
Figura 08- Fluxograma simplificado do processo de produção de etanol.....	17
Figura 09- Métodos de imobilização celular.....	20
Figura 10- Características e tipos de suporte, utilizados nas diversas técnicas de imobilização.....	21
Figura 11- Métodos básicos de imobilização.....	21
Figura 12- Representação esquemática do pellet com a entrada do substrato e saída do produto.....	23
Figura 13- Reator utilizado nos ensaios fermentativos.....	35
Figura 14- Equipamento utilizado na imobilização e confecção dos <i>pellets</i>	36
Figura 15- Amostra representativa dos <i>pellets</i> de alginato de cálcio obtidos e o padrão de medida (diâmetro externo de 15mm) usado no <i>software</i> Global Lab®.....	37
Figura 16- “Ponteiras” usadas para obtenção dos <i>pellets</i> de diferentes diâmetros e padrão de medida (diâmetro externo de 15mm).....	37
Figura 17- Processamento de imagens dos <i>pellets</i> : (a) imagem processada; (b) determinação dos diâmetros de cada partícula; (c) avaliação do número de partículas para determinação do raio médio do conjunto de partículas.....	37
Figura 18- Diagrama de dispersão dos pontos do planejamento gerado.....	38

Figura 19- Perfis de concentração de etanol, glicose e células livres para o fermento tipo A.....	43
Figura 20- Perfis de concentração de etanol, glicose e células livres para o fermento tipo B	43
Figura 21- Representação dos efeitos para o planejamento 2^3	46
Figura 22- Gráfico das médias marginais obtidas no planejamento 2^3	46
Figura 23- Diagrama de Pareto das variáveis mais significativas, com nível de confiança de 95%	47
Figura 24- Superfícies de resposta de obtidas no planejamento de varredura.....	48
Figura 25- Análise de Pareto para a fração 2^4 do planejamento composto central com limite de confiança de 90%.....	50
Figura 26- Perfis para valores preditos e <i>desirability</i> para o planejamento 2^4	51
Figura 27- Distribuição dos resíduos em função dos valores normais para o planejamento 2^4	52
Figura 28- Distribuição dos resíduos em função valor predito para o planejamento 2^4	53
Figura 29- Médias marginais para o planejamento 2^4 com nível de confiança de 90%.....	53
Figura 30- Resíduos para o planejamento 3^{4-1} com nível de significância de 90%.....	54
Figura 31- Distribuição do valor predito versus valor observado para o planejamento 3^{4-1}	56
Figura 32- Análise de Pareto para o planejamento 3^{4-1} com limite de confiança de 90%. Efeitos dos fatores: Lineares(L), Quadráticos (Q).....	56
Figura 33- Perfis para valores preditos otimizados e <i>desirability</i> para o planejamento 3^{4-1} (<i>desirability</i> global igual a 1).....	57
Figura 34- Curvas de nível para <i>desirability</i> do planejamento 3^{4-1} : Valores ótimos com ajuste <i>spline</i>	58
Figura 35- Região de máximo rendimento como função das concentrações de cloreto de cálcio e alginato de sódio no planejamento 3^{4-1}	59
Figura 36- Cinética e produtividade de fermentação do melhor ensaio obtido.....	62
Figura 37- Relação percentual entre concentração de células livres e células imobilizadas.....	63
Figura 38- Partículas de alginato de cálcio com células imobilizadas: (a) <i>Pellet</i> do tipo A; (b) <i>Pellet</i> do tipo B.....	64

Figura 39- Comportamento estacionário de uma partícula com 5 pontos de colocação internos, polinômio de Jacobi com $\alpha = 1$, $\beta = 1$, $Sh=100$, $\gamma = 0,2$ e $\phi^2=[1(+), 10(x), 100(\bullet)]$	67
Figura 40- Comportamento estacionário de uma partícula com 5 pontos de colocação internos, polinômio de Jacobi com $\alpha = 1$, $\beta = 1$. $Sh=100$, $\gamma = 0,2$, $\phi^2=100$ e $\gamma_2=[0(+), 10(x), 25(\bullet), 100(\blacklozenge)]$	68
Figura 41- Comportamento estacionário de uma partícula com inibição pelo produto de forma não competitiva utilizando 5 pontos de colocação internos, polinômios de Jacobi com $\alpha = 1$, $\beta = 1$, $\gamma = 0,2$, $Sh=100$, $\phi^2=100$ e $\gamma_3=[0(+), 10(x), 25(\bullet), 100(\blacklozenge)]$	71

LISTAS DE TABELAS

Tabela 01- Propriedades termodinâmicas da gasolina e do etanol.....	2
Tabela 02- Rendimento ótimo de fermentação de leveduras em condições anaeróbicas.....	13
Tabela 03- Composição do meio de cultura semi- sintético.....	15
Tabela 04- Produtos da fermentação alcoólica, em g/100g de glicose metabolizada, para diferentes rendimentos fermentativos em células livres.....	16
Tabela 05- Classificação dos modelos cinéticos.....	29
Tabela 06- Modelos cinéticos sem inibição.....	30
Tabela 07- Modelos cinéticos com inibição pelo substrato.....	30
Tabela 08- Modelos cinéticos com inibição pelo produto.....	31
Tabela 09- Lista de Reagentes e Materiais utilizados nos ensaios de fermentação.....	32
Tabela 10- Composição do meio de cultura sintético.....	33
Tabela 11- Fatores e níveis do planejamento fatorial tipo varredura.....	39
Tabela 12- Matriz do planejamento experimental fatorial completo 2^3 com fatores e níveis codificados.....	39
Tabela 13- Fatores e níveis do planejamento composto central.....	40
Tabela 14- Matriz do planejamento experimental fatorial composto central 3^{4-1} contendo fatores e níveis codificados.....	41
Tabela 15- Avaliação estatística entre os fermentos biológicos disponíveis no mercado.....	42
Tabela 16- Raios médios para partículas confeccionadas nas 5 faixas analisadas com o <i>software</i> de processamento de imagens.....	44
Tabela 17- Planejamento 2^3 e a resposta obtida nos ensaios.....	45
Tabela 18 -Planejamento 2^4 e a resposta obtida nos ensaios.....	50
Tabela 19- Planejamento 3^{4-1} e a resposta obtida nos ensaios.....	54
Tabela 20- Propriedades físicas e aparentes do alginato de cálcio.....	61
Tabela 21- Características aparentes das partículas investigadas.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

RSM	<i>Response Surface Methodology-</i>
AIE	<i>Agência Internacional de Energia</i>
RMI	<i>Instituto Rocky Mountain</i>
EUA	<i>Estados Unidos da América</i>
RON	<i>Research Octane Number</i>
MON	<i>Motor Octane Number</i>
Co	<i>Company</i>
SINAFERM	<i>Simpósio Nacional de Bioprocessos</i>
SHEB	<i>Simpósio Nacional de Hidrólise Enzimática de Biomassas</i>
NADH	<i>Nicotinamida Adenina Dinucleotídio</i>
TQM	<i>Total Quality Management</i>
JIT	<i>Just in Time,</i>
PCC	<i>Planejamento composto central</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
HPLC	<i>Comatografia Líquida de Alta Resolução</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

S	<i>Concentração de substrato</i>
S_0	<i>Concentração de substrato inicial</i>
P	<i>Concentração de produto</i>
X	<i>Concentração celular</i>
CO_2	<i>Dióxido de carbono</i>
Mg^{+2}	<i>Íon magnésio</i>
H_2O	<i>Água</i>
$(NH_4)_2SO_4$	<i>Sulfato de amônio</i>
KH_2PO_4	<i>Dihidrogenofosfato de potássio</i>
Na_2HPO_4	<i>Monohidrogenofosfato de sódio</i>
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	<i>Sulfato de Magnésio heptahidratado</i>
$Al(NO_3)_3$	<i>Nitrato de alumínio</i>
K_{Pi}	<i>Coeficiente de partição da espécie química i</i>
C_{iG}	<i>Concentração da espécie química i no interior da matriz</i>
C_{iF}	<i>Concentração da espécie química i no interior do fluido adjacente</i>
(r_0)	<i>Taxa de reação por unidade de volume da partícula</i>
C_s	<i>Gradiente de concentração de substrato na superfície da partícula</i>
C_{Sb}	<i>Concentração de substrato na fase bulk</i>
C_x	<i>Concentração celular</i>
C_S	<i>Concentração de substrato na superfície da partícula</i>
D_e	<i>Coeficiente de difusão efetivo</i>
K_2	<i>Parâmetro da equação de Monod</i>
K_m	<i>Parâmetro da equação de Monod</i>
$\bar{X}$	<i>Valor médio</i>
σ	<i>Desvio padrão</i>
T	<i>Valor desejado</i>
(L)	<i>Limite inferior</i>
(U)	<i>Limite superior</i>
S', t'	<i>Parâmetros que definem a variação da taxa de desejabilidade</i>
nm	<i>Nanômetro</i>
rpm	<i>Rotações por minuto</i>
α	<i>Coeficiente de rotabilidade</i>
R_s	<i>Taxa de transformação do substrato por unidade de volume na partícula</i>
r	<i>Posição radial no pellet</i>
R	<i>Raio do pellet (Superfície da partícula)</i>
k_L	<i>Constantes de inibição (Monod)</i>
D	<i>Coeficiente de difusividade</i>
ϕ^2	<i>Módulo de Thiele</i>
γ_2	<i>Parâmetro de inibição</i>
D_p	<i>Difusividade do etanol na partícula</i>
R_{ef}	<i>Taxa efetiva de crescimento celular no exterior da partícula</i>
ε	<i>Concentração inicial de células livres</i>

C_{gf}	<i>Concentração de glicose no fluido</i>
C_{cd}	<i>Concentração de células</i>
C_L	<i>Concentração celular no leito</i>
K_p, K_m, n	<i>Constantes de processo</i>
m_{ef}	<i>Concentração de etanol no interior da partícula</i>
V	<i>Volume do reator</i>
μ_{max}	<i>Velocidade específica máxima</i>
$\dot{m}_{ef}$	<i>Quantidade de etanol gerada no interior da partícula</i>
$\dot{m}_{gf}$	<i>Quantidade de glicose consumida no interior da partícula</i>
k_L	<i>Coeficientes de transferência de massa nas vizinhanças externas à partícula</i>
α'	<i>Proporcionalidade</i>

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo central o oferecimento de uma contribuição para o desenvolvimento de tecnologias alternativas na produção de etanol pela via biotecnológica. Nessa direção, apresenta-se um estudo sobre as condições para a imobilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em alginato de cálcio e abordam-se aspectos de estabilidade de *pellets* em um bioreator agitado a fim de investigar fatores importantes na operação de biorreatores com células imobilizadas.

A metodologia da superfície de resposta (RSM), usando um projeto estatístico de varredura e um planejamento composto central, aliada a função *desirability*, foram usados para avaliar a eficiência das partículas na fermentação alcoólica e otimizar as condições de imobilização. Utilizou-se um bioreator do tipo batelada com agitação mecânica e capacidade volumétrica de 2 litros com controle de temperatura para o acompanhamento da concentração celular livre e imobilizada, concentração de etanol e de glicose em intervalos de 2 horas durante todo o ensaio.

Os resultados para a faixa experimental explorada indicam que o procedimento sugerido leva a partículas suficientemente robustas no que diz respeito à imobilização. O tratamento das partículas com $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ resultou em *pellets* com satisfatória estabilidade mecânica e ótima atividade metabólica para a produção de etanol, atingindo valores de conversão de até 94% do rendimento Pasteur.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, Fermentação, Etanol, Imobilização.

ABSTRACT

This work aims to offer a contribution for the development of an economic technology for ethanol production by the biotechnological approach. In this direction, it investigates the conditions for *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilization in calcium alginate and addresses the operational stability aspects of a stirred batch bioreactor in order to deal with important factors in the immobilized cell bioreactor operation.

A Response Surface Methodology (RSM), using a statistical screening design and a central composite design, allied with a desirability function analysis, were used to evaluate the fermentation efficiency of the pellets and to optimize the cells immobilization conditions. A 2 liters stirred batch bioreactor with temperature control was used to monitor the free and immobilized cell concentrations, ethanol and glucose concentrations were sampled at each 2 hours during the duration of the fermentation process.

The results in the explored experimental range indicate that the proposed methodology leads up to a sufficiently robust immobilization procedure. The pellets treated with $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ presented a great deal of stability and metabolic activity for ethanol production, reaching conversion of up to 94% of the Pasteur yield.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Fermentation, Ethanol, Immobilization.

CAPÍTULO 01 – INTRODUÇÃO

1.1-O etanol e seu potencial de utilização

Nas últimas décadas o etanol tem ocupado um lugar de destaque e de grande importância tecnológica, firmando-se como um produto estratégico economicamente. Tem alto valor estratégico devido à proposta promissora como combustível alternativo ao petróleo, que segundo estudiosos tem um tempo de vida estimado em 50 anos. Outro aspecto a ser destacado é sua utilização como intermediário na síntese de biodiesel, durante a etapa de transesterificação. Biodiesel é um combustível biodegradável derivado de fontes renováveis como óleos vegetais (mamona, dendê, girassol e babaçu) e gorduras animais, que pela ação de um catalisador, reagem com o etanol. Tecnicamente o biodiesel substitui total ou parcialmente o diesel de petróleo em motores ciclodiesel de caminhões, tratores e automóveis e também é indicado para a geração de energia. Pode ser utilizado puro ou misturado ao diesel tradicional em diversas proporções. A mistura de 2% de biodiesel ao diesel de petróleo é chamada de B2 e assim sucessivamente, até o biodiesel puro, denominado B100.

Segundo a Agência Internacional de Energia (AIE), o mercado de biocombustíveis dominará 30% do mercado mundial em 2020. Este setor tem crescido 20% ao ano, apontando o Brasil como um dos potenciais produtores de energia alternativa ao petróleo para as próximas décadas.

O mercado de biocombustíveis representa apenas 2% do mercado global e o comércio internacional soma R\$5 bilhões/ano. Neste contexto, o Brasil exportou 2 bilhões de litros de etanol e o consumo interno foi de 15 bilhões de litros, mostrando assim que existe ainda um grande mercado a ser explorado e desenvolvido.

O programa brasileiro Proálcool, segundo o Ministério da Ciência e Tecnologia, o programa foi uma resposta à crise do petróleo na década de 80 e uma alternativa para o controle flutuante dos preços do açúcar no mercado internacional e colocou o Brasil como o maior produtor mundial de etanol por via biotecnológica em 1980 e conforme relata GOLDEMBERG *et al.*,(1994), as propriedades do etanol como combustível levaram as empresas automobilísticas, ao desenvolvimento de motores a álcool e também motores de mistura álcool/gasolina para os sistemas carburados e atualmente para todos os motores com sistema de injeção eletrônica.

Na década de 80, 90% dos motores dos carros eram a álcool e o custo de produção do barril de etanol atingiu valores de cerca de 100 dólares. Investimentos significativos estão

sendo realizados na modernização de tecnologias de produção mais eficientes, atraindo a atenção de investidores estrangeiros que importam o etanol brasileiro para diversas aplicações industriais, entre elas a sua utilização na indústria de bebidas e como aditivo à gasolina.

Segundo GOLDEMBERG (1994), o etanol é um excelente combustível automotivo, apresenta índice de octanagem superior ao da gasolina e tem uma pressão de vapor inferior, resultando em menores emissões evaporativas. Isso o torna atrativo ambientalmente, tendo em vista o protocolo de Kyoto e o compromisso firmado pelos países mais industrializados com a *United Nations Framework Climate Change Convention*, onde os mesmos se comprometem a reduzir suas emissões de CO₂ na atmosfera.

De acordo com o Instituto Rocky Mountain (RMI , 2005), o etanol é uma das únicas fontes alternativas de energia que podem competir de maneira equiparada ao petróleo, ainda que o mesmo fosse vendido a menos da metade do preço atual e segundo o mesmo instituto, a economia gerada nos EUA, na identificação de um substituto para o petróleo seria da ordem de U\$70 bilhões / ano, além de reduzir as emissões de carbono do país em 26%.

Na Tabela 1 tem-se a comparação entre as propriedades termodinâmicas do etanol e da gasolina.

Tabela 1- Propriedades termodinâmicas da gasolina e do etanol (GOLDEMBERG,1994)

Propriedades Físicas	Gasolina	Etanol
<i>Calor específico</i>	34900 kJ/kg	26700 kJ/kg
<i>Número de octano (RON/MON)*</i>	91/80	109/98
<i>Calor latente de vaporização</i>	376 a 502	903
<i>Temperatura de ignição</i>	220 °C	420 °C
<i>Razão estequiométrica - Ar / Combustível</i>	14,5	9

* RON –Research Octane Number MON-Motor Octane Number

Outra possibilidade para o uso de etanol é a sua utilização como intermediário na produção de hidrogênio para células combustíveis para automóveis e como fonte de energia elétrica para processos (SILVA , 2003). O uso do etanol como intermediário pode viabilizar a aplicação do hidrogênio como combustível (SCHMIDT, 2004) e ainda apresentar vantagens ambientais, pois o hidrogênio não emite nenhum tipo de poluição ou gases que contribuam para o efeito estufa.

Processos para a produção de etanol a partir de cana-de-açúcar são bem documentados e discutidos na literatura. Nos Estados Unidos e Europa, o etanol é obtido a partir de milho e outros amiláceos que podem servir como fonte de matéria-prima barata e renovável (LIMA ,

2002), mas do ponto de vista econômico, o produto americano custa até três vezes mais que o etanol brasileiro, embora seja beneficiado por subsídios do governo americano para se tornar competitivo.

Atualmente existem tecnologias disponíveis para a conversão de materiais lignocelulósicos em etanol, mas DORRY (2001) afirma que embora cientificamente possível, esta técnica ainda é inviável economicamente, devido a dificuldade de ruptura do complexo lignina-hemicelulose-celulose (CARVALHO, 2000).

Estudos para se obter um fungo (gênero *Trichoderma*) para a obtenção de etanol a partir da glicose resultante da degradação da celulose estão em desenvolvimento (DORRY *et al.*, 2001).

Com o desenvolvimento da biotecnologia e da genética, varias técnicas de manipulação gênica tem tentado desenvolver microrganismos que sejam capazes de fermentar uma ampla gama de açúcares. A *Escherichia coli* é capaz de fermentar uma grande gama de açúcares, mas gera produtos de pouco valor agregado, o que a princípio desestimula o seu uso, devido ao aspecto econômico (LIMA, 2002).

INGRAN *et al.* (1991), citado por LIMA (2002), afirmam que foram obtidos recombinantes de *Escherichia coli* que possuem o gene *pdc* e *adh* de *Zymomonas mobilis*, (que é um microrganismo referenciado na literatura para produção de etanol) permitindo que o metabolismo do piruvato durante a fermentação seja desviado da síntese de uma mistura de ácidos orgânicos para a produção de etanol com eficiência de conversão superior a 95% do rendimento teórico máximo.

Na Figura 1, apresenta-se a representação da síntese bioquímica da *Escherichia coli* para conversão de glicose a etanol, mostrando como a *Escherichia Coli* pode sintetizar as unidades estruturais bioquímicas para a formação das proteínas, polissacarídeos, lipídeos e ácidos nucleicos, bem como todas as estruturas celulares, quando cultivadas em meio contendo glicose, sulfato de amônio e outros sais inorgânicos, conforme citado por PELCZAR *et al.* (2004).

As leveduras foram os primeiros organismos encontrados capazes de crescer na ausência de oxigênio e segundo TAKAHASHI *et al.* (2002), a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo mais frequentemente utilizado na produção de etanol, embora não seja capaz de fermentar pentoses.

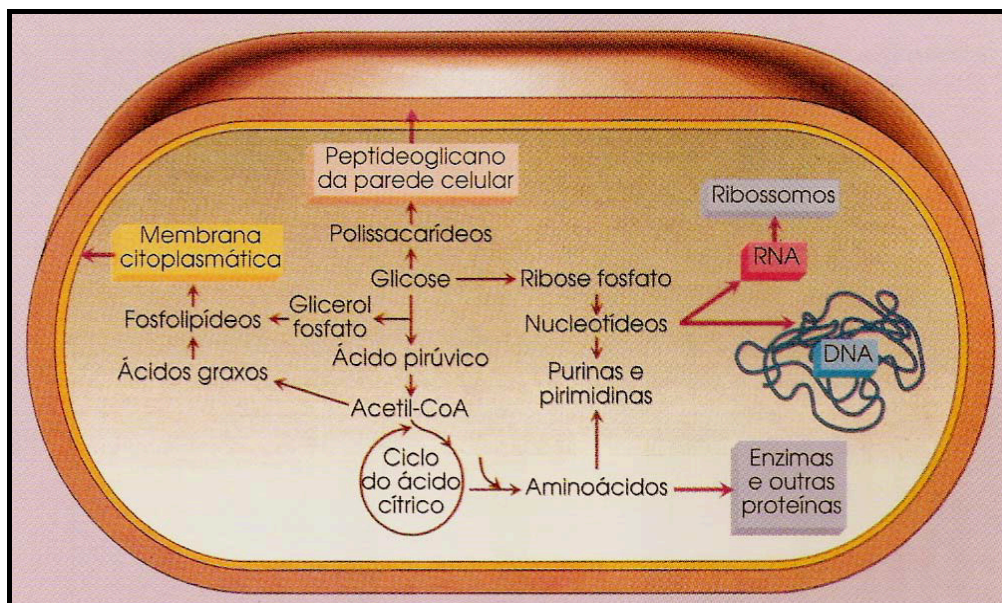


Figura 1 - Representação da síntese bioquímica do microrganismo *Escherichia coli* para a conversão de glicose a etanol (PELCZAR *et al.*, 2004).

1.2 - Bioprocessos conduzidos com células imobilizadas

Tão importante quanto à escolha do microrganismo adequado para a fermentação é a escolha do processo para a condução do bioprocesso. A literatura tem registrado inúmeros modelos de bioreatores para a produção biotecnológica de etanol e atualmente o uso de células livres é o método mais empregado.

Segundo FREEMAN e LILY (1998), citados por CARVALHO (2000), a imobilização de células viáveis apresenta grande potencial para aplicações em conversões ou sínteses que envolvam sistemas multienzimáticos complexos, nos quais a presença de passos que requerem provisão de energia ou uso de cofatores seja comum, uma vez que a regeneração desses compostos ocorre de forma natural.

Um inconveniente dos processos tradicionais é a necessidade de se inocular um número elevado de células, assim a imobilização pode-se mostrar uma alternativa eficiente para esse problema. CASSIOLA (2001), afirma que *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em crisotila (resíduo da indústria de cerâmica) mostrou ser um excelente biocatalisador no processo de produção de etanol, aumentando o rendimento do processo em cerca de 26 % em relação ao sistema com células livres. BRODELIUS e VANDAMME (1987), citados por CARVALHO (2000), destacam que a condução de bioprocessos com o emprego de células imobilizadas tem vantagens em relação aos processos fermentativos tradicionais, como a utilização de altas densidades celulares por unidade de volume do reator, e como destacam

CASSIOLA (2001) e VASCONCELOS (1998) resulta em maior produtividade e rendimento fermentativo.

A bibliografia especializada tem citado o uso de reatores para a produção de etanol e os mais diversos rendimentos foram obtidos usando-se diferentes suportes como, por exemplo, a crisotila, géis (como o alginato de cálcio) e o próprio bagaço de cana.

VASCONCELOS (1998) propôs o uso de reatores batelada simples e reator contínuo para a fermentação alcoólica com leveduras imobilizadas em colmos de cana-de-açúcar e obteve eficiência fermentativa de 86,40% no processo contínuo e FREGONESI (1998) destaca que a utilização de sistemas contínuos, empregando-se reatores tubulares, pode reduzir seu custo de produção, com um rendimento superior em relação ao sistema de células livres.

RIGO (2001) conduziu fermentações alcoólicas em sistema batelada com células imobilizadas em crisotila e teve aumento de até 27% na velocidade inicial de conversão de açúcares a etanol e nas fermentações contínuas, com a presença de crisotila em seu leito, ocorreu aumento da produção de etanol nas diversas taxas de diluição investigadas.

WENDHAUSEN JUNIOR (1998), utilizando sistemas em regime batelada e contínuo, conduzidos com células imobilizadas em crisotila, afirmou que obteve de (25 a 30)% de produção de etanol em relação ao sistema de células livres e o sistema operacional mostrou estabilidade em relação à produtividade e estrutura do recheio.

No Japão, pelo menos um processo que utiliza levedura imobilizada em gel alginato de cálcio em reatores de leito fluidizado, foi desenvolvido em escala piloto pela Kyowa Hakko Kogyo Co. (BORZANI *et al.*, 2001) e (FERREIRA, 1986). Seu fluxograma simplificado é apresentado na Figura 2. Os autores afirmam que a planta produzindo 12 m³/dia operou por 6 meses sem perda da estabilidade. A produtividade do sistema foi de 20g de etanol/L.h com uma concentração de etanol no caldo fermentado de 68 g/L e rendimento da fermentação de aproximadamente 95% do valor teórico. Os resultados indicam que os valores de produtividade em etanol e de rendimento da fermentação são superiores aos processos de produção de etanol operando em batelada (Melle-Boinot).

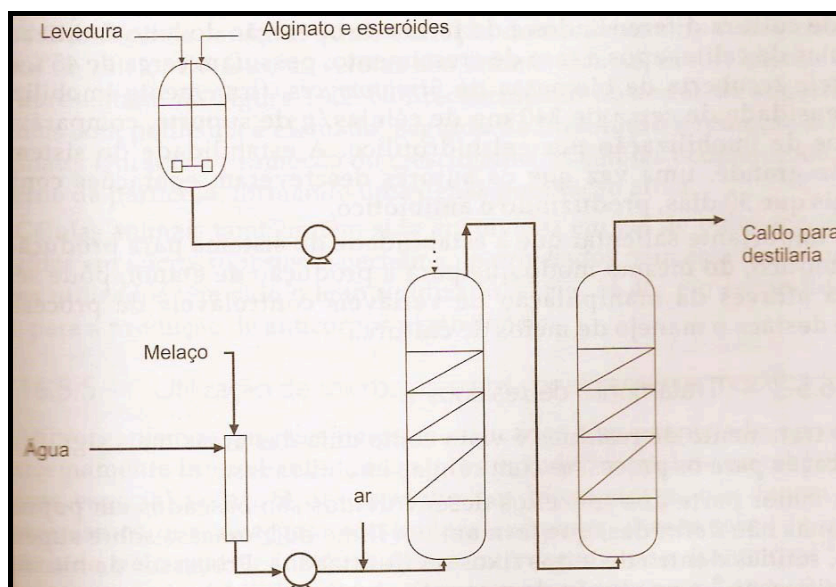


Figura 2 – Fluxograma simplificado para a produção de etanol com levedura imobilizada (BORZANI *et al.*, 2001).

WENDHAUSEN JUNIOR (1998) afirmou que os biocatalisadores apresentam como vantagens a não geração de resíduos de alta toxicidade, sendo portanto, ecologicamente corretos e principalmente, atuam sob condições “suaves”, operando com pH entre 4 e 8, com temperaturas entre 20⁰C e 40⁰C e na condição de pressão ambiente.

Embora a imobilização de células viáveis seja uma metodologia recomendada em processos biotecnológicos para o aumento nas taxas de produtividade de produtos de interesse, o método de imobilização deve ser suficientemente ameno para preservar a atividade e viabilidade celular (BATISTA *et al.*, 1999).

ALVA (1997) destacou o estresse do microambiente sobre a atividade enzimática da levedura e afirma que as barreiras difusionais impostas pela matriz sólida e a condição de empacotamento das células são os principais responsáveis pelas mudanças metabólicas.

A literatura especializada tem citado que o aprisionamento de microrganismos por um gel é a técnica de imobilização mais utilizada. Dentre os principais estão o alginato de cálcio e k-carragenana. Outra técnica consiste numa adsorção celular no próprio bagaço de cana-de-açúcar.

A proposta deste trabalho teve como objetivo apresentar uma contribuição para o desenvolvimento de metodologias para processos fermentativos, bem como a escolha de um suporte que alie compatibilidade biológica, resistência mecânica e difusão. A vantagem principal de investigar a fermentação com a utilização de células imobilizadas deve-se ao fato de que naqueles sistemas, as células estão fisicamente aprisionadas dentro de uma matriz e

assim possuem melhor retenção e uma grande área superficial para uma operação eficiente. A imobilização de células permite o reuso de biomassa, melhora a estabilidade e diminui a contaminação do produto. Entretanto, os bioreatores operando com células imobilizadas em que as partículas não são fixas apresentam um grau mais elevado de dificuldade no projeto e operação, principalmente devido à necessidade de agitação mecânica, a prevenção de sedimentação ou quebra da partícula, e do necessário cuidado na operação para que os danos nas partículas sejam minimizados.

Existe assim a necessidade de estudos que justifiquem a escolha adequada de suportes para imobilização e o desenvolvimento de modelos teóricos que possibilitem a simulação computacional e otimização de processos biotecnológicos.

1.3 – OBJETIVOS

Os objetivos principais desse trabalho podem ser divididos em :

GERAL:

- Estudar a imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em gel alginato de cálcio no processo de fermentação alcoólica.

ESPECÍFICOS:

- Verificar as condições de imobilização de células *Saccharomyces cerevisiae* em suporte de gel de alginato de cálcio usando técnicas estatísticas;
- Propor um modelo matemático que considere os *pellets* em um bioreator de mistura;
- Analisar o comportamento do reator bioquímico operando em batelada e com células imobilizadas para obtenção de etanol;
- Avaliar a produção de etanol com a melhor condição de imobilização definida através de planejamentos fatoriais.

1.4 – ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Essa dissertação foi dividida em 06 capítulos, além das referências bibliográficas, com a estrutura apresentada a seguir. No Capítulo 01 apresenta-se uma abordagem sobre a importância dos estudos de imobilização celular para a produção de etanol e as principais realizações de diversos pesquisadores na área.

O Capítulo 02 apresenta uma revisão da literatura sobre os diversos microrganismos estudados para a produção de etanol, os processos pertinentes e ilustra os aspectos principais do processo com um fluxograma de uma unidade produtora de etanol e açúcar.

O Capítulo 03 aborda as principais técnicas e metodologias desenvolvidas na realização da dissertação, apresenta a utilização do software Global Lab[®] no tratamento de imagens de *pellets* para a discriminação de tamanhos necessária ao planejamento experimental proposto.

O Capítulo 04 apresenta os resultados e as discussões deste trabalho. As conclusões são apresentadas no Capítulo 05 e sugestões para trabalhos futuros, como por exemplo, o desenvolvimento de reatores para operação contínua, são propostas no Capítulo 06. O Apêndice B apresenta as Tabelas (B1 até B25) com os resultados experimentais obtidos nos experimentos realizados e o Apêndice A as curvas de calibração utilizadas durante os ensaios fermentativos.

Alguns resultados desse trabalho foram publicados em congressos científicos. Citam-se: (a) SINAFERM-2005 (XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, Recife, Pernambuco), título do trabalho *Study of an immobilized cell bioreactor for alcohol production* e (b) SHEB-2005 (Simpósio Nacional de Hidrólise Enzimática de Biomassas, Maringá, Paraná), título do trabalho: *Avaliação das Condições de Confeção de Pellets de Alginato para a Imobilização de Leveduras em Processos Biotecnológicos*.

CAPÍTULO 02 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Introdução

Esse capítulo apresenta uma revisão dos aspectos centrais da utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na produção de etanol. A produção de etanol pela via química não é discutida nessa dissertação. É de interesse nessa revisão, a apresentação do estado da arte da produção de etanol pela via biotecnológica. Para fins de clareza, define-se processo biotecnológico como aquele que objetiva a utilização de sistemas celulares para obtenção de produtos ou desenvolvimento de processos industriais (BORZANI *et al.*, 2001).

Os processos biotecnológicos possuem origem bastante antiga, entretanto, nas últimas décadas têm despontado como área estratégica por muitos países, incluindo o Brasil. Essa grande importância estratégica tem despertado e catalisado o crescimento de várias possibilidades de aplicação.

2.1.1 - Microrganismo: *Saccharomyces cerevisiae*

De maneira geral, leveduras são fungos unicelulares pertencentes a um grande grupo heterogêneo de organismos eucarióticos. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é tipicamente gemulante e suas cepas são utilizadas no processo de fermentação para produção de bebidas alcoólicas e combustíveis como o etanol, são em geral de forma elipsoidal, com dimensões características de 6 a 8 µm de comprimento por 5 µm de largura (PELCZAR *et al.*, 2004).

Na Figura 03 tem-se a representação esquemática das estruturas típicas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e suas principais organelas. Reproduzem-se assexuadamente por brotamento e durante o processo, o núcleo divide-se por “estrangulamento” onde uma parte dele entra no broto juntamente com outras organelas. A conexão citoplasmática é lacrada pela confecção de novo material de parede celular.

As Figuras 4 e 5, mostram como é o desenvolvimento e reprodução da célula livre da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e assim pode-se fazer uma suposição do que acontece no interior do microambiente.

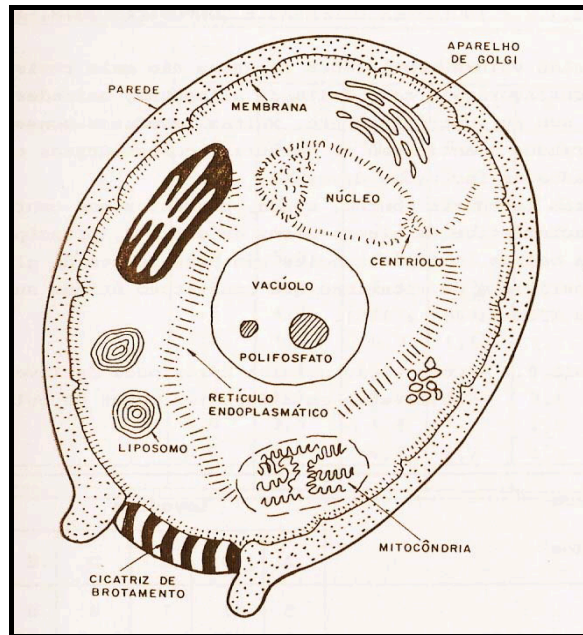


Figura 03 – Representação esquemática das estruturas típicas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

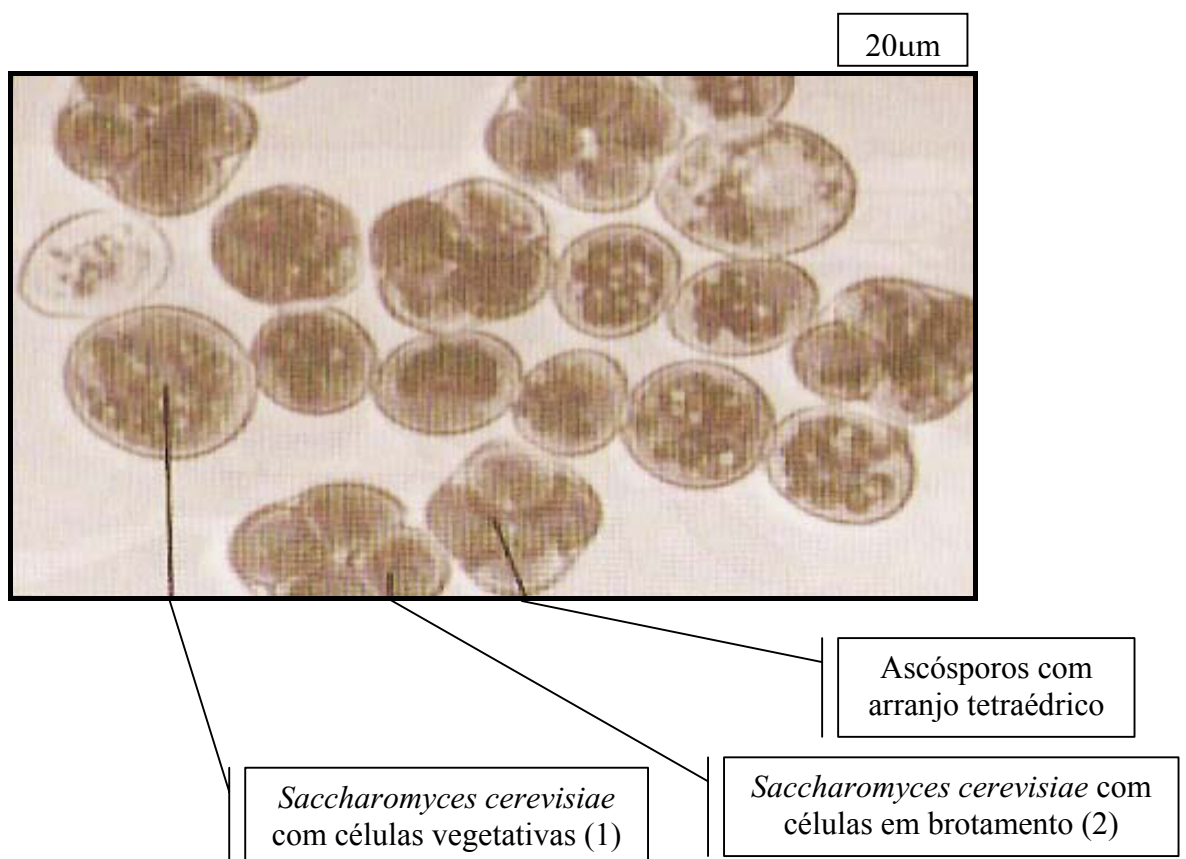


Figura 04 – Microfotografia com as diversas fases de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (PELCZAR *et al.*, 2004).

Das Figuras 04 e 05 observa-se que tanto o estado vegetativo haplóide como os

diplóides podem estar presentes. A cariogamia precede um estágio de multiplicação vegetativa diplóide e a meiose precede um estágio de multiplicação vegetativa haplóide com formação de ascósporos.

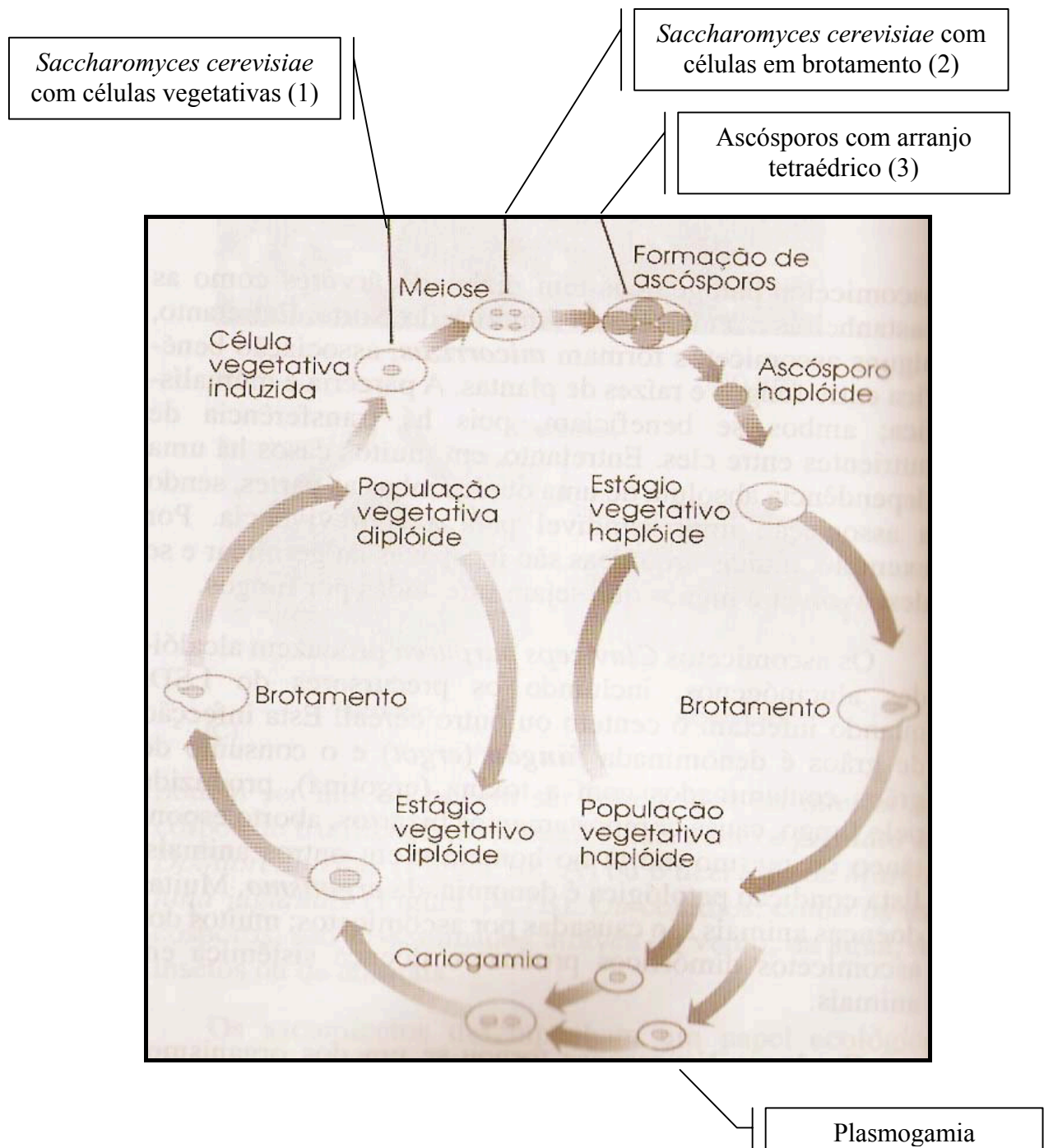


Figura 05 – Representação das diversas fases de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (PELCZAR *et al.*, 2004).

Em termos de atividade biológica de microrganismos, VALLERO (1999), utilizando células livres e imobilizadas em reator anaeróbio, constatou que as células aderidas aos

diversos suportes utilizados tiveram menor atividade biológica que as células livres, embora essa diferença não fosse significativa. Nesse mesmo trabalho, o autor afirma que tanto a porosidade como a espessura do biofilme influenciaram na velocidade global de consumo de substrato.

ALCAZAR (2000), estudando a atividade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* sob diferentes condições de estresse e o efeito do aprisionamento em gel alginato de cálcio, relata que, além de exibirem maiores teores de glicogênio, as células imobilizadas apresentam uma menor sensibilidade tanto ao estresse salino quanto ao estresse alcoólico durante a fermentação, pois a matriz de alginato no sistema de fermentação contribui na tolerância ao etanol.

MARQUES (2001), utilizando uma cultura mista de microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis* imobilizadas em siltito, destaca que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresentou melhor aderência e fixação ao suporte, resultando em melhores desempenhos na fermentação contínua e em batelada.

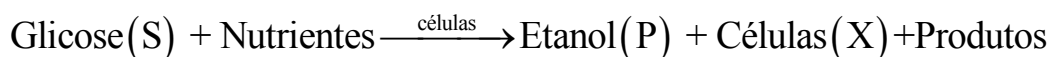
De acordo com MARCONDES (2002), quando os nutrientes são deficientes, as leveduras entram em meiose para formarem esporos haplóides, os quais germinam quando as condições tornam-se mais favoráveis. Ainda de acordo com esse autor, para um processo fermentativo recomenda-se que as leveduras sejam selecionadas conforme os seguintes critérios:

- Fermentação altamente produtiva;
- Alto rendimento em etanol;
- Tolerância ao etanol;
- Ótima tolerância a baixo pH;
- Alta tolerância na faixa de temperatura do processo;
- Alta tolerância a contaminação.

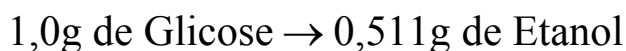
A utilização dos critérios propostos por MARCONDES (2002) permite destacar as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces fragilis* como as mais adequadas para utilização, sendo que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ocupa lugar de maior atratividade.

2.1.2- Cinética de fermentação

A reação de produção do etanol é bem documentada na literatura e é expressa como:



e apresenta uma taxa de conversão teórica de glicose em etanol, segundo MAIORELLA (1994), expressa por:



A princípio, a estequiometria da reação mostra que toda a glicose é consumida e é convertida em etanol, com rendimento teórico de 0,511g de etanol para cada 1g de glicose. No entanto, conforme relatam LIMA (2002) e MARCONDES (2002), ocorrem, durante a síntese, reações secundárias, resultando na redução do rendimento teórico, conhecido com rendimento Pasteur, que demonstra que no processo, o rendimento máximo real é de 95%. Em laboratório, o rendimento obtido é de 64,33L de etanol / 100 kg de sacarose e não é atingido nas destilarias industriais. Obviamente o controle de temperatura e demais condições de processo são mais facilmente controladas em laboratório do que em escala industrial. Em destilarias que operam bem tecnicamente e em adequadas condições de funcionamento tem-se obtido cerca de 61 L de etanol/100 kg de sacarose em um processo bem conduzido.

Na Tabela 02, pode-se verificar quais são os subprodutos gerados durante a fermentação.

Tabela 02 - Rendimento ótimo de fermentação de leveduras em condições anaeróbicas, (LIMA, 2002) e (MARCONDES, 2002)

Produtos	Massa (g) de Produto / 100 g de Glicose
Etanol	48,4
Dióxido de carbono	46,6
Glicerol	3,3
Ácido succínico	0,6
Massa de células	1,2

A bioconversão da glicose em etanol é representada pela Figura 06, conforme citado por PELCZAR *et al.* (2004). A glicose é convertida em piruvato pela glicólise, e o piruvato é convertido em etanol e CO₂ em um processo com duas etapas. Na primeira etapa o piruvato sofre a descarboxilação em uma reação irreversível catalisada pelo piruvato descarboxilase. Essa reação é uma descarboxilação simples e não envolve a oxidação do piruvato. A enzima piruvato descarboxilase requer Mg⁺² e tem uma coenzima firmemente ligada, a tiamina pirofosfato, que segundo RAHN (1952), citado por MARCONDES *et al.* (2002), age

aumentando a tolerância da levedura ao etanol. Na segunda etapa, por ação da enzima álcool desidrogenase, o acetaldeído é reduzido a etanol, com o NADH derivado da atividade da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase fornecendo o poder redutor. Assim, em vez de lactato, os produtos finais da fermentação alcoólica são o etanol e o CO_2 , (LEHNINGER *et al.*, 2002).

Destaca-se ainda que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um aeróbio facultativo, ou seja, em aerobiose, parte da glicose é transformada em biomassa, CO_2 e H_2O e em anaerobiose, a maior parte é convertida em etanol e CO_2 , processo esse chamado de fermentação.

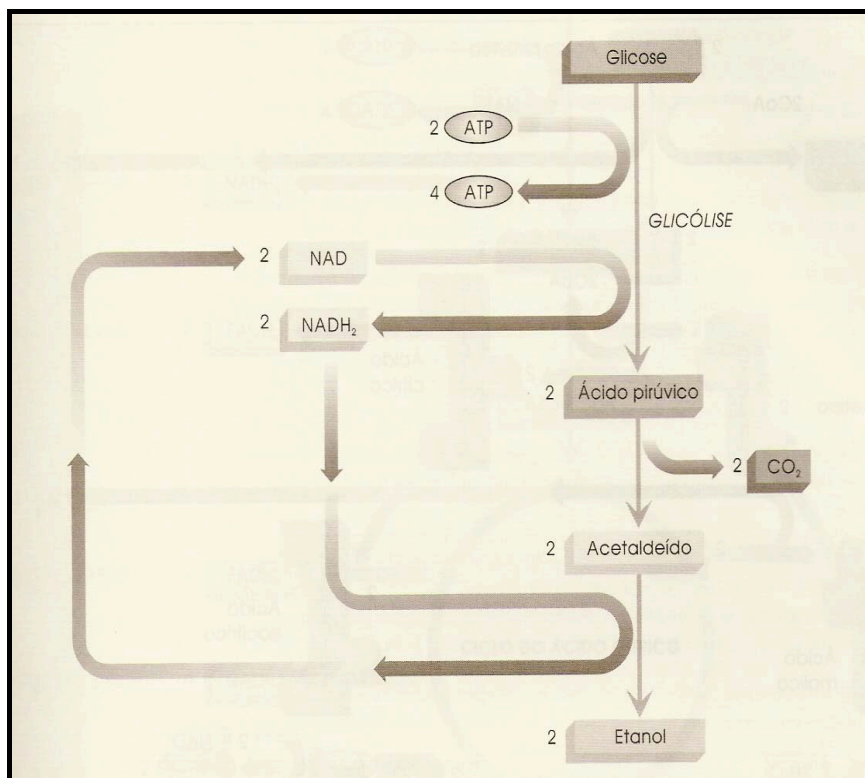


Figura 06 – Etapas de redução da glicose a etanol (PELCZAR *et al.*, 2004).

2.2- Meios de cultura

A preparação de meio de cultura semi-sintético visa identificar e selecionar os mais importantes nutrientes de forma a se estabelecer um processo fermentativo adequado. FERREIRA (1998), simulando a fermentação alcoólica usando glicose com fonte de carbono, recomenda a seguinte composição, citada na Tabela 03.

Tabela 03 – Composição do meio de cultura semi-sintético (FERREIRA,1998)

Nutrição mineral	Concentração em (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,2
KH ₂ PO ₄	2,4
Na ₂ HPO ₄	1,2
Glicose	variável*
MgSO ₄ .H ₂ O	0,3
Extrato de levedura	3,0

*conforme planejamento experimental.

2.2.1-Aspectos de assepsia e desinfecção

Contaminação biológica e efeitos de infecções podem ser observados em praticamente todos os processos biotecnológicos. Em geral, os processos contínuos apresentam uma dificuldade extra, pois é difícil localizar a fonte de contaminação e quando isso acontece todo o sistema fica comprometido.

GAVA (2004) afirma que o pH relativamente baixo (2 - 4,5) do meio de fermentação inibe a ação de microrganismos contaminantes e ERGUN(2000) afirma que o pH ideal para a fermentação alcoólica é de 4,5.

A Figura 07 apresenta uma fermentação tipicamente contaminada com lactobacilos, onde se pode observar a formação de espuma nos frascos indicados com setas. Ressalta-se ainda que essa espuma exerce uma influência significativa na homogeneização do meio de cultura e ainda exige a presença de antiespumantes.

ANGELIS *et al.* (2001) destacam que a presença de bactérias floculantes, como o *Lactobacillus fermentum*, pode causar o assentamento de células de levedura no fundo das dornas e perdas de células nas centrífugas, já que essas bactérias são contaminantes triviais das fermentações alcoólicas industriais e conseqüentemente levam a uma diminuição do rendimento e produtividade do etanol. Outro aspecto importante desse trabalho, é que, na faixa de pH entre 2 e 5, a floculação é próxima de zero, quando a concentração de *Lactobacillus fermentum* foi de 1,38g/L para cada 65,4 g/L de *Saccharomyces cerevisiae*.

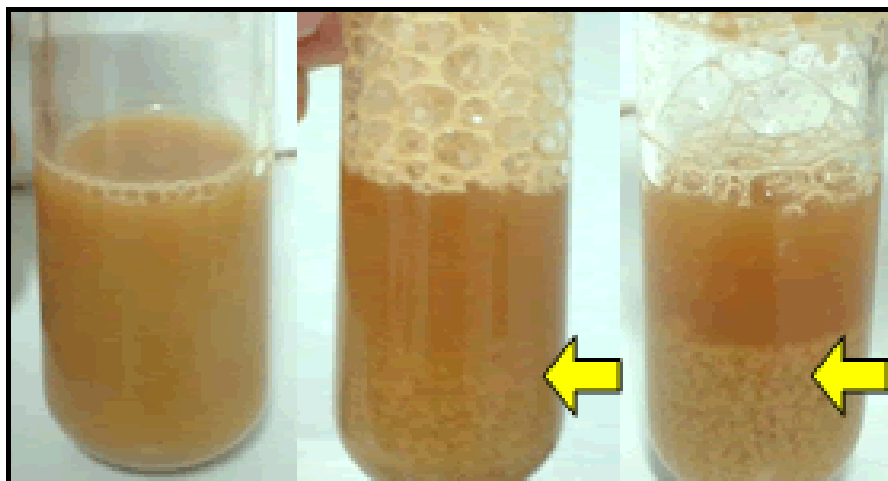


Figura 07 - Fermentação contaminada com cultura de *Lactobacilos* e formação de espuma (FERMENTEC, 2005).

2.3- Rendimentos de processos fermentativos

Sabe-se que parte do açúcar presente no meio fermentativo é consumido pela levedura para sua manutenção, reprodução e às vezes quando o ambiente fermentativo torna-se agressivo, a mesma consome o substrato de maneira acentuada, não para geração de produtos, mas sim para sua proteção e manutenção.

A literatura tem avaliado que 5% do açúcar do meio fermentativo é metabolizado para gerar subprodutos, diminuindo, conseqüentemente, o rendimento da fermentação. Na Tabela 04 apresenta-se os diversos rendimentos encontrados na literatura, bem como os produtos obtidos durante a fermentação alcoólica.

Tabela 04 - Produtos da fermentação alcoólica, em g/100g de glicose metabolizada, para diferentes rendimentos fermentativos em células livres (BORZANI *et al.*, 2001)

Produto de fermentação	Pasteur 95%	JACKMAN (1987) (90-95)%	BASSO et al., (1996) (85-92)%
Etanol	48,5	45 - 49	43 - 47
CO ₂	46,4	43 - 47	41 - 45
Glicerol	3,3	2 - 5	3 - 6
Ácido succínico	0,6	0,5 - 1,5	0,3 - 1,2
Ácido acético	—	0 - 1,4	0,1 - 0,7
Óleo fúsel	—	0,2 - 0,6	—
Butilenoglicol	—	0,2 - 0,6	—
Biomassa (massa seca)	—	0,7 - 1,7	1 - 2

Segundo STUPIELLO (1984), até 1975, o processo fermentativo tinha aproximadamente 63% de taxa de conversão para 100 g de açúcar total. Com a incorporação de leveduras selecionadas, melhor qualidade do mosto, controle da nutrição e de temperatura do processo, as fermentações em batelada ganharam produtividades fermentativas, chegando a ciclos completos de 5 a 8 horas e com rendimentos fermentativos de até 92%.

2.4 - Fluxograma simplificado do processo de produção de etanol

A Figura 08 apresenta um fluxograma simplificado para a produção de etanol, representando apenas as etapas envolvidas no processo fermentativo. É importante ressaltar que existem vários tipos de usinas e destilarias, destacando as seguintes categorias:

- **Usinas autônomas:** processam a cana-de-açúcar para a produção de vários tipos de açúcar;
- **Destilarias autônomas:** processam a cana-de-açúcar para a produção de álcool (hidratado ou anidro);
- **Destilarias anexas:** são unidades próximas as usinas de açúcar que são capazes de produzir açúcar e álcool hidratado ou anidro.

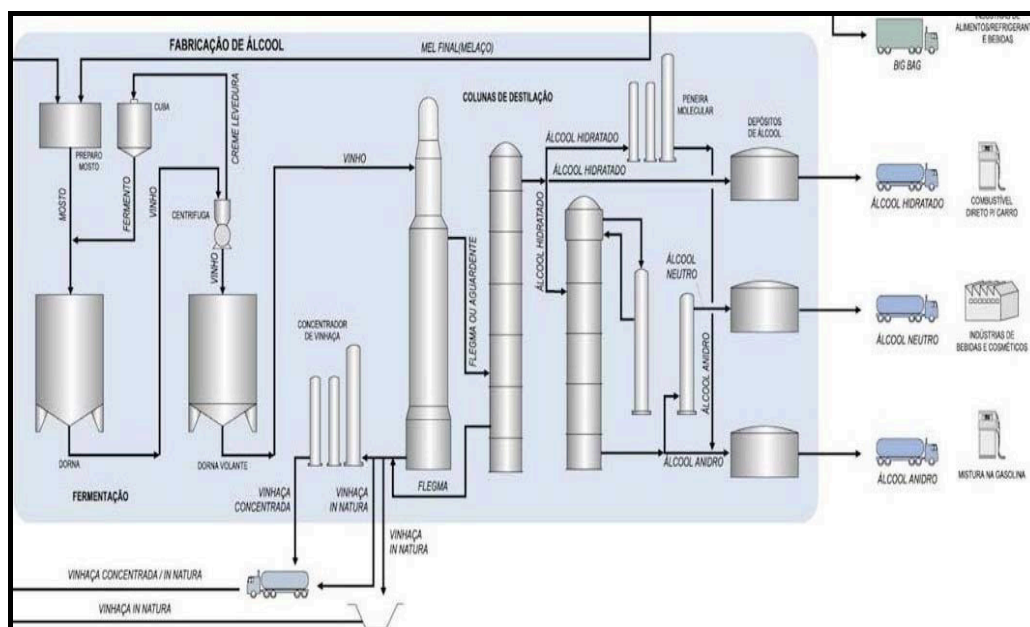


Figura 08 – Fluxograma simplificado para a produção de etanol (UDOP, 2005).

2.5- Descrição ilustrativa do processo industrial de produção de etanol

Os procedimentos básicos de um processo industrial específico para produção de etanol podem ser descritos pelas seguintes etapas: limpeza da carga de cana-de-açúcar; corte e desfibrilamento (preparação para a extração do caldo); separação do caldo e bagaço. Esse caldo que é chamado de caldo misto, é enviado aos aquecedores e depois para um decantador, onde são separadas as impurezas, obtendo-se o caldo clarificado.

Após resfriamento do caldo clarificado em um trocador de calor, envia-se o mesmo para o processo fermentativo, onde é adicionada a cultura de leveduras.

A suspensão (caldo + levedura) é incubada em dornas de fermentação por até 8 horas, obtendo-se um produto intermediário chamado vinho. Após essa etapa, o vinho é centrifugado, separando-se as leveduras, que são denominadas de leite de levedura, que será usado em novas fermentações.

O produto centrifugado é chamado de vinho delevedurado (contém até 8% de álcool) e o etanol (produto final) é separado deste por destilação. Para cada 1L de etanol processado são gerados 13L de vinhaça e esta é enviada para tratamento para se minimizar impactos ambientais. Após o término da destilação, obtém-se o álcool hidratado, que é armazenado em tanques e posteriormente distribuído.

2.6- Imobilização celular

De modo geral, a imobilização celular consiste em “aprisionar” um microrganismo em determinada matriz chamada suporte (bagaço de cana-de-açúcar, géis como o alginato e pectina, silito e crisotila, que é um resíduo da indústria produtora de cerâmica).

Em processos biotecnológicos, a imobilização celular tem-se mostrado uma técnica promissora, pois permite a operação de fermentação em condições de alta densidade celular, além de evitar o *washout* de células durante operações com altas vazões de alimentação e possibilitar a reutilização das células em sistemas em batelada e contínuo. Em processos de produção de etanol, por exemplo, existe a possibilidade de ganhos, evitando-se a etapa de centrifugação e conseqüentemente a economia de energia.

Segundo CARVALHO (2000), a utilização da técnica tem sido recomendada uma vez que possibilita a obtenção de elevadas concentrações celulares por unidade de volume do reator, maximiza a fração de meio fermentativo descarregada ao final de cada batelada, facilita a reutilização dos biocatalisadores, minimiza tempos “mortos” e custos de separação e confere maior estabilidade às células.

O aprisionamento em gel de alginato de cálcio é a técnica mais amplamente utilizada para a imobilização de células viáveis. O alginato é um polissacarídeo presente em todas as “algas marrons”, embora poucas espécies sejam comercialmente importantes (CARVALHO, 2000). A gelificação do alginato ocorre rapidamente na presença de íons cálcio sem alterações drásticas de temperatura, pH e pressão osmótica, o que permite preservar a atividade e a viabilidade dos microrganismos imobilizados. Além disso, o alginato é um material barato e facilmente encontrado (BATISTA *et al.*, 1999).

ORIVE *et al.* (2002) afirmam que a pureza do alginato também é um fator de biocompatibilidade de microesferas e tem uma influência direta no processo fermentativo. Outro fator importante que viabiliza a utilização da técnica de imobilização em alginato é a possibilidade do preparo de grandes quantidades de *pellets* de maneira fácil e relativamente rápida.

WENDHAUSEN JUNIOR (1998) apresenta como vantagens do uso de células imobilizadas:

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

COX e NELSON (2002) destacam a importância de sistemas imobilizados e suas vantagens, como por exemplo, a possibilidade de percolamento de um leito fixo com o meio fermentativo e a coleta do produto de interesse no efluente.

WENDHAUSEN JUNIOR (1998) descreve os mais diversos métodos de imobilização de biocatalisadores que tem sido relatados na literatura, e encontram-se destacados na Figura 09.

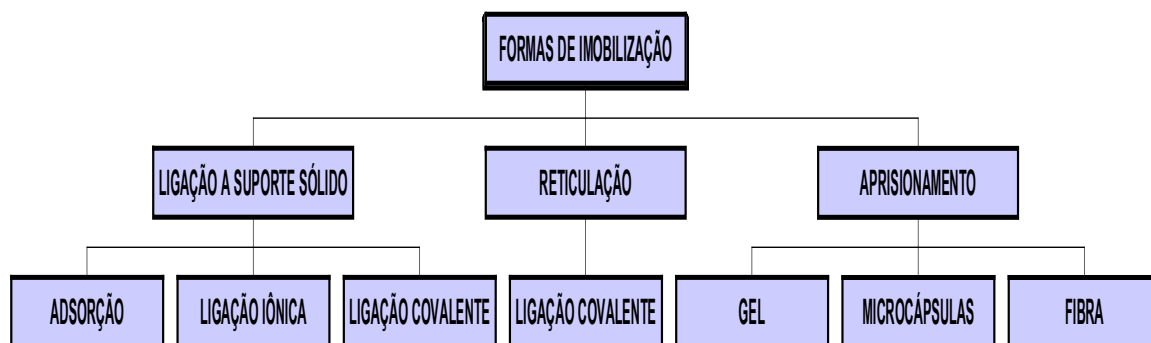


Figura 9 - Métodos de imobilização celular (WENDHAUSEN JUNIOR, 1998).

O mais popular método de aprisionamento é o que utiliza matrizes de gel, sendo que os géis de cálcio são os mais utilizados devido a sua resistência ao ataque por microrganismos ou enzimas. Um aspecto negativo do método de aprisionamento deve-se as limitações difusionais do substrato e produto na matriz de gel, que necessitam de estudos mais detalhados para aperfeiçoamento da metodologia de imobilização celular.

Segundo MATTIASSON (1982), citado por WENDHAUSEN JUNIOR (1998), o método de reticulação ou ligação cruzada baseia-se na ligação covalente entre moléculas do biocatalisador, criando aglomerados, através de um agente ligante, como por exemplo, glutaraldeído. Os microrganismos têm uma tendência natural de aderência sobre superfícies sólidas, e esse, é o princípio da imobilização por adsorção.

FERREIRA (1986) afirma que os problemas mais evidentes relacionados à utilização da técnica de imobilização de leveduras em gel são:

- Vida útil do conjunto suporte / levedura;
- Retirada do CO₂ produzido na fermentação alcoólica;
- Retirada de energia do sistema.

CARVALHO (2000), estudando a imobilização de *Candida guilliermondii* FTI 20037 em gel de alginato de sódio, verificou que as variações nos parâmetros de imobilização exerceram influências sobre a estabilidade química do suporte e sobre a capacidade fermentativa das células imobilizadas, mostrando que estudos no sentido de desenvolver metodologias e planejamento para técnica de imobilização devem ser estimulados e desenvolvidos.

Nas Figuras 10 e 11, pode-se observar os tipos de forças de atração e as diversas formas de imobilização.



Figura 10- Características e tipos de suporte utilizados nas diversas técnicas de imobilização, (KOURKOUTAS *et al.*, 2003).

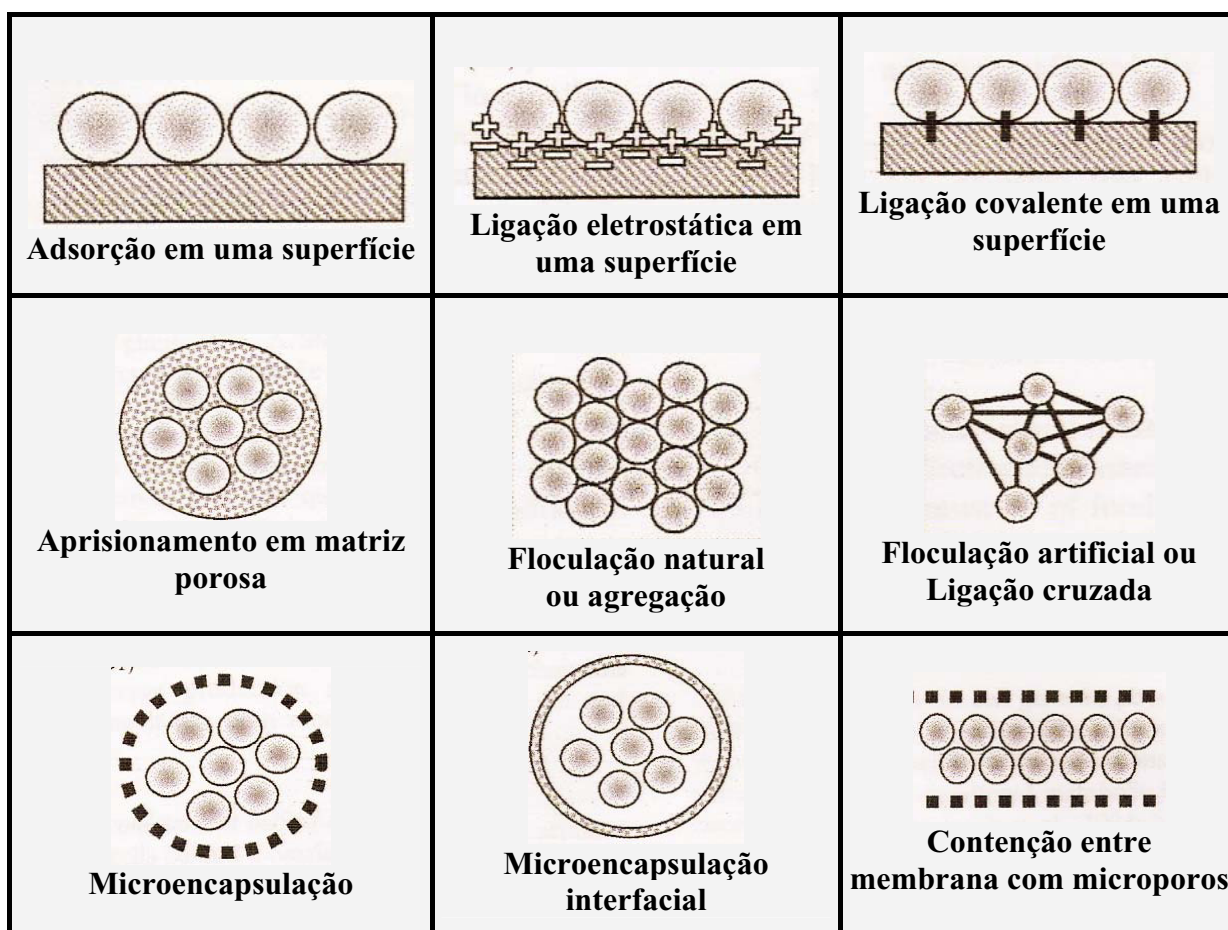


Figura 11- Métodos básicos de imobilização (KOURKOUTAS *et al.*, 2003).

2.7- Coeficiente de partição

A estrutura cinética em uma reação envolvendo células imobilizadas em suportes inertes pode ser atribuída em parte a mudanças nas concentrações das espécies químicas e a efeitos locais devido ao efeito de partição e efeito difusional, onde a partição está ligada ao equilíbrio de fases entre a partícula de gel e o fluido que a envolve. E o efeito difusional está

relacionado à resistência a transferência de massa das espécies químicas que difundem no gel, segundo YAMANÉ *et al.* (1981), citados por FERREIRA (1986) e GUBULIN (1986).

O efeito de partição aparece devido a uma distribuição desigual da concentração de solutos na superfície de contato entre a matriz e o fluido adjacente, em geral expresso por uma constante de equilíbrio definida como coeficiente de partição, K_p , (FERREIRA, 1986).

Em equilíbrio termodinâmico tem-se que:

$$K_{Pi} = \frac{C_{iG}}{C_{iF}} \quad (1)$$

onde:

K_{Pi} Coeficiente de partição da espécie química i ;

C_{iG} Concentração da espécie química i no interior da matriz;

C_{iF} Concentração da espécie química i no interior do fluido adjacente (solução externa à partícula gelatinosa).

INCROPERA (2002) afirma que para mecanismos de difusão dos líquidos em sólidos não existem teorias gerais disponíveis e apenas resultados limitados são encontrados na literatura.

De acordo com a lei da conservação de massa, a taxa na qual a massa de uma determinada espécie entra em um volume de controle menos a taxa na qual a massa da espécie deixa o volume de controle deve ser igual a taxa na qual a massa da espécie é armazenada no mesmo volume de controle.

Tomando um *pellet* como volume de controle, de acordo com a Figura 12, tem-se que o balanço de massa correspondente à entrada de substrato A é dado pela Equação 2:

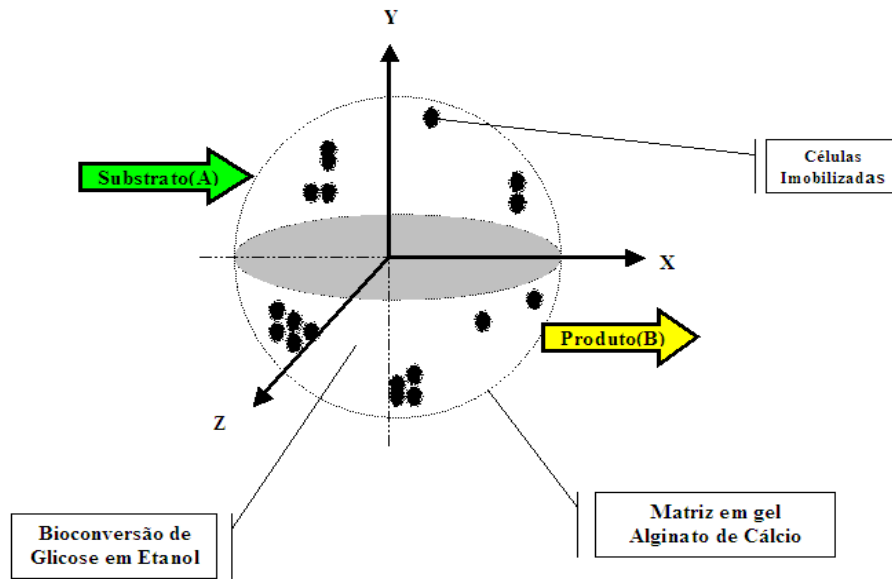


Figura 12- Representação esquemática do *pellet* com a entrada do substrato e saída do produto.

$$\text{Fluxo de Massa}_{A, \text{entra}} + \text{Fluxo de Massa}_{A, \text{gerado}} - \text{Fluxo de Massa}_{A, \text{sai}} = \frac{dMA}{dt} = \text{Fluxo de Massa}_{A, \text{armazenado}} \quad (2)$$

Para o caso de coordenadas esféricas tem-se que:

$$\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(D_{AB} r^2 \frac{\partial x_A}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2 \sin \theta} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(D_{AB} \sin \theta \frac{\partial x_A}{\partial \theta} \right) + \frac{1}{r^2 \sin^2 \theta} \frac{\partial}{\partial \phi} \left(D_{AB} \frac{\partial x_A}{\partial \phi} \right) + N_A^* = \frac{\partial C_A}{\partial t} \quad (3)$$

HANDRIKOVÁ (1996), utilizando alginato de cálcio como suporte, propôs o modelo descrito pela Equação 4 para coeficiente de difusão efetivo, baseado na cinética de Monod. O modelo proposto baseia-se na dependência entre a taxa de reação por unidade de volume da partícula (r_0), em regime isotérmico e a partícula homogênea:

$$r_0 = \frac{3D_e}{R} \left(\frac{dC_s}{dr} \right)_{r=R} \quad (4)$$

O gradiente de concentração de substrato C_s na superfície da partícula é obtido resolvendo-se a equação reação-difusão abaixo:

$$D_e \left(\frac{d^2 C_s}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dC_s}{dr} \right) - K_2 C_x \frac{C_s}{K_m + C_s} = 0 \quad (5)$$

Com suas condições de contorno:

$$\begin{aligned} r = 0 & \quad \frac{dC_s}{dr} = 0 \\ r = R & \quad C_s = C_{sb} \end{aligned} \quad (6)$$

C_{sb}	----	Concentração de substrato na fase <i>bulk</i>
C_x	----	Concentração celular
C_s	----	Concentração de substrato na superfície da partícula
D_e	----	Coefficiente de difusão efetivo
K_2	----	Parâmetro da equação de Monod
K_m	----	Parâmetro da equação de Monod

Resolvendo-se as Equações (5-6) tem-se o modelo para o cálculo do coeficiente de difusão efetivo em alginato de cálcio, Equação 7 (HANDRIKOVÁ, 1996):

$$r_0 = -\frac{V_S}{V_P} \left(\frac{dC_{sb}}{dt} \right) = \frac{V_S}{V_P} \left(\frac{dC_{pb}}{dt} \right) \quad (7)$$

HANDRIKOVÁ (1996) afirma que na concentração de 100mM de glicose, a 30°C e utilizando um reator batelada o D_e (coeficiente de difusão efetivo) é de $2,9 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$.

2.8- Projeto de experimentos

A ferramenta estatística de planejamento de experimentos e superfícies de resposta, RSM (*Response Surface Methodology*), não é nova, ela foi proposta por Box nos anos de 1950 e apresenta as mais diversas possibilidades de aplicações, como por exemplo, a redução do teor de oxigênio dissolvido em cervejas e otimização de processos de fermentação.

Com o desenvolvimento da tecnologia e novas propostas para as ferramentas da qualidade como TQM (*Total Quality Management*) e JIT (*Just in Time*), a técnica de planejamento de experimentos ganhou destaque com a implementação da metodologia *Six-Sigma*, que é mais uma filosofia de trabalho do que uma simples técnica matemática. Segundo

essa metodologia, todos os processos operando no “estado” *Six-Sigma* geram apenas 3,4 defeitos por milhão de ensaios (NETO, 2001).

Em geral, o planejamento composto central (PCC) deve ser utilizado quando se deseja verificar a existência de uma curvatura da função objetivo, ou seja, quando se deseja verificar a existência de termos não lineares no modelo de regressão. Esse tipo de planejamento consiste de uma parte referente ao planejamento fatorial 2^k , com n_F corridas, $2k$ corridas axiais ou estrela e n_C corridas centrais (CALLADO *et al.*, 2001).

Quatro diferentes modelos podem ser testados sequencialmente no planejamento composto central:

- Somente termos lineares dos efeitos principais;
- Termos lineares e quadráticos dos efeitos principais;
- Termos lineares dos efeitos principais e interações de segunda ordem;
- Termos lineares e quadráticos dos efeitos principais e interações de segunda ordem.

A técnica de planejamento visa mostrar como os fatores (variáveis envolvidas no processo) podem influenciar determinada resposta, como por exemplo, a produtividade. A função que descreve essa influência é chamada de superfície de resposta (NETO *et al.*, 2001).

Segundo MONTGOMERY e CALLADO (2001), quando as variáveis críticas não são conhecidas é necessário aplicar um experimento varredura (o *screen experiment*), que visa exatamente determinar quais são as variáveis mais importantes e que resultam em um melhor desempenho do processo.

O planejamento, nesse aspecto, tem se apresentado como uma poderosa ferramenta de análise, possibilitando o conhecimento do “melhor” caminho a ser investigado durante a realização dos ensaios, para se evitar o estudo de “regiões” que não são relevantes na investigação pretendida.

Como em procedimentos experimentais nem sempre é possível realizar a repetição de ensaios, devido ao fator custo operacional e tempo, necessita-se do desenvolvimento de ferramentas estatísticas de reconhecimento de anomalias nos resultados. O teste de Grubbs, reconhecido pela *International Organization for Standardization* (ISO), é uma dessas ferramentas. Ele admite a distribuição normal e compara a norma, medida em desvio padrão, do valor duvidoso em relação à média do conjunto de valores. Assim, o valor duvidoso é incluído no cálculo da média e do desvio padrão (NETO *et al.*, 2001).

A expressão para o cálculo do teste é dada pela Equação 8, onde X_a é o valor anômalo

do ensaio , $\bar{X}$ o valor médio dos ensaios e σ o desvio padrão. Se o valor do teste for maior que o limite crítico tabelado, então o valor duvidoso é considerado anômalo.

$$G = \frac{\|X_a - \bar{X}\|}{\sigma} \quad (8)$$

Segundo NETO *et al.* (2001), uma das vantagens dos planejamentos compostos centrais é que, por serem formados com três partes distintas, pode-se construí-los sequencialmente, conforme a necessidade. Se a análise estiver acontecendo em uma região da superfície de resposta em que a curvatura não é importante, então não se precisa de um modelo quadrático, e pode-se ter uma análise significativa com apenas a parte fatorial do planejamento, com a qual pode-se ajustar um modelo linear e em seguida deslocar-se para a região de interesse da superfície de resposta. Usando-se os ensaios dos pontos centrais pode-se testar a significância da curvatura e se esta se mostrar significativa, pode-se completar o planejamento com os pontos axiais.

2.8.1- Aplicação da função *desirability* em bioprocessos

A quantidade de fatores envolvidos no desempenho de bioprocessos e os respectivos efeitos da interação entre os mesmos, tornam a análise e a otimização de processos um procedimento complexo. Quando o número de fatores significativos em um processo é igual ou superior a três não é mais possível a sobreposição das curvas de nível para todas as respostas estudadas afim de se visualizar a região de ótimo e mesmo quando, apenas dois fatores são significativos, a otimização simultânea de todos os fatores só é possível se a região tida como ótima dos níveis dos dois fatores for a mesma para todas as respostas estudadas. É evidente que a medida que o número de fatores aumenta, a análise torna-se ainda mais difícil de ser realizada.

Segundo NETO (2001), um problema de otimização com várias respostas $Y_1, Y_2, \dots, Y_n$, para o qual existe um modelo baseado no mesmo conjunto de fatores codificados $X_1, X_2, \dots, X_n$, consiste em identificar os níveis dos fatores que produzirão o conjunto de respostas mais adequadas. Dessa forma, se o número de fatores significativos X_i gerar um modelo ajustado, e ainda, se o número de respostas Y_i não for superior a 2, pode-se sobrepor as superfícies de resposta e localizar a região de ótimo por inspeção visual. A otimização de uma

resposta poderá ser realizada por técnicas de programação matemática se as demais respostas estiverem sujeitas a determinadas restrições impostas para cada processo específico.

Para que todos os fatores operem simultaneamente em seus níveis otimizados, pode-se aplicar a metodologia de otimização simultânea proposta por DERRINGER *et al.* (1980). A metodologia consiste em transformar cada resposta Y_i em uma função, que se define função de desejabilidade (*desirability*) d_i , com valores restritos ao intervalo $[0,1]$, conforme:

$d_i = 1$	A resposta Y_i está no seu valor desejável;
$0,80 \leq d_i < 1$	A resposta Y_i está excelente;
$0,63 \leq d_i < 0,80$	A resposta Y_i está adequada;
$0,40 \leq d_i < 0,63$	A resposta Y_i está aceitável, mas pobre;
$0,30 \leq d_i < 0,40$	A resposta Y_i está no limite de aceitabilidade;
$0 \leq d_i < 0,30$	A resposta Y_i está fora da faixa adequada;

As funções de desejabilidade para todas as respostas são combinadas em uma função chamada desejabilidade global (D), que é a média geométrica das m desejabilidades individuais e é dada pela Equação (1) (STEUER, 1999).

$$D = \sqrt[m]{d_1 d_2 \dots d_m} \quad (9)$$

A otimização simultânea das várias respostas se reduz a maximização da desejabilidade global (D). Dessa maneira, a otimização está condicionada em se determinar quais são os d_i que levam ao D global máximo. Dessa forma, todas as vezes em que um valor de d_i estiver fora da faixa adequada, a desejabilidade global será anulada, independentemente dos valores das demais respostas.

De acordo com MONTGOMERY e CALLADO (2001), as funções individuais de desejabilidade são estruturadas como:

- Maximização: para que um valor desejado ótimo T seja máximo para uma resposta Y , tem-se uma função desejabilidade definida conforme a Equação (10), onde L é o menor valor aceitável para a resposta.