

$$d = \begin{cases} 0 & \text{se } Y < L \\ \left\{ \frac{Y-L}{T-L} \right\}^{S'} & \text{se } L \leq Y \leq T \\ 1 & \text{se } Y > T \end{cases} \quad (10)$$

- Minimização: para que um valor desejado ótimo T seja mínimo para uma resposta Y , tem-se uma função desejabilidade definida conforme a Equação (11), onde U é o maior valor aceitável para a resposta Y .

$$d = \begin{cases} 1 & \text{se } T < Y \\ \left\{ \frac{U-Y}{U-T} \right\}^{t'} & \text{se } T \leq Y \leq U \\ 0 & \text{se } Y > U \end{cases} \quad (11)$$

- Função bilateral: a função bilateral de desejabilidade é aquela em que o valor desejado T está localizado entre o limite inferior (L) e o limite superior (U) e é definida segundo a Equação (12).

$$d = \begin{cases} 0 & \text{se } Y < L \\ \left\{ \frac{Y-L}{T-L} \right\}^{S'} & \text{se } L \leq Y \leq T \\ \left\{ \frac{U-Y}{U-T} \right\}^{t'} & \text{se } T \leq Y \leq U \\ 0 & \text{se } Y > U \end{cases} \quad (12)$$

Nas Equações (10)- (12), S' e t' são os parâmetros que definem a variação da taxa de desejabilidade com a resposta. Variando-se S' e t' , pode-se acelerar ou retardar a desejabilidade e atribuir diferentes valores aos diversos níveis de resposta. Valores altos de S' e t' , farão com que a desejabilidade decresça rapidamente, tornando-se muito baixa exceto quando Y está perto do valor ótimo. Valores baixos de S' e t' farão com que a resposta tenha uma variação mais ampla sem que a desejabilidade seja diminuída (NETO, 2001). A escolha dos parâmetros S' e t' é determinada de acordo com a prioridade que se atribui a cada resposta

d_i . Assim, a taxa de variação ou queda da desejabilidade não precisam ser simétricas em torno de T .

De acordo com NETO (2001) depois de se identificar o conjunto de condições que maximizem ou minimizem a desejabilidade global, é necessário analisar o comportamento individual de cada uma das respostas e verificar se as mesmas estão em regiões tecnicamente possíveis e com suas restrições perfeitamente atendidas.

A variação dos parâmetros S' e t' gera um conjunto de soluções otimizadas e a própria variação entre essas soluções indica o quanto é robusta a condição experimental avaliada. Assim, se as soluções forem insensíveis a variação de S' e t' , o procedimento experimental está bem posto.

2.9 -Modelagem e simulação

Poucos trabalhos na literatura mostram o uso de modelos matemáticos para prever taxas de difusão de substratos e produtos em células imobilizadas, considerando que a principal desvantagem no procedimento de imobilização é a limitação imposta pelos processos difusivos nos *pellets* (BRODELIUS e VANDAMME, (1987), citados por CARVALHO, 2000).

SILVA (2001), utilizando fermentação alcoólica contínua e extrativa e trabalhando com modelos empíricos, afirma que conseguiu uma conversão de 99,2% dos açúcares (glicose e sacarose) do meio de alimentação e uma produtividade de 21,0 g/(h L).

Existem diversos modelos para determinação de parâmetros cinéticos para fermentação na literatura. Segundo BAILEY *et al.* (1986), os modelos cinéticos podem ser descritos segundo a Tabela 05 abaixo:

Tabela 05 – Classificação dos modelos cinéticos (BAILEY *et al.*, 1986)

Modelos Cinéticos	
Tipos	Características
Não-estruturados e não-segregados	Células são consideradas como solutos.
Estruturados e não-segregados	Células são indivíduos múltiplos componentes, com composição média semelhante.
Não-estruturados e segregados	Células são seres individuais distintos, mas descritos por um único componente.
Estruturados e segregados	Células são seres individuais distintos, mas descritos por múltiplos componentes.

Segundo BIROL (1998), são citados na literatura 11 equações de modelos cinéticos, conforme as Tabelas 06, 07 e 08.

Tabela 06 – Modelos cinéticos sem inibição (BIROL, 1998)

Modelo	$\frac{dX}{dt}$	$\frac{dS}{dt}$	$\frac{dP}{dt}$
Monod	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{sx} + S} \right) X$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{sp} + S} \right) X$	$-\left(\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} \right) - \left(\frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \right)$
Moser	$\mu_{\max} \left(\frac{S^n}{K_{sx} + S^n} \right) X$	$q_{\max} \left(\frac{S^n}{K_{sp} + S^n} \right) X$	$-\left(\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} \right) - \left(\frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \right)$
Teisse	$\mu_{\max} \left(1 - \exp \left(-\frac{S}{K_{sx}} \right) \right) X$	$q_{\max} \left(1 - \exp \left(-\frac{S}{K_{sp}} \right) \right) X$	$-\left(\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} \right) - \left(\frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \right)$

Tabela 07 – Modelos cinéticos com inibição pelo substrato (BIROL, 1998)

Autor	$\frac{dX}{dt}$	$\frac{dS}{dt}$	$\frac{dP}{dt}$
Noack	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{1 + \frac{K_{sx}}{S} + \frac{S}{K_{sx}}} \right) X$	$q_{\max} \left(\frac{S}{1 + \frac{K_{S,P}}{S} + \frac{S}{K_{I,P}}} \right) X$	$-\left(\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} \right) - \left(\frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \right)$
Aiba	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{sx} + S} \right) \exp \left(-\frac{S}{K_{I,S}} \right) X$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{S,P} + S} \right) \exp \left(-\frac{S}{K_{I,P}} \right) X$	$-\left(\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} \right) - \left(\frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \right)$
Luong	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{sx} + S} \right) \exp \left(1 - \frac{S}{S_{S,\max}} \right) X$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{S,P} + S} \right) \exp \left(1 - \frac{S}{S_{P,\max}} \right) X$	$-\left(\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} \right) - \left(\frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \right)$

Segundo BIROL (1998), os modelos de Monod e Hinshelwood foram os mais adequados para a simulação no sistema batelada utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae* em alginato, mas esse fato foi função de faixas muito estreitas de concentração de substrato.

Tabela 08 – Modelos cinéticos com inibição pelo produto (BIROL, 1998)

Autor	$\frac{dX}{dt}$	$\frac{dS}{dt}$	$\frac{dP}{dt}$
Levenspiel	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{sx} + S} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{x,\max}} \right)^n X$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{s,p} + S} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{p,\max}} \right)^n X$	$-\left(\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} \right) - \left(\frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \right)$
Aiba	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{sx} + S} \right) \exp(-K_{ps}P) X$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{s,p} + S} \right) \exp(-K_{p,p}P) X$	$-\left(\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} \right) - \left(\frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \right)$
Jerusalimsky	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{sx} + S} \right) \left(\frac{K_{I,px}}{K_{I,px} + P} \right) X$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{s,p} + S} \right) \left(\frac{K_{I,px}}{K_{I,pp} + P} \right) X$	$-\left(\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} \right) - \left(\frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \right)$
Ghose-Tyagi	$\mu_{\max} \left(1 - \frac{P}{P_{x,\max}} \right) X$	$q_{\max} \left(1 - \frac{P}{P_{p,\max}} \right) X$	$-\left(\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} \right) - \left(\frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \right)$
Hinshelwood	$\mu_{\max} \left(\frac{S}{K_{sx} + S} \right) (1 - K_{px}P) X$	$q_{\max} \left(\frac{S}{K_{s,p} + S} \right) (1 - K_{p,p}P) X$	$-\left(\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} \right) - \left(\frac{1}{Y_{p/s}} \frac{dP}{dt} \right)$

CAPÍTULO 03 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1-Microrganismo e preparo do inóculo

O microrganismo utilizado nessa dissertação foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, na sua forma liofilizada e produzida pela empresa Mauri do Brasil. A cepa da levedura utilizada foi a Y904 que é destinada para a produção de etanol. Para a sua utilização, a mesma foi hidratada segundo metodologia proposta por FERREIRA (1998), onde a massa de fermento é adicionada a um balão de 0,100 L que tem seu volume preenchido com água destilada. Em seguida, essa solução celular é transferida para um Erlenmeyer de 0,250 L e levada para um incubador rotativo a uma temperatura aproximada de 25°C por 2 horas. Após a hidratação, os inóculos são preparados para a imobilização em gel alginato de cálcio, segundo as condições do planejamento estatístico proposto.

Os reagentes e materiais utilizados nas análises e na preparação do meio de cultura foram os produtos analíticos (PA) apresentados na Tabela 09.

Tabela 09 - Lista de Reagentes e Materiais utilizados nos ensaios de fermentação

Reagentes e Materiais		
Reagentes	Materiais	
Ágar malte	Pipeta de 1mL / Volumétrica	Kitassato de 2000 mL
Água destilada	Pipeta de 5 mL / Volumétrica	Erlenmeyer de 2000mL
Alginato de sódio	Pipeta de 10 mL/Volumétrica	Erlenmeyer de 500mL
Cloreto de cálcio	Pipeta de 50 mL/Volumétrica	Erlenmeyer de 250mL
Citrato de potássio	Pipeta de 10 mL	Erlenmeyer de 125 mL
Cél. de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pipeta de 50 mL	Erlenmeyer de 50mL
Glicose	Bastão de vidro	Provetas de 500 mL
Sulfato de amônio	Tubo Folin Wu	Provetas de 100 mL
Sulfato de magnésio heptahidratado	Mangueiras	Tubos de Centrifuga
Dihidrogenofosfato de potássio	Luvas assépticas	Paquímetro de precisão
Monohidrogenofosfato de sódio	Tocas assépticas	Papel alumínio
Nitrato de alumínio	Algodão	Papel
Azul de metileno	Gaze	Tubos de Vortex
Sulfato cúprico	Pêra	Álcool hidratado
Dicromato de potássio	Termômetro digital	Luvas de amianto
Etanol	Válvulas globo	Tubos de ensaios
Sal de Seignette	Pisete	Agulhas cirúrgicas

O meio de cultura sintético foi preparado segundo FERREIRA (1998) e é apresentado

na Tabela 10. Destaca-se que o mesmo não sofreu nenhum tipo de processo de esterilização ou processo asséptico e apenas seu pH foi ajustado para 4,5 conforme relatado por ERGUN (1999).

Tabela 10 – Composição do meio de cultura sintético (FERREIRA, 1998)

Nutrição mineral	Concentração (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.*

3.2- Técnicas utilizadas nos ensaios

3.2.1-Métodos analíticos

A concentração celular do inóculo foi determinada em espectrofotômetro a 650nm a partir da suspensão de células devidamente diluída em água destilada. Uma curva de calibração foi estabelecida para correlacionar o peso seco (g/L) de células livres e imobilizadas com a absorbância a 650nm. A determinação da concentração celular (células livres) no meio fermentativo, ao longo de todos os ensaios, foi realizada através da mesma técnica.

A concentração de células imobilizadas foi quantificada a cada intervalo de 2 horas, recolhendo-se uma amostra composta por 5 *pellets* de alginato do fermentador e colocando-os na presença de uma solução de citrato de potássio 4% (p/v), onde os mesmos foram dissolvidos e centrifugados a 10.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante da centrifugação foi descartado e o material sólido contido no frasco da centrífuga foi colocado em suspensão e diluído com água destilada em balão de 0,025L. Após essa etapa, a solução obtida foi levada ao espectrofotômetro e teve sua leitura realizada em cubeta de vidro a 650nm para determinação da concentração de células.

Para a quantificação do etanol, foi utilizado o método do dicromato de potássio, onde uma amostra do meio de cultura foi centrifugada a 10.000 rpm e o sobrenadante foi levado ao

balão de destilação junto com uma alíquota de 0,075L de água destilada. Uma nova amostra foi recolhida do destilado e adicionou-se 0,002L de dicromato de potássio à mesma. A solução amostra/dicromato foi aquecida em banho a 60⁰C por 30 minutos em um tubo Folin Wu. Após o aquecimento, deixou-se o material em repouso à temperatura ambiente para resfriamento, quando uma amostra foi coletada para análise em espectrofotômetro operando a 600nm (FERREIRA , 1998).

A determinação de açúcares redutores (glicose), foi determinada pelo método de Eynol-Lane modificado, segundo citado por FERREIRA (1986). O método baseia-se na titulação da amostra a ser analisada com uma solução de sulfato cúprico e uma solução alcalina do sal de Seignette, usando o azul de metileno com indicador. Destaca-se que a titulação foi realizada à quente.

Além das análises de concentração de células, etanol e glicose, avaliou-se o raio médio dos *pellets* com o *software* de processamento de imagens Global Lab[®].

3.2.2- Procedimentos Experimentais

a) Seleção do fermento para ensaios de fermentação

Sabe-se que existem diferentes tipos de fermento biológico no mercado e esses fermentos visam atender as mais diversas aplicações (desde as grandes usinas produtoras de álcool até as pequenas panificadoras).

Na impossibilidade de se trabalhar com culturas puras e/ou geneticamente modificadas para maximização de eficiência, foi realizado um ensaio estatístico (quadruplicata) do tipo:

- Único fator (tipo de fermento);
- Única resposta (concentração máxima de etanol produzida).

A partir das análises realizadas, determinou-se um intervalo de confiança para a verificação da existência de diferenças significativas entre as médias dos ensaios e conseqüentemente, a existência da diferença entre os vários tipos de fermento investigados. Os ensaios foram realizados em reator de mistura da marca New Brunswick, modelo MultiGen, com volume útil de 2L (Figura 14), operando em regime descontínuo.



Figura 13 - Reator utilizado nos ensaios fermentativos.

b) Técnicas de imobilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em alginato de cálcio

O inóculo obtido foi imobilizado em gel alginato de cálcio previamente preparado segundo proposto pelos planejamentos experimentais, onde os fatores estudados em uma etapa de varredura foram: concentração de alginato de sódio, concentração de cloreto de cálcio e tempo de cura, conforme metodologia apresentada por CARVALHO (2000). Os *pellets* foram obtidos pelo gotejamento do alginato de sódio em solução de cloreto de cálcio nas concentrações propostas no planejamento (0,1M, 0,15M e 0,2M). As partículas com as células imobilizadas foram mantidas em solução de cloreto de cálcio a 4°C durante 0, 12 e 24h e após esse período, lavadas com água destilada e usadas nas fermentações.

Na realização do planejamento fatorial fracionado, o tempo de cura em todos os ensaios foi mantido em torno de 30 minutos e as partículas foram tratadas com $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ por 5 minutos conforme proposto por ROCCA *et al.* (1995).

c) Preparação dos *pellets* de alginato de cálcio

A obtenção de *pellets* com diâmetro padronizado conforme a necessidade exigida pelo planejamento foi realizada com a utilização de procedimentos diferenciados de gotejamento do alginato de sódio em solução de cloreto de cálcio utilizando-se o sistema experimental apresentado na Figura 14. A avaliação das dimensões das partículas produzidas foi efetuada

com o *software* de processamento de imagens Global Lab[®]. Esse *software* faz a digitalização da imagem, possibilitando a avaliação do número de *pellets* e apresentando o raio médio equivalente de cada *pellet*. A confecção de pellets para uma escala industrial pode seguir procedimento sugerido por BRANDENBERG (1998).

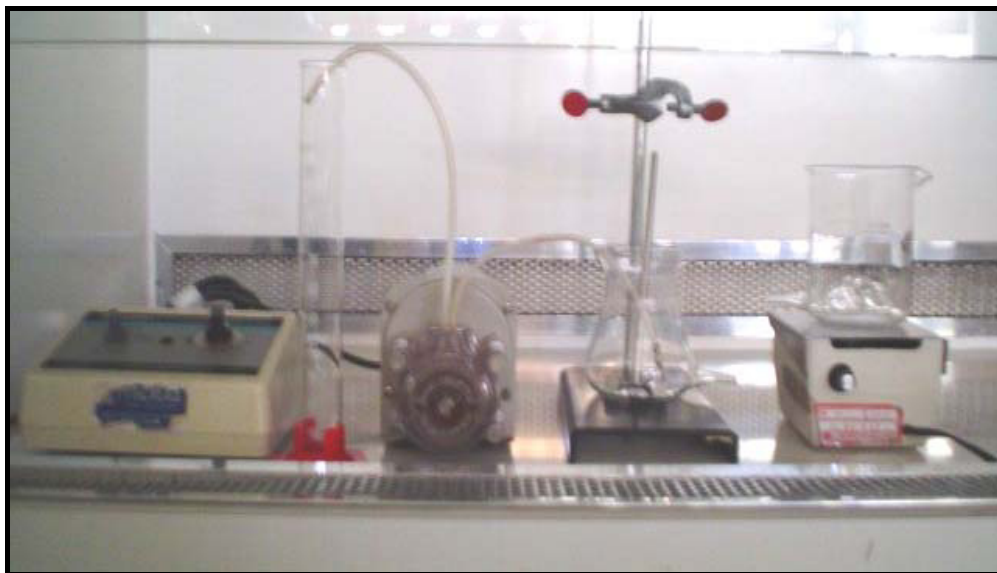


Figura 14 – Equipamento utilizado na imobilização e confecção dos *pellets*.

A Figura 15 apresenta uma amostra representativa dos *pellets* obtidos pelo procedimento de preparação utilizando a técnica de gotejamento com “pontadeiras” selecionadas (Figura 16) para fornecerem os diferentes diâmetros exigidos pelo planejamento experimental.

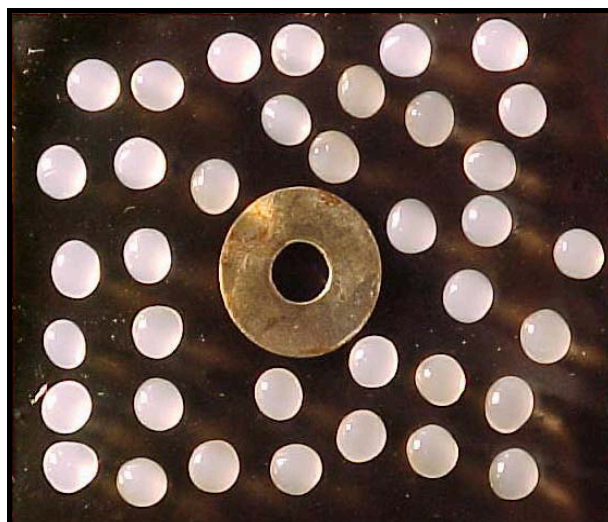
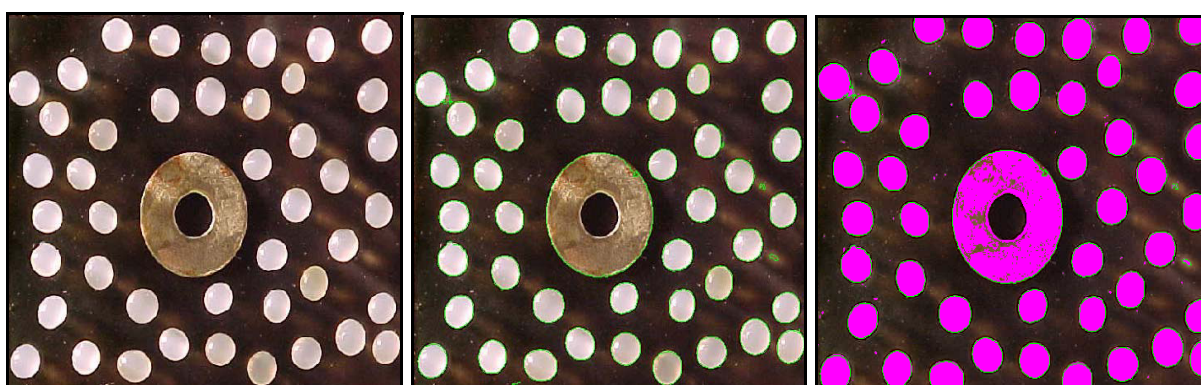


Figura 15 – Amostra representativa dos *pellets* de alginato de cálcio obtidos e o padrão de medida (diâmetro externo de 15mm) usado no *software* Global Lab[®].



Figura 16 – “Ponteiros” usadas para obtenção dos *pellets* de diferentes diâmetros e padrão de medida (diâmetro externo de 15mm).

A Figura 17 apresenta imagens de *pellets* analisadas pelo *software* de varredura e tratamento de imagens. Para avaliação dos diâmetros, o *software* converte o diâmetro do padrão em *pixels* e através de comparação, determina o diâmetro médio das imagens selecionadas. Após essa análise, o *software* de tratamento de imagens fornece os raios médios dos *pellets*, possibilitando, assim, a avaliação do desvio padrão para os raios calculados.



(a)

(b)

(c)

Figura 17 – Processamento de imagens dos *pellets*: (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.

3.3-Planejamento de Experimento

3.3.1 – Planejamento Varredura

A técnica de varredura (*Screen experiment*) é uma técnica usada para verificar quais variáveis são importantes para descrever um processo (CALLADO *et al.*, 2003). NETO *et al.* (2001) afirmam que não existe uma técnica para se determinar quais os níveis e fatores que são mais significativos no processo e que essa escolha é feita empiricamente segundo

características de cada processo, assim esse planejamento visou identificar os parâmetros mais importantes para a maximização da fermentação alcoólica.

Segundo CALLADO *et al.* (2003), o algoritmo de Piepel e Snee pode ser utilizado para se encontrar os vértices e os centróides da região de estudo e suas restrições. Nos ensaios propostos, o algoritmo utilizado considerou cada restrição escrita na forma linear, onde cada restrição representa uma linha através da região experimental e para cada restrição, avalia-se se a restrição é atendida ou não. Se isso não acontece, novos vértices são calculados, definindo assim uma nova região experimental, que é atualizada à medida que nova restrição é analisada. Após a definição da região final do planejamento, os centróides dos lados são calculados e representam os pontos do planejamento que são utilizados para o estudo experimental (Figura 18).

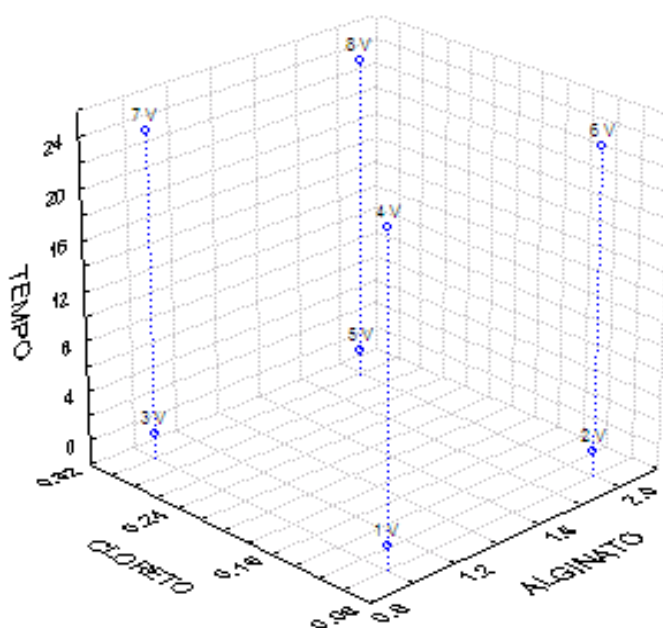


Figura 18 –Diagrama de dispersão dos pontos do planejamento gerado.

As restrições definidas para os ensaios realizados, são:

$$1 \text{ (\% p/v)} \leq \text{concentração de alginato de sódio} \leq 2 \text{ (\% p/v)}$$

$$0,1 \text{ M} \leq \text{concentração de cloreto de cálcio} \leq 0,3 \text{ M}$$

$$0 \text{ h} \leq \text{tempo de cura} \leq 24 \text{ h}$$

A Tabela 11 apresenta os fatores e os diferentes níveis estudados no planejamento do tipo

varredura e a Tabela 12 (contendo os fatores e níveis codificados) apresenta um esquema do planejamento fatorial completo 2^3 , que foi utilizado para se avaliar os efeitos principais e as interações entre as variáveis (concentração de alginato de sódio, concentração de cloreto de cálcio e tempo de cura) na região de estudo.

Tabela 11 - Fatores e níveis do planejamento fatorial tipo varredura

FATORES	NÍVEIS		
	-1	0	+1
Concentração de alginato de sódio (% p/v)	1	1,5	2
Concentração de cloreto de cálcio (M)	0,1	0,15	0,2
Tempo de cura (h)	0	12	24

nível superior: +1; nível inferior: -1 ; nível central: 0

Tabela 12 - Matriz do planejamento experimental fatorial completo 2^3 com fatores e níveis codificados

Ensaio	Concentração de cloreto	Concentração de alginato	Tempo de cura
1	- 1	-1	- 1
2	+1	- 1	- 1
3	- 1	+1	- 1
4	+1	+1	- 1
5	- 1	- 1	+1
6	+1	- 1	+1
7	- 1	+1	+1
8	+1	+1	+1

3.3.2- Planejamento tipo fatorial composto central

Nesse planejamento procurou-se verificar a influência dos diâmetros dos *pellets* no processo fermentativo e caso exista, um valor que maximize a eficiência do processo fermentativo. Nas Tabelas 13 e 14, tem-se os fatores e níveis do planejamento composto central e a matriz do planejamento composto central 3^{4-1} contendo os fatores e níveis

codificados, respectivamente.

Tabela 13 - Fatores e níveis do planejamento composto central

FATORES	NÍVEIS				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Concentração de alginato de sódio (% p/v)	2,0	2,2	2,5	2,8	3,0
Concentração de cloreto de cálcio (M)	0,05	0,10	0,18	0,26	0,30
Concentração de glicose (g/L)	30,00	41,35	65,00	88,65	100,00
Diâmetro do <i>pellet</i> (mm)	3,1	3,5	4,2	4,9	5,2

nível superior: +1; nível inferior: -1 ; nível central: 0 e níveis : $+\alpha=1,48$ e $-\alpha=-1,48$

A Tabela 14 apresenta o planejamento proposto do tipo 3^{4-1} . Destaca-se que os 16 primeiros ensaios representam um planejamento do tipo 2^4 . Assim, a maneira como foi estruturado a sequência de ensaios permitiu avaliar, após os primeiros 16 ensaios, se o diâmetro era um fator estatisticamente significativo no processo operando em regime batelada. Caso a conclusão fosse positiva, o planejamento proposto seria executado e em caso negativo ter-se-ia que definir um novo fator.

Na fração do planejamento composto central pode-se verificar se existe interação entre o diâmetro e outros fatores e se ela é significativa ou não, no nível de confiança estudado.

3.3.3- Investigação da função *desirability* em bioprocessos

A função de desejabilidade permite otimizar simultaneamente os níveis de fatores de interesse para a maximização do rendimento da fermentação. O modelo adotado foi o de maximização com valor $s'=1$ (Equação 10). Utilizando-se os dados experimentais obtidos para todos os ensaios com 40 níveis simulados, pode-se avaliar a desejabilidade global dos ensaios realizados. Nesse caso tem-se uma combinação 40x40x40 para o experimento varredura e uma combinação 40x40x40x40 para o planejamento composto central.

Tabela 14 - Matriz do planejamento experimental fatorial composto central 3^{4-1} contendo fatores e níveis codificados

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
1	- 1	- 1	- 1	- 1
2	+1	- 1	- 1	- 1
3	- 1	+1	- 1	- 1
4	+1	+1	- 1	- 1
5	- 1	- 1	+1	- 1
6	+1	- 1	+1	- 1
7	- 1	+1	+1	- 1
8	+1	+1	+1	- 1
9	- 1	- 1	- 1	+1
10	+1	- 1	- 1	+1
11	- 1	+1	- 1	+1
12	+1	+1	- 1	+1
13	- 1	- 1	+1	+1
14	+1	- 1	+1	+1
15	- 1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0
18	- α	0	0	0
19	+ α	0	0	0
20	0	- α	0	0
21	0	+ α	0	0
22	0	0	- α	0
23	0	0	+ α	0
24	0	0	0	- α
25	0	0	0	+ α

CAPÍTULO 04 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Avaliação dos diferentes tipos de fermento biológico

Dois diferentes tipos de fermentos biológicos disponíveis no mercado foram avaliados estatisticamente com o objetivo de se determinar qual apresentava melhor rendimento fermentativo e condições de operacionalidade adequada.

A Tabela 15 apresenta os resultados do desempenho fermentativo de dois tipos de fermentos disponíveis e utilizando o meio de cultura proposto por FERREIRA (1998) com glicose como fonte de carbono. Os resultados foram expressos em concentração de etanol e em rendimento Pasteur.

Tabela 15 – Avaliação estatística entre os fermentos biológicos disponíveis no mercado

Ensaio Fermentativos ⁽¹⁾	Fermento ^(A)		Fermento ^(B)		d = X _A - X _B	
	Etanol g/L	Rendimento Pasteur	Etanol g/L	Rendimento Pasteur	Etanol g/L	Rendimento Pasteur
1	22,55	92,97	17,50	72,14	5,05	20,83
2	22,31	92,00	17,53	72,27	4,79	19,73
3	22,94	94,45	16,96	69,93	4,98	24,52
4	22,50	92,78	17,56	72,42	4,94	20,36
Média	22,58	93,05	17,39	71,69	4,94	21,36
Desvio Padrão	0,277	1,023	0,286	1,179	0,111	2,154
Graus de Liberdade	3	3	3	3	3	3

(1)- Concentração de etanol (P_f em g/L) ao término de 04 horas de fermentação com $S_0 = 50\text{g/L}$ e $X_0 = 10\text{g/L}$

(A)- Fermento biológico seco instantâneo: Massa doce

(B)- Fermento biológico fresco instantâneo

Após avaliação estatística, utilizando o teste *t-student*, obtivemos um $t_{\text{calculado}} = 2,83 \times 10^{-7}$, contra um valor tabelado de 614. Pode-se afirmar então, com nível de confiança de 95%, que existe uma diferença na média dos resultados, concluindo portanto que o fermento A é mais eficiente que o fermento B e essa eficiência encontra-se na ordem de 20% de superioridade.

Essa é uma informação significativa, pois todos os ensaios são dependentes desse resultado e influem diretamente na resposta do planejamento, comprovando que a escolha do

microrganismo a ser utilizado tem impacto direto sobre a produtividade e eficiência fermentativa. Dados cinéticos dessa avaliação, encontram-se nas Figuras 19 e 20, respectivamente.

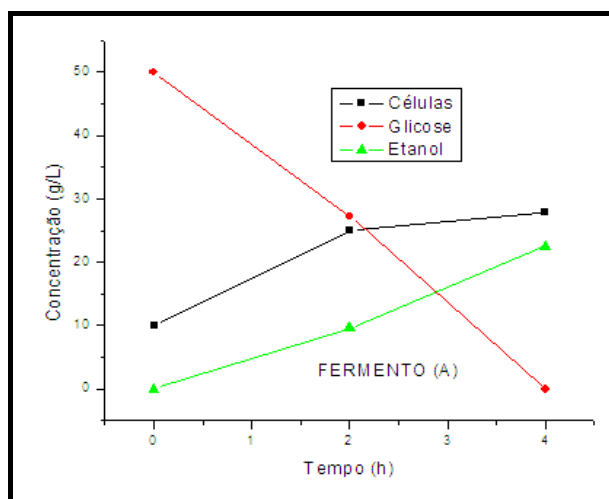


Figura 19 – Perfis de concentração de etanol, glicose e células livres para o fermento tipo A.

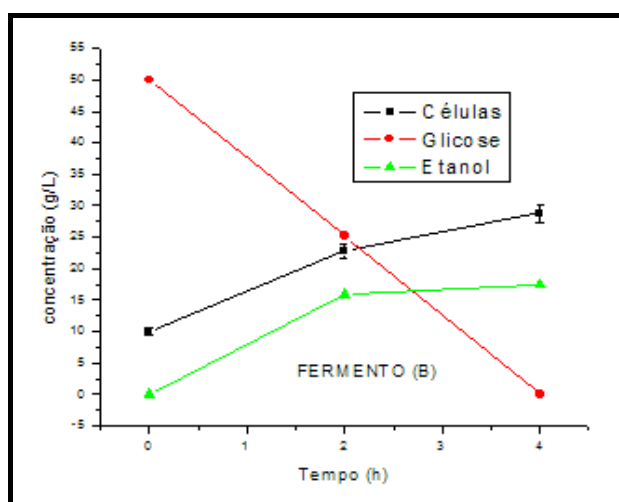


Figura 20- Perfis de concentração de etanol, glicose e células livres para o fermento tipo B.

4.2- Avaliação das distribuições dos diâmetros dos *pellets* obtidos

A Tabela 16 apresenta os raios médios obtidos durante os ensaios e calculados pelo *software* de processamento de imagens com médias indicadas em negrito. Os resultados mostram que não houve dispersão significativa dos raios obtidos, validando assim a proposta do planejamento e do procedimento experimental de confecção dos *pellets*.

Tabela 16 – Raios médios para partículas confeccionadas nas 5 faixas analisadas com *software* de processamento de imagens

Raios médios obtidos (mm)				
R1	R2	R3	R4	R5
1,5	2,3	1,7	2,1	2,5
1,5	2,3	1,7	2,1	2,5
1,5	2,3	1,7	2,1	2,5
1,5	2,3	1,7	2,1	2,6
1,5	2,3	1,6	2,1	2,5
1,5	2,3	1,7	2,1	2,5
1,5	2,3	1,7	2,1	2,5
1,6	2,3	1,7	2,1	2,6
1,6	2,3	1,7	2,1	2,6
1,6	2,6	1,7	2,2	2,6
1,6	2,6	1,7	2,2	2,6
1,6	2,6	1,7	2,2	2,6
1,6	2,6	1,7	2,2	2,6
1,6	2,6	1,7	2,2	2,6
1,6	2,6	1,7	2,2	2,6
1,6	2,6	1,7	2,2	2,6
1,6	2,6	1,8	2,2	2,6
1,6	2,3	1,7	2,2	2,6
1,6	2,3	1,8	2,2	2,6
1,6	2,7	1,7	2,2	2,7
1,6	2,7	1,8	2,2	2,7
1,6	2,7	1,8	2,2	2,7
1,6	2,5	1,8	2,2	2,7
1,6	2,5	1,8	2,2	2,7
1,6	2,5	1,8	2,2	2,6
1,6	2,3	1,8	2,2	2,6
1,7	2,7	1,8	2,3	2,7
Valores médios dos raios				
1,57	2,47	1,72	2,16	2,59

4.3- Avaliação do planejamento fatorial completo a dois níveis do tipo 2³

A realização desse planejamento tem como objetivo a verificação dos fatores mais importantes no fenômeno de imobilização e visa a identificação de quais fatores são mais significativos na melhoria do processo fermentativo. Trata-se, então, de um planejamento que tem um caráter de varredura, pois o mesmo não é capaz de identificar pontos de máximo, mínimo ou sela, se eles existirem, o que a princípio é uma limitação para uma possível otimização ou minimização local. O planejamento utilizou como resposta a concentração de etanol ao final de 5 horas de batelada e uma concentração inicial de 30g/L de glicose.

A Tabela 17 apresenta os fatores e níveis estudados e a resposta obtida em cada ensaio com uma correlação superior a 0,98, ou seja, o modelo é capaz de explicar a variabilidade dos ensaios em 98% dos casos ($R^2 = 98,32\%$). É possível observar que as restrições estudadas mostraram que a região delimitada por um cubo, são as regiões onde os estudos a dois níveis devem ser executados, comprovando a eficiência do algoritmo de Piepel.

Tabela 17 – Planejamento 2³ e a resposta obtida nos ensaios

Ensaio	Concentração de cloreto	Concentração de alginato	Tempo de cura	Concentração de Etanol	Rendimento Pasteur (%)
1	- 1	- 1	- 1	13,2	90,4
2	+1	- 1	- 1	14,0	95,9
3	- 1	+1	- 1	12,4	84,9
4	+1	+1	- 1	12,1	82,9
5	- 1	- 1	+1	13,1	89,8
6	+1	- 1	+1	12,3	90,4
7	- 1	+1	+1	12,2	83,4
8	+1	+1	+1	9,5	65,1

A Figura 22 apresenta o comportamento das médias marginais dos ensaios realizados. Pode-se observar o não paralelismo das curvas de cloreto de cálcio operando nos níveis -1 e +1 (0,1M e 0,2M, respectivamente), representando os possíveis efeitos de interação entre o cloreto de cálcio e o tempo de cura, tendo em vista que o processo de gelificação do alginato ocorre devido a troca iônica entre os íons sódio e cloreto durante a imobilização.

Pode-se observar que a alteração de nível para o cloreto de cálcio apresenta importante efeito na resposta estudada. Na Figura 21, os valores entre parênteses são as faixas previstas para o modelo, calculadas pelo *software* Statistica 6.0[®]. A concentração de etanol é dada pela equação 13.

$$\text{Etanol} = 12,35 - 0,575 * (\text{Tempo de cura}) - 0,375 * (\text{Conc. Cloreto}) - 0,8 * (\text{Conc. Alginato}) + \\ - 0,5 * (\text{Tempo} * \text{Conc. Cloreto}) - 0,375 * (\text{Conc. Cloreto} * \text{Conc. Alginato})$$

(13)

Outro ponto de destaque é o tempo de cura, pois se percebe pela Figura 21, que ao se deslocar o tempo de cura de 24h para 0h, obtém-se uma melhoria na resposta, fato esse que apresenta um diferencial para execução de processos industriais, onde o fator tempo de

execução é primordial.

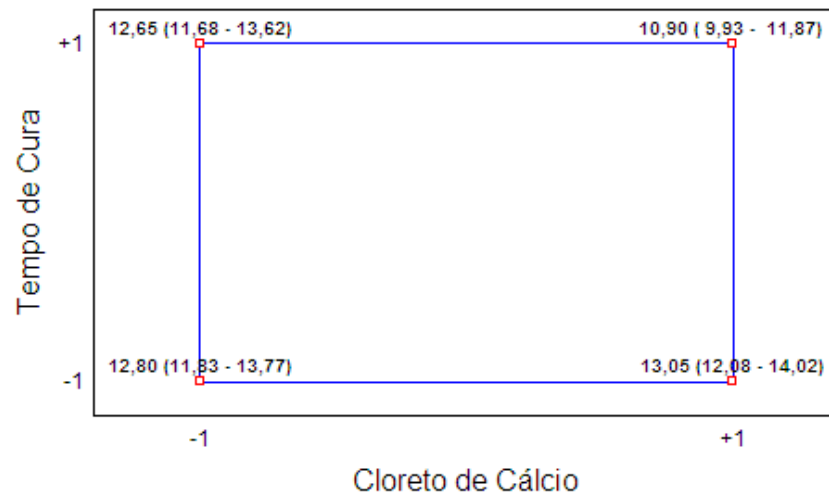


Figura 21 – Representação dos efeitos para o planejamento 2^3 .

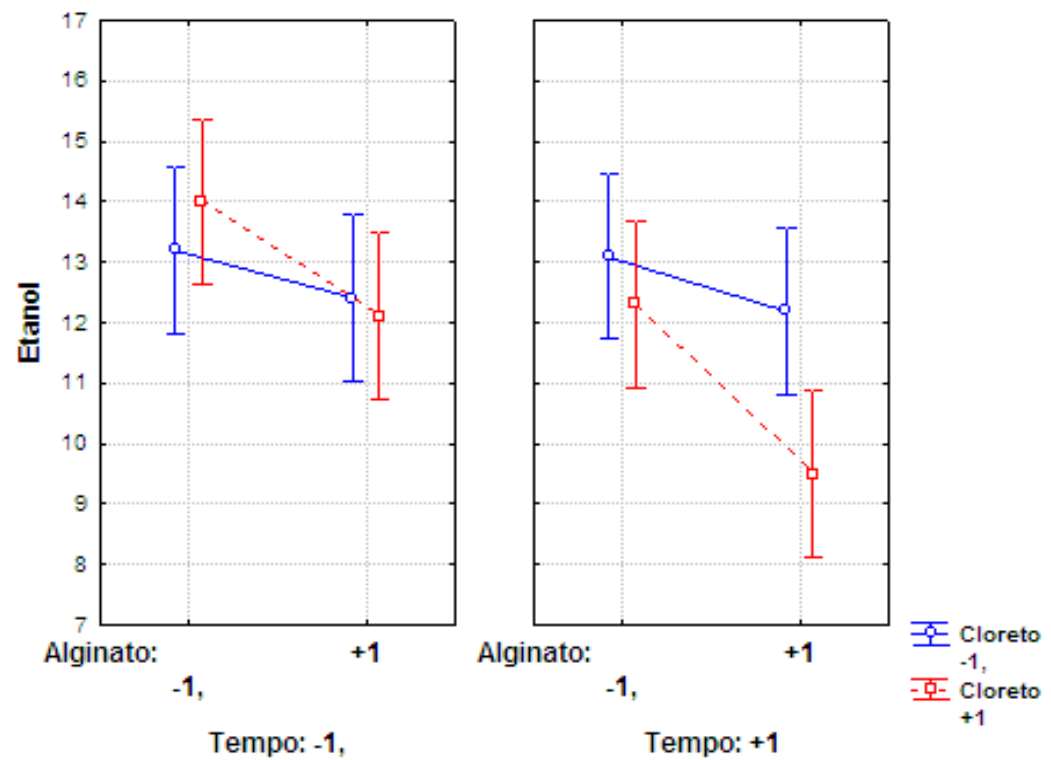


Figura 22 – Gráfico das médias marginais obtidas no planejamento 2^3 .

Na Figura 23, tem-se o diagrama de Pareto, onde os efeitos principais e de interação entre as variáveis são observados.

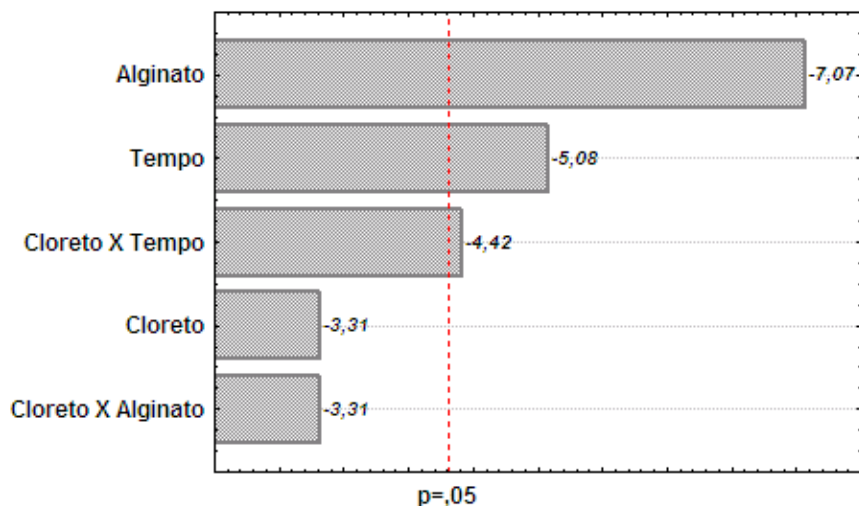


Figura 23- Diagrama de Pareto das variáveis mais significativas, com nível de confiança de 95% (números próximos às barras do diagrama são os valores do teste *t-student*)

O diagrama da Figura 23 mostra os fatores que mais influenciaram nos ensaios e que têm maior significância estatística. A concentração de alginato foi o fator que apresentou maior significância estatística, com nível de confiança de 95%, provavelmente devido ao fato de que a sua concentração influi na transferência de massa na partícula. O segundo fator mais importante foi o tempo de cura, provavelmente devido ao fato de que a cura possui efeito na difusão de massa na matriz de gel e esse efeito aumenta com o tempo de cura. A interação entre cloreto de cálcio e tempo de cura também foi significativa no intervalo de confiança estudado. Esses resultados apresentam concordância com afirmações da literatura (CARVALHO, 2001) pois são os fatores responsáveis pela formação e gelificação do alginato, conseqüentemente respondem pela eficiência do processo.

A concentração de cloreto de cálcio e o tempo de cura das esferas também foram fatores significativos ao serem analisados com um nível de confiança de 95%. Destaca-se também, que a interação entre os fatores, tempo de cura e concentração de cloreto, teve uma contribuição importante, no mesmo nível de confiança estudado, conforme dados apresentados na forma de diagrama de Pareto da Figura 23.

As superfícies de resposta apresentadas na Figura 24 mostram também uma maximização da resposta, operando-se nas concentrações de alginato igual a 1% (p/v), concentração de cloreto 0,2M e tempo de cura 0h. Cabe ressaltar que nem sempre a proposta estatística corresponde à realidade física, pois o alginato não opera continuamente para o inferior e se assim o fosse, o sistema tenderia a se comportar como sistema de células livres e certamente a diminuição excessiva de alginato comprometeria a capacidade de retenção

celular do *pellet*.

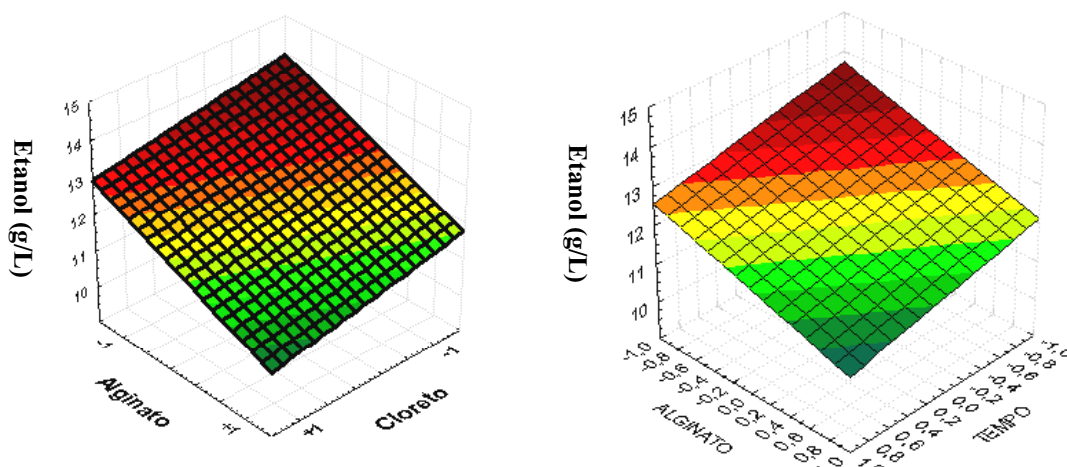


Figura 24 – Superfícies de resposta de obtidas no planejamento de varredura.

Durante os ensaios que operaram na condição de tempo de cura e concentração de cloreto nos níveis inferiores, foi observado uma perda de estabilidade mecânica do gel. Para se contornar esse problema, estudos baseados nos trabalhos de ROCCA (1995), que propõe um tratamento das esferas de gel em solução de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, em substituição ao tempo de cura foram realizados e serão apresentados posteriormente nessa dissertação em planejamento experimental 2^4 e 3^{4-1} .

Os resultados preliminares do planejamento de varredura indicam que há a necessidade de estudos mais detalhados na região de imobilização. Na próxima seção, apresenta-se a proposta para um planejamento composto central.

4.4- Planejamento do tipo 2^4

Para um estudo mais detalhado da região de imobilização, novos experimentos foram planejados com o objetivo de se investigar o efeito da concentração de glicose, diâmetro de partícula, concentração de alginato de sódio e da concentração de cloreto de cálcio na eficiência fermentativa. A análise do desempenho fermentativo no planejamento 2^3 indicou que o tempo de cura operando no nível inferior implica em melhor desempenho, mas apresenta menor estabilidade operacional. Além disso, os ensaios com *pellets* submetidos ao tratamento de tempo de cura, apresentaram *pellets* danificados após 6 horas de operação em

batelada, indicando que o reaproveitamento dos mesmos em bateladas sucessivas seria inadequado.

Para a investigação de um método alternativo de produção de partículas com melhor resistência mecânica, buscou-se a produção de *pellets* tratados com $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ ao invés de tempo de cura. A técnica de tratamento com $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ foi proposta por ROCCA (1995), que afirma ter obtido bons resultados substituindo o tempo de cura por um tratamento alternativo com $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$. Segundo ROCCA (1995), *pellets* produzidos com essa metodologia apresentam estabilidade operacional por até 70 dias, obtendo produtividade de até 31g/L.h. Outro aspecto que o autor destaca é que o *pellet* tratado com $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ apresenta um aumento médio no diâmetro de 7,5%.

A melhoria nas características mecânicas do *pellet* tratado com $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ é uma condição de produção interessante, pois indica a capacidade de reaproveitamento do *pellet*. Além disso, devido as propriedades de eficiência fermentativa obtidas, os *pellets* produzidos possuem potencial de utilização industrial. Esses fatos estimularam a substituição do tratamento de tempo de cura pelo tratamento com solução de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, assim aliando um processo que apresenta elevado desempenho fermentativo e ainda boa resistência mecânica.

Baseando-se no planejamento varredura efetuado, propôs-se um novo planejamento experimental, onde o tratamento de tempo de cura foi substituído pelo tratamento das partículas com solução de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ e adicionou-se um novo fator, o diâmetro do *pellet*, na avaliação do rendimento fermentativo. Em princípio, o estudo do diâmetro como fator do planejamento tende a mostrar as possíveis limitações, restrições à transferência de massa e interações competitivas entre os fatores investigados no processo de fermentação de interesse.

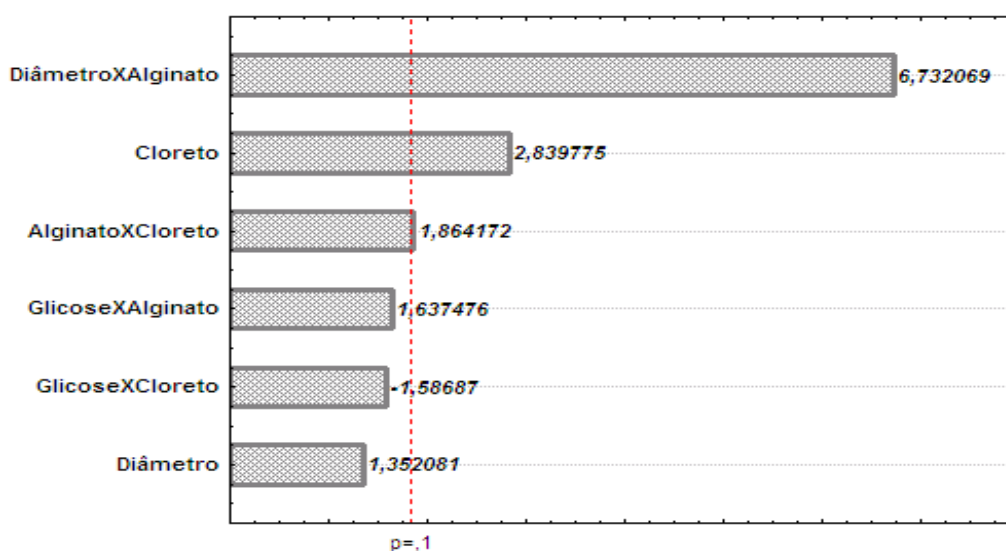
Na Tabela 18, apresentam-se os fatores, níveis e respostas do planejamento 2⁴ investigado. O objetivo do planejamento é encontrar valores de diâmetros que reúnem características desejáveis de difusividade aliadas a propriedades de resistência mecânica.

A análise do gráfico de Pareto do planejamento 2⁴, Figura 25, mostra que existe uma interação significativa entre o diâmetro do *pellet* e a concentração de alginato. Além disso, tem-se que o segundo fator mais importante é a concentração de cloreto de cálcio usada na imobilização, conforme já observado no planejamento varredura 2³. Esse fato deve-se a troca de íons entre a solução de cloreto de cálcio e alginato de sódio, para a geleificação do *pellet* em condições brandas. Destaca-se que os ensaios revelaram uma interação entre o cloreto de cálcio e o alginato de sódio não observada no planejamento 2³.

Tabela 18 – Planejamento fatorial tipo 2⁴ e a resposta obtida nos ensaios

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)	Rendimento Pasteur (%)
1	- 1	- 1	-1	-1	89,50
2	+1	- 1	-1	-1	87,76
3	- 1	+1	-1	-1	78,15
4	+1	+1	-1	-1	80,71
5	- 1	- 1	+1	-1	71,21
6	+1	- 1	+1	-1	79,57
7	- 1	+1	+1	-1	85,97
8	+1	+1	+1	-1	87,44
9	- 1	- 1	-1	+1	89,85
10	+1	- 1	-1	+1	84,71
11	- 1	+1	-1	+1	83,67
12	+1	+1	-1	+1	82,71
13	- 1	- 1	+1	+1	80,43
14	+1	- 1	+1	+1	84,63
15	- 1	+1	+1	+1	92,75
16	+1	+1	+1	+1	89,62

Novamente destaca-se que não é possível avaliar o efeito das variáveis de forma independente, e no planejamento 2⁴, onde a interação (alginato x cloreto) foi observada, tem-se que fazer uma consideração do efeito associado ao diâmetro do *pellet*, pois partículas maiores podem apresentar um processo de geleificação diferente daquele existente nas menores partículas.

**Figura 25** – Análise de Pareto para a fração 2⁴ do planejamento composto central com limite de confiança de 90%.

Com a determinação dos fatores mais significativos, torna-se necessário avaliar a região experimental definida para o planejamento. Essa análise foi implementada através da função *desirability* (função desejabilidade) e encontra-se detalhada na Figura 26. Ao se avaliar a função *desirability* com 40 ensaios de simulação tem-se os valores que maximizam a resposta dentro da faixa experimental proposta. Pela Figura 26, pode-se observar a “direção” do ótimo que o planejamento sugere. O valor máximo da *desirability* para o planejamento 2⁴ efetuado é de 0,975, com valores ótimos nos extremos superiores da região investigada nos experimentos. Este resultado indica que a faixa escolhida para o experimento 2⁴ não permite a identificação das condições ótimas para o experimento no interior da região de busca, pois planejamentos em 2 níveis não conseguem verificar essa situação.

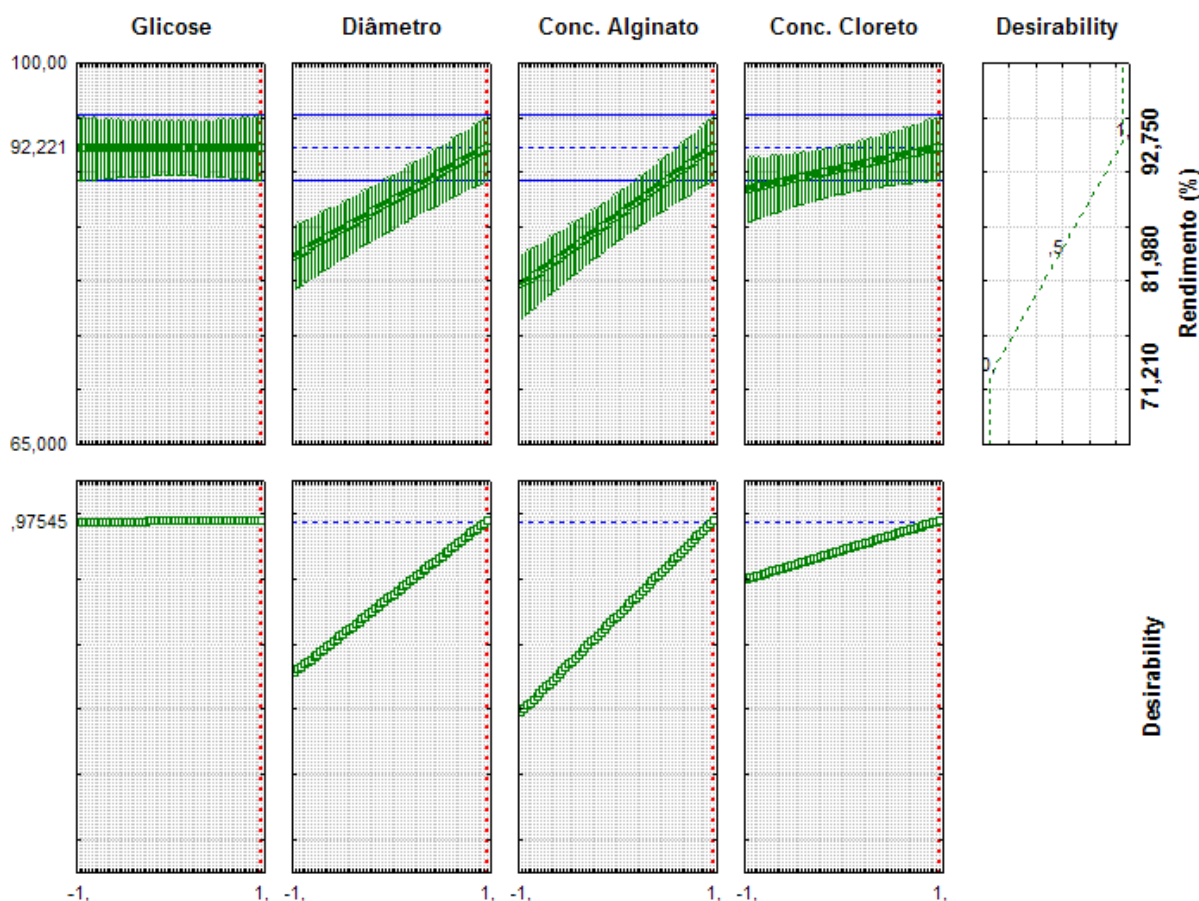


Figura 26 – Perfis para valores preditos e *desirability* para o planejamento 2⁴ (*desirability* global de 97,55%).

A Figura 27 apresenta a distribuição dos resíduos em relação ao modelo descrevendo o rendimento percentual na equação 14,

$$\text{Rendimento}(\%) = 84,29 + 0,8350 \cdot D + 1,7538 \cdot C + 1,0112 \cdot G \cdot A - 0,9800 \cdot G \cdot C + 4,1575 \cdot D \cdot A + 1,1512 \cdot A \cdot C \quad (14)$$

Onde D representa o diâmetro do *pellet*, G a concentração de glicose, A a concentração de alginato e C a concentração de cloreto. Da Figura 27 pode-se concluir que os resíduos seguem a distribuição normal e que 90% dos resíduos padronizados estão dentro do intervalo do nível superior (+1) e nível inferior (-1). Caso isso não ocorresse, ter-se-ia a presença de *outliers*.

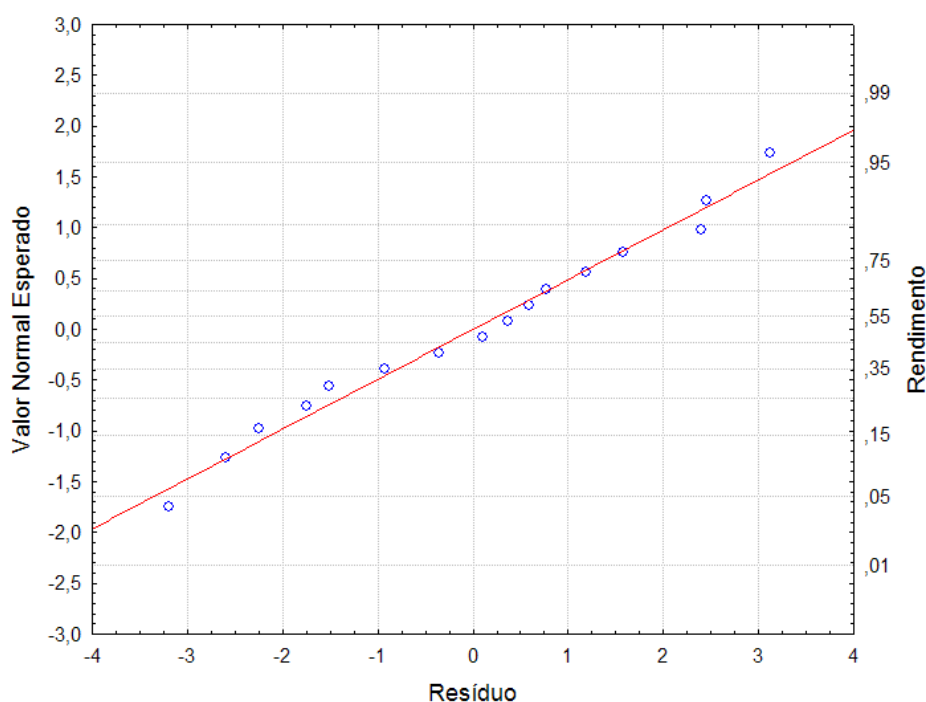


Figura 27 – Distribuição dos resíduos em função dos valores normais para o planejamento 2^4 .

A Figura 28 apresenta a distribuição dos resíduos em função dos valores preditos. Pode-se observar que os resíduos não apresentam tendência, o que caracteriza variância dos erros constante.

A Figura 29 apresenta as médias marginais do planejamento 2^4 , onde pode-se notar a interação dos fatores operando no nível inferior (-1) e superior (+1). Esta observação pode ser avaliada, a partir das inclinações das retas nos diagramas. Observa-se que quando as retas possuem inclinações próximas, a interação entre as variáveis não é significativa no nível de significância estudado e, no entanto, o cruzamento das mesmas mostra uma forte interação entre os fatores.

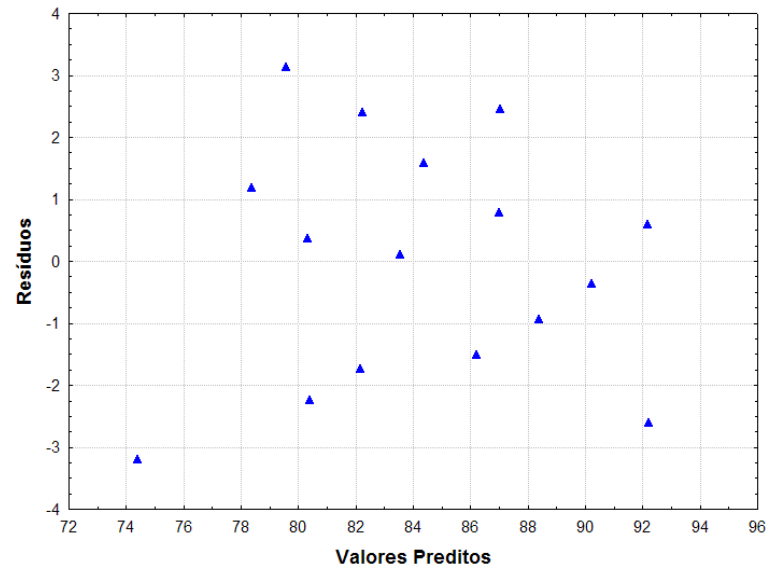


Figura 28 – Distribuição dos resíduos em função valor predito para o planejamento 2^4 .

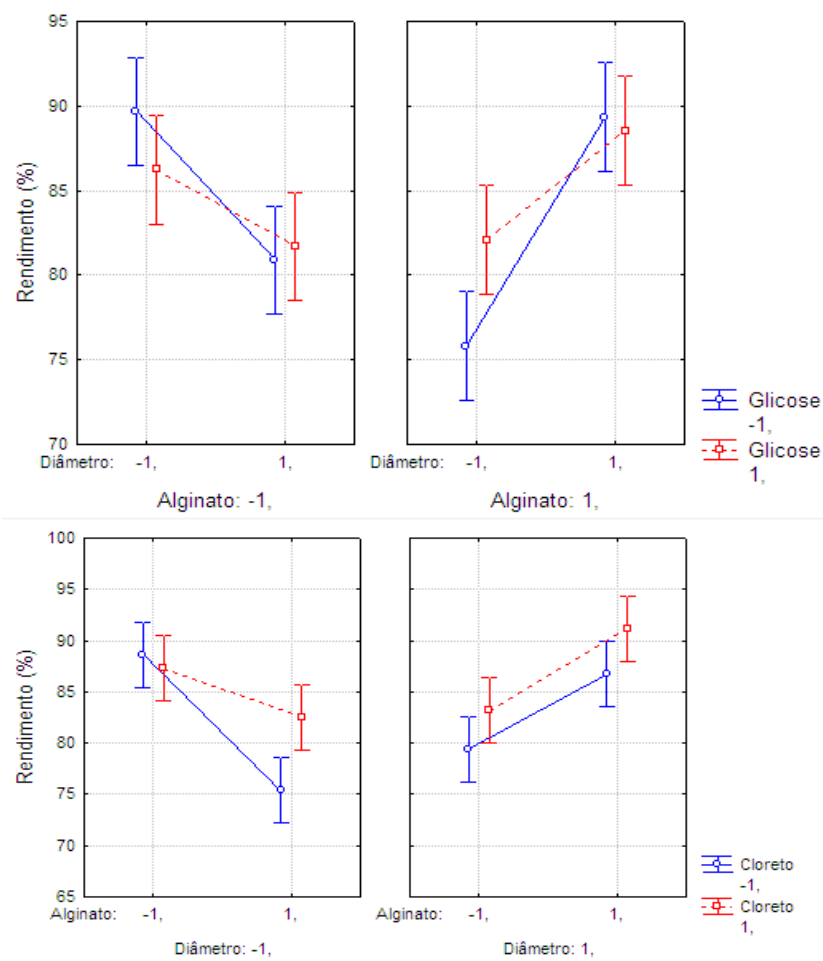


Figura 29 – Médias marginais para o planejamento 2^4 com nível de confiança de 90%.

Como o planejamento 3^{4-1} foi estruturado, tem-se a possibilidade de se estudar o

processo em duas etapas. Assim, ao se observar a disposição dos fatores na Tabela 18, conclui-se que os 16 ensaios realizados podem ser os mesmos ensaios usados para construir um planejamento do tipo 3^{4-1} (planejamento composto central). Na próxima seção, avalia-se o planejamento composto central complementando os experimentos da Tabela 18 de forma a atender as exigências do planejamento composto central do tipo 3^{4-1} com $\alpha=1,48$.

4.5- Planejamento composto central do tipo 3^{4-1}

Na Tabela 19 apresentam-se os fatores, níveis e respostas do planejamento 3^{4-1} investigado. O objetivo do planejamento é aumentar a região de análise realizada no planejamento 2^4 , ampliando-se o planejamento com experimentos axiais de *rotabilidade* $\alpha=1,48$ de forma a possibilitar a verificação dos termos quadráticos no modelo de regressão.

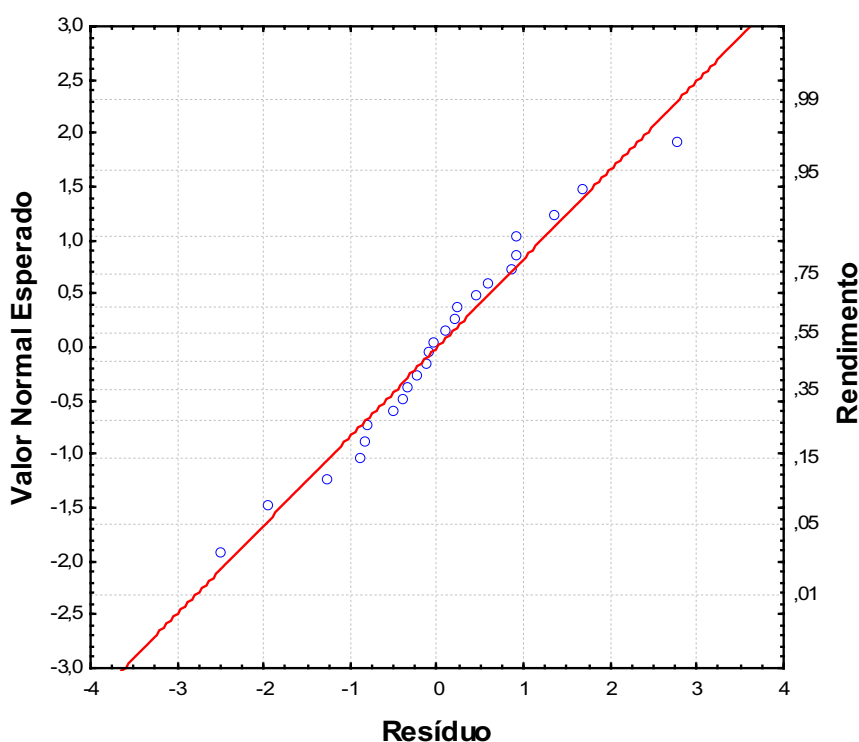


Figura 30 – Resíduos para o planejamento 3^{4-1} com nível de significância de 90%.

A Figura 30 indica que os resíduos para o modelo seguem aproximadamente a distribuição normal, caso isso não ocorresse, ter-se-ia a presença de *outliers* e seria então necessário à aplicação de teste para o reconhecimento da(s) anomalia(s) apresentada(s) nos resultados (por exemplo o teste de Grubbs). No caso em análise, não se identificou nenhum outlier segundo a metodologia six-sigma. A Figura 31, entretanto, mostra que a utilização dos

pontos axiais para a ampliação da área experimental a ser estudada revelou que o modelo para a região de estudo ampliada não representa de maneira satisfatória (quando comparado com o modelo obtido para o planejamento 2^4) o comportamento experimental, apresentando uma correlação/ajuste estatístico de aproximadamente 80%. Obviamente é uma redução significativa no nível de confiança, mas é necessário considerar que a região experimental ampliada possibilita que dois novos níveis de operação sejam acrescentados, totalizando assim uma proposta experimental para cinco níveis de operação. A adição dos níveis $+\alpha$ e $-\alpha$ na proposta do planejamento implica que é necessário confeccionar cinco diâmetros diferentes para a realização dos ensaios, além dos cinco níveis de operação para os novos fatores.

Tabela 19 – Planejamento fatorial tipo 3^{4-1} e a resposta obtida nos ensaios

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)	Rendimento Pasteur (%)
1	- 1	- 1	-1	-1	89,50
2	+1	- 1	-1	-1	87,76
3	- 1	+1	-1	-1	78,15
4	+1	+1	-1	-1	80,71
5	- 1	- 1	+1	-1	71,21
6	+1	- 1	+1	-1	79,57
7	- 1	+1	+1	-1	85,97
8	+1	+1	+1	-1	87,44
9	- 1	- 1	-1	+1	89,85
10	+1	- 1	-1	+1	84,71
11	- 1	+1	-1	+1	83,67
12	+1	+1	-1	+1	82,71
13	- 1	- 1	+1	+1	80,43
14	+1	- 1	+1	+1	84,63
15	- 1	+1	+1	+1	92,75
16	+1	+1	+1	+1	89,62
17	0	0	0	0	87,55
18	- α	0	0	0	93,13
19	+ α	0	0	0	93,34
20	0	- α	0	0	93,93
21	0	+ α	0	0	81,24
22	0	0	- α	0	86,03
23	0	0	+ α	0	73,40
24	0	0	0	- α	77,75
25	0	0	0	+ α	85,14

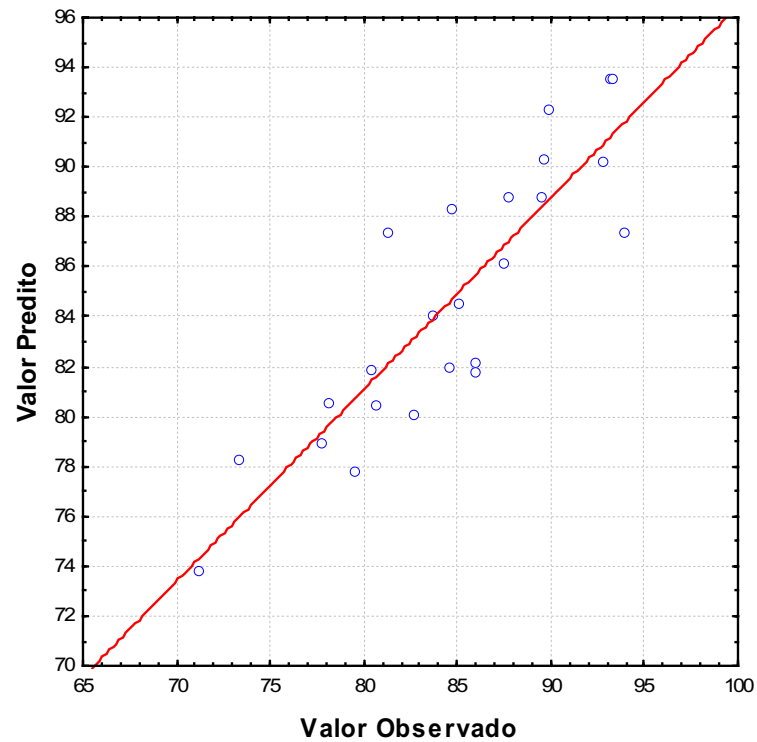


Figura 31 – Distribuição do valor predito versus valor observado para o planejamento 3^{4-1} .

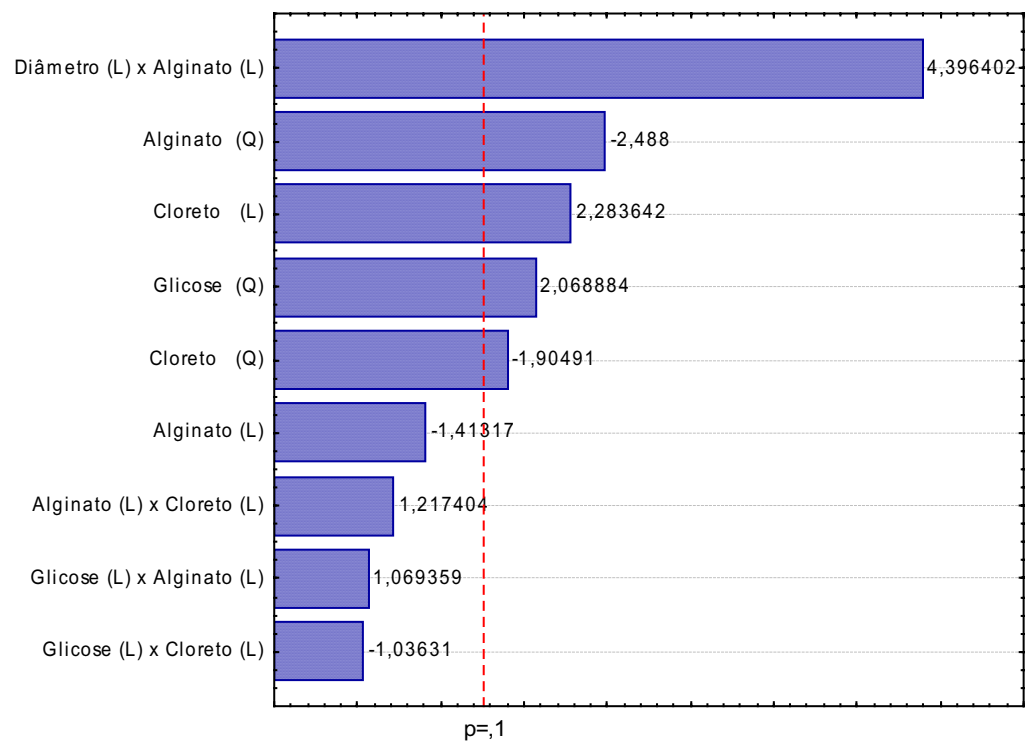


Figura 32 - Análise de Pareto para o planejamento 3^{4-1} com limite de confiança de 90%.
Efeitos dos fatores: Lineares(L), Quadráticos (Q).

O Diagrama de Pareto da Figura 32 confirma o fato de que não é possível avaliar o efeito das variáveis (fatores) de forma independente (a ação isolada de cada fator sem os devidos efeitos de interação).

A interação diâmetro do *pellet* x concentração de alginato de sódio foi observada como a mais importante e significativa para o nível de confiança de 90%. Outros fatores também tiveram significância estatística com seus termos lineares e quadráticos, como é possível observar na análise de Pareto.

É interessante destacar que todos fatores avaliados como principais e identificados no planejamento varredura (*screen*) mostraram-se novamente importantes e significativos estatisticamente.

As interações obtidas e fatores isolados abaixo do nível de confiança proposto foram desconsiderados para análise, a fim de se reduzir o número de termos expressivos na avaliação dos resíduos indicados nas Figuras 30 e 31.

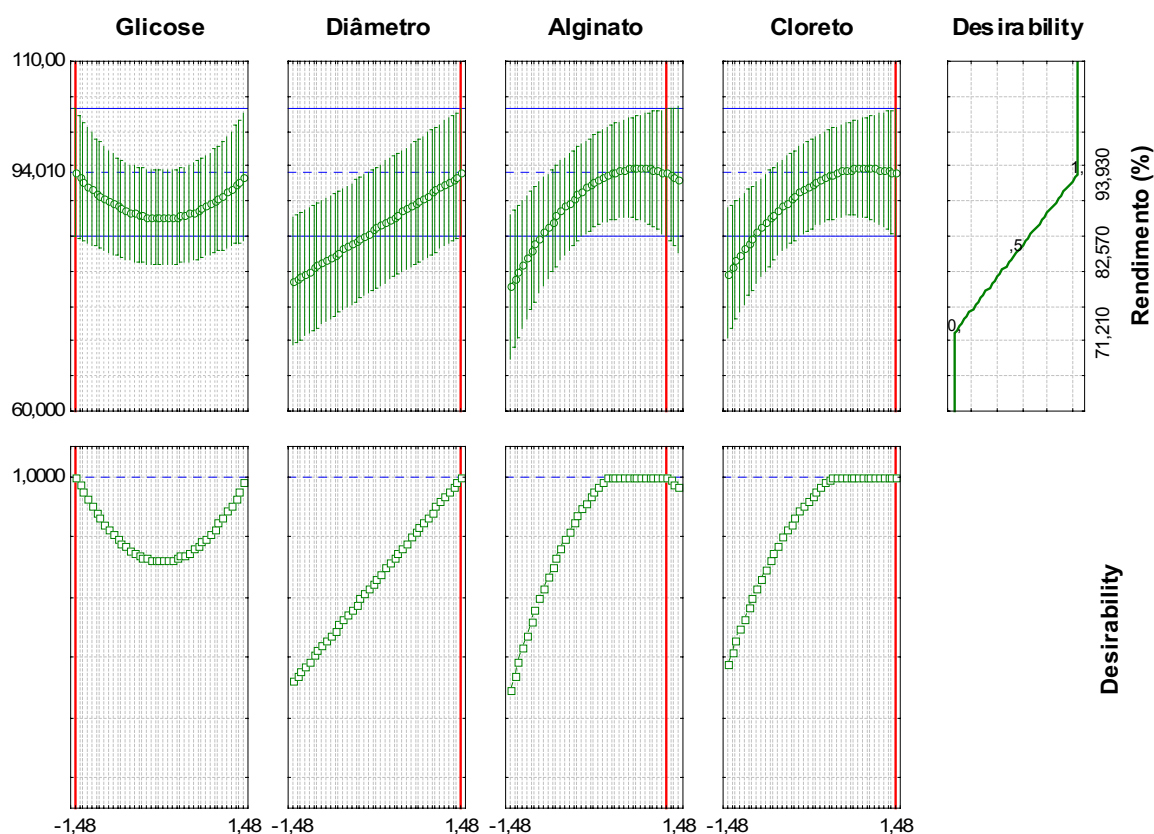


Figura 33 – Perfis para valores preditos otimizados e *desirability* para o planejamento 3^{4-1} (*desirability* global igual a 1).

Com a análise de Pareto, e portanto conhecendo-se os fatores mais significativos, foi

realizada a avaliação da região experimental definida para o planejamento composto central. Com o objetivo de se encontrar os valores que maximizam os fatores envolvidos utilizou-se a investigação da função *desirability* (função desejabilidade), com 40 ensaios de simulação, para a faixa de interesse. O resultado da análise encontra-se na Figura 33 que permite identificar os níveis dos fatores investigados que produzem máximo rendimento fermentativo na faixa investigada para os experimentos, ou seja, o ponto de máxima *desirability* que situa-se aproximadamente nos níveis de glicose, diâmetro, alginato de cálcio e cloreto de cálcio produzindo a resposta mais desejável para o rendimento e indicadas por *desirability* global 1 na Figura 33.

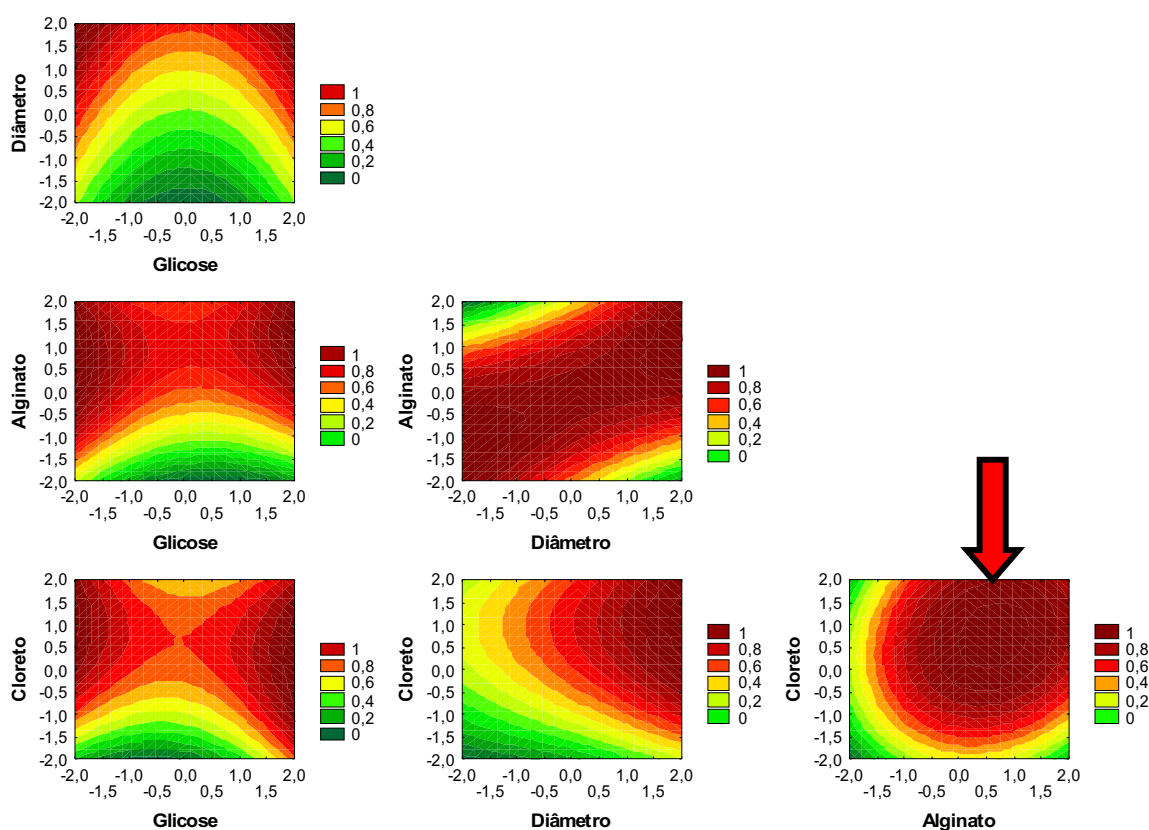


Figura 34 – Curvas de nível para *desirability* do planejamento 3^{4-1} : Valores ótimos com ajuste *spline*.

A Figura 34 mostra as diversas curvas de nível obtidas para a função *desirability* onde é possível verificar as regiões que levam aos valores ótimos de *desirability*. As combinações dos fatores mais importantes foram apresentadas em função do valor da *desirability* global para uma melhor visualização das regiões de interesse. Dessa maneira, é possível fazer inferências rápidas as diversas análises disponíveis como, por exemplo, verificar a região de

desirability igual a 1 para os fatores concentração de cloreto de cálcio e concentração de alginato de cálcio, conforme indicado pela seta na Figura 34.

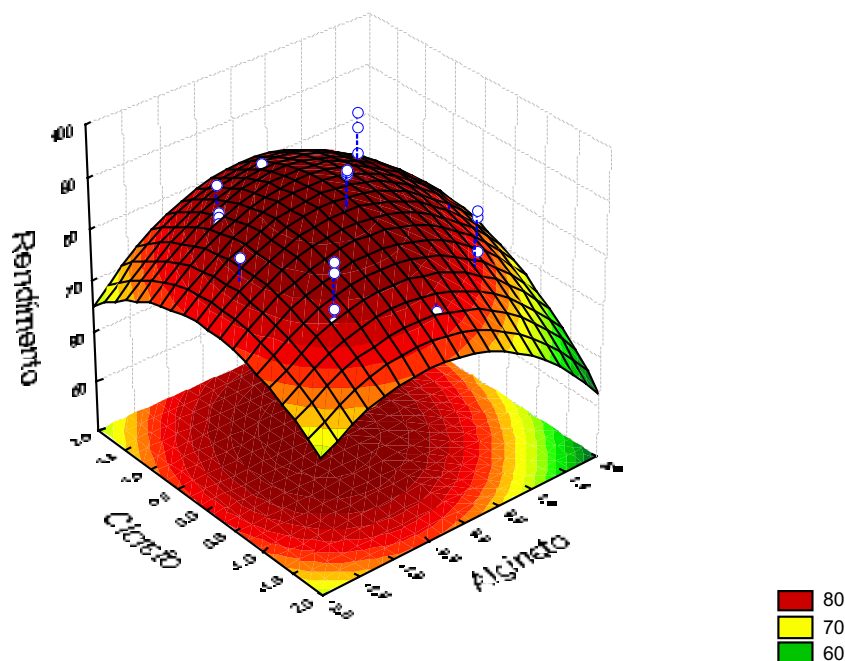


Figura 35 – Região de máximo rendimento como função das concentrações de cloreto de cálcio e alginato de sódio no planejamento 3^{4-1} .

A Figura 35 apresenta a região de máximo rendimento fermentativo para as faixas de concentrações de cloreto de cálcio e alginato de cálcio investigadas, confirmando a região já indicada na análise de *desirability*. Outro aspecto a ser destacado é que o algoritmo de *Pipel* utilizado para projetar o experimento varredura (*screen*) foi capaz de propor uma região inicial consistente para a realização dos experimentos, uma vez que a investigação posterior indicou a existência de máximo rendimento fermentativo na região experimental estudada e sob as condições propostas.

A avaliação da Figura 33 mostra um aspecto interessante para a glicose, pois este fator não tem ponto máximo e mínimo no interior da região investigada, possui um ponto chamado de ponto de sela. Além disso, pode verificar na Figura 33 que a concentração elevada de alginato de sódio influi de maneira direta nos mecanismos de transferência de massa e difusividade do *pellet* e a partir dessa informação é possível especular-se que essa influencia também aconteça no coeficiente de partição das esferas e nesse caso, estudos mais detalhados devam ser realizados com o objetivo de se obter uma melhor compreensão desses

mecanismos, e por fim viabilizar o desenvolvimento de modelos matemáticos que descrevam o comportamento de difusividade e transferência de massa no interior do gel.

Em uma avaliação de eficiência fermentativa para os experimentos realizados, observa-se que o aumento do diâmetro do *pellet* reduziu a eficiência fermentativa, excetuando-se naqueles sistemas operando no nível superior de concentração de alginato de cálcio, onde tal aumento no diâmetro leva a uma elevação no desempenho fermentativo. Esse fato pode está relacionado ao efeito de interação entre diâmetro do *pellet* e concentração de alginato na obtenção das respostas dos ensaios, conforme apresentado na Figura 32. De outra forma, a avaliação do efeito da concentração de alginato de sódio na eficiência fermentativa indica que para as partículas desenvolvidas nos níveis superiores de diâmetros tem os seus rendimentos fermentativos superiores na faixa de ensaios investigada. Essa observação não é intuitiva, uma vez que uma mesma massa de partículas de menores diâmetros possui maior área superficial total disponível a transferência de massa do que aquela com maiores diâmetros. É fato que, na análise realizada, outros efeitos importantes merecem uma maior investigação, tal como o efeito da fluidodinâmica de mistura e suspensão mecânica dos *pellets* no meio agitado, uma vez que partículas maiores tendem a se depositar mais facilmente na parte inferior do bioreator.

Segundo os resultados apresentados na Tabela 19, tem-se que o melhor rendimento obtido foi da ordem de 93,93% em relação ao rendimento Pasteur. Esse valor apresenta um desempenho significativo e mostra que a proposta de imobilização é promissora do ponto de vista técnico e operacional, apresentando-se como uma alternativa competitiva e eficaz.

LUONG(1985) citado por BORZANI *et al.*, 2001, utilizando células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em partículas de gel hidrofílico de *K-carragenana* e operando em leito fluidizado, com glicose como substrato afirma que na concentração de glicose igual a 10g/L, os efeitos difusivos eram desprezíveis se o diâmetro da partícula fosse igual ou menor que 1mm, com concentração celular no suporte/matriz igual a 27,6g/L. Nessas condições operacionais a velocidade reacional se igualava a velocidade máxima possível. Por outro lado, partículas que apresentavam concentração celular igual a 27,6g/L possuíam a velocidade reacional máxima possível inferior e o mesmo ainda afirma que nessa situação, partículas maiores que 3mm de diâmetro tem desempenho inferior.

FERREIRA (1986), utilizando *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em carragenato, com esferas em torno de 4mm de diâmetro e utilizando a glicose como substrato, afirma que os valores do coeficiente de partição independem das concentrações de etanol e glicose no meio e que o efeito mais pronunciado é obtido em função da concentração de microrganismos

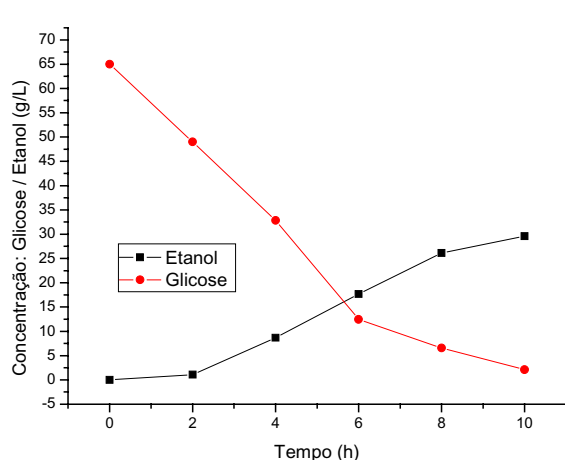
no gel (Massa de microorganismo / Massa de gel = 0,13). Dessa maneira é válido considerar se o diâmetro e a concentração celular tem um efeito de interação significativo ou não, pois segundo o autor o coeficiente de partição para o etanol tende a 1, ou seja a concentração dentro do gel e no leito tem o mesmo valor, enquanto que para a glicose o coeficiente fica em torno de 0,73. Pelos resultados obtidos, acredita-se que existe uma condição de imobilização que otimiza esses valores e que diâmetros maiores realmente dificultam a transferência de massa, se considerados isoladamente, mas a interação da concentração do gel e o diâmetro mostra que valores de diâmetro (4 mm) próximos aos valores relatados por FERREIRA (1986) tem apresentado bons resultados. Outro aspecto a se destacar nesse trabalho, é que dada a agitação do sistema, a transferência de massa foi significativamente melhorada, justificativa essa para a proposição acima.

NAJAFPOUR *et al.*, (2003) utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio em reator tipo batelada com concentração de substrato de 50g/L, obteve uma produtividade média de 2,8g/L.h, sendo esse desempenho ligeiramente superior ao encontrado nos ensaios dessa dissertação, tendo em vista que na melhor condição partiu-se de uma concentração inicial de glicose de 60g/L e atingindo uma produtividade de 3,2g/L.h. NAJAFPOUR *et al.*, (2003) aponta as seguintes características de imobilização apresentadas na Tabela 20.

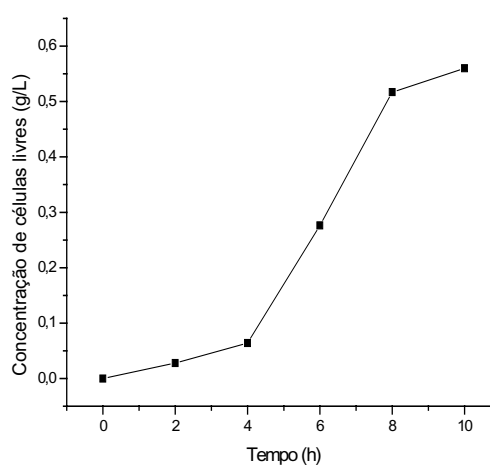
Tabela 20 - Propriedades do alginato de cálcio (NAJAFPOUR *et al.*, 2003)

Características gerais do processo de imobilização				
Concentração de alginato (% p/ v)	1,5	2	3	4,5
Diâmetro dos <i>pellets</i> (mm)	5	4,9-5	4,8-4,9	4,5
Expansão do diâmetro após 72h (%)	50-60	25-30	20-25	Sem expansão
Problemas de difusão	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Talvez existam
Atividade Celular	Ativa	Totalmente ativa	Totalmente ativa	Parcialmente Ativa
Aparência física	Facilmente quebrável	Flexível e forte o suficiente para estabilidade	Flexível e forte	Muito forte
Estabilidade	Sem estabilidade	Boa estabilidade	Estável e rígida	Muito rígida

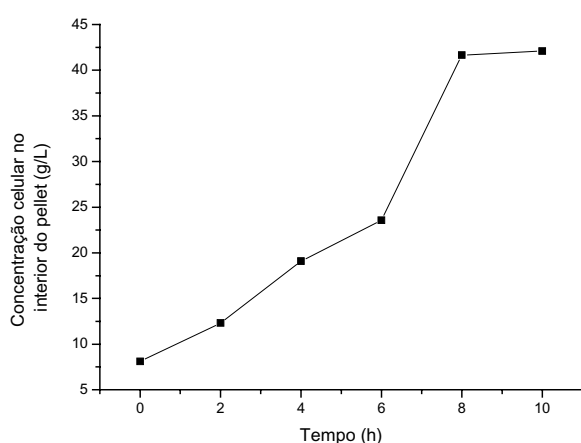
Pela Tabela 20, relativa aos trabalhos de NAJAFPOUR *et al.* (2003), observa-se que concentrações baixas de alginato não tem estabilidade suficiente para condução do processo e altas concentrações mostram que podem existir problemas relacionados a transferência de massa. Pouco pode-se concluir a respeito dos diâmetros, pois a faixa de estudos foi praticamente a mesma em todos os ensaios (Média = 5mm) e para a faixa estudada o autor afirma que não encontrou problemas de difusividade. Essa faixa também foi estudada no presente trabalho e é indicada como ótima pela função desejabilidade.



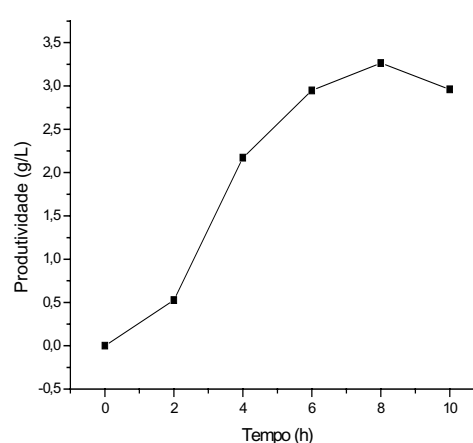
a) Consumo de glicose e produção de etanol



b) Crescimento de células no meio de fermentação



c) Crescimento celular no interior da matriz porosa



d) Produtividade do processo

Figura 36 - Cinética e produtividade de fermentação do melhor ensaio obtido (nº 20, vide Apêndice).

A Figura 36 apresenta o desempenho fermentativo obtido no melhor ensaio realizado no planejamento 3^{4-1} , onde se representa graficamente as diversas curvas experimentais indicadas respectivamente nos gráficos: crescimento de células livres no meio fermentativo, crescimento celular no interior da matriz, consumo de glicose e produção de etanol.

Pode-se observar que a técnica de imobilização foi eficiente, pois após 10 horas de fermentação a razão entre células livres / imobilizadas foi de aproximadamente 1,4% e após 8 horas de fermentação foi obtida a produtividade máxima média de 3,0g/L.h, com uma concentração celular de 42g/L no interior do *pellet*.

O estudo de imobilização das partículas permite mostrar que nas condições de maior produtividade, a relação percentual das concentrações de células livres e concentração de células imobilizadas é uma medida da eficiência de imobilização, assim quanto menor for esse número, melhor será a imobilização. É também claro que uma imobilização eficiente não pode levar a um decaimento das características de produtividade associadas ao sistema. Assim, fator de eficiência de imobilização menor que 2% com níveis de produtividade superiores a 92% do rendimento Pasteur são altamente significativos para esses sistemas com partículas imobilizadas em agitação ou em leito fluidizado. Nesse estudo, após 10h de produção, os níveis de retenção situaram-se sempre da ordem de 1,0% a 1,5%.

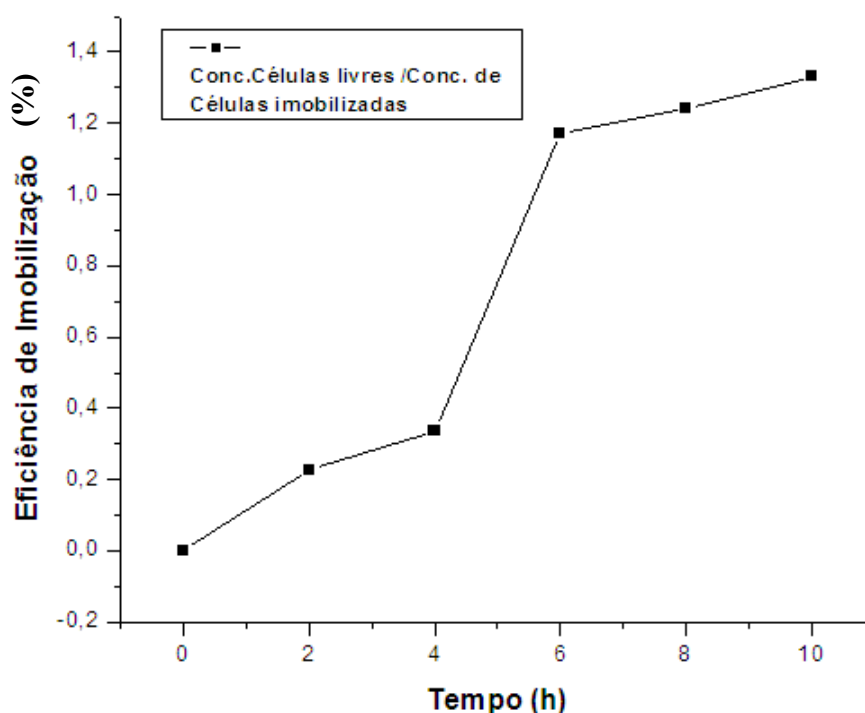


Figura 37- Relação percentual entre concentração de células livres e células imobilizadas.

A relação percentual entre células livres e imobilizadas apresentada no gráfico da Figura 37, mostra que a técnica de imobilização foi eficiente do ponto de vista de retenção celular, evidenciando dessa maneira que a capacidade de retenção do alginato foi significativamente melhorada com a utilização do $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$.

A Figura 38 apresenta as partículas utilizadas nos experimentos. A Figura 38a apresenta as partículas sem o tratamento de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ representando partículas do tipo A após 5h de utilização, enquanto a Figura 38b apresenta as partículas do tipo B coletadas durante uma fermentação para determinação da concentração média de células no interior das mesmas.

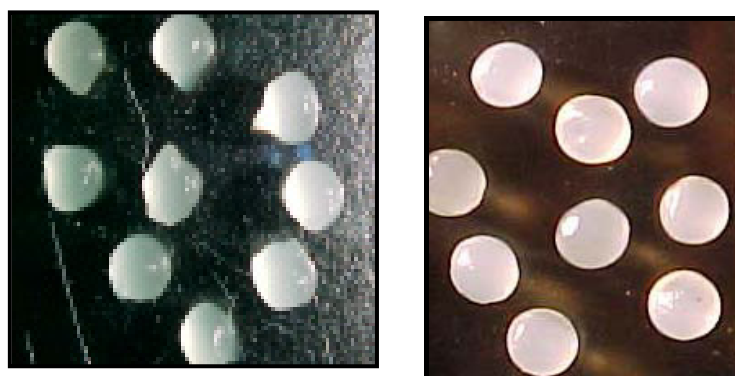


Figura 38 – Partículas de alginato de cálcio com células imobilizadas:
(a) *Pellet* do tipo A; (b) *Pellet* do tipo B.

A Tabela 21 apresenta uma breve comparação das características principais das partículas do tipo A (preparadas com tempo de cura) e do tipo B (preparadas com a utilização de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$) observadas nas faixas de experimentos realizadas.

Tabela 21 – Características aparentes das partículas investigadas

Características	Pellet A	Pellet B
Estabilidade mecânica	Pouco estável	Muito estável
Problemas de difusão	Não observado	Pequeno
Atividade celular	Ativa	Ativa
Aparência	Alongada após uso	Flexível e forte
Diâmetro Investigado	4mm	(3,5-4,9)mm

As características de estabilidade mecânica das partículas e as aparências das mesmas foram avaliadas conforme segue: *pellet* do tipo A: avaliação após 5h de fermentação em bioreator agitado operando em batelada; *pellet* do tipo B após 10h de fermentação sob as mesmas condições de agitação. As Figuras 38a e 38b, ilustram as diferenças de características aparentes das partículas. A avaliação da atividade celular deu-se pelo acompanhamento da produção de etanol desses sistemas, enquanto as características de difusão foram avaliadas para níveis de agitação e diâmetros distintos para as partículas e a diferença comparadas a produção do sistema para uma condição de células livres. Nesse sentido, para uma melhor aprofundamento dessa análise um estudo de partição para o sistema de fermentação deve ser feito.

Na próxima seção apresentam-se alguns aspectos desenvolvidos na modelagem do fermentador investigado.

4.6 – Aspectos introdutórios para a modelagem do fermentador.

A cinética de transformação para um sistema com células imobilizadas é diferente daquela resultante de células livre. Existem vários efeitos que contribuem para essas diferenças sendo a modificação de ação metabólica e a existência de efeitos de resistência à transferência de massa os fatores mais importantes dessa diferença. O balanço de massa para o substrato dentro de uma partícula esférica pode ser escrito na forma unidimensional conforme:

$$\frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left(r^2 D \frac{dS}{dr} \right) = R_s \quad (15)$$

Onde R_s é a taxa de transformação do substrato por unidade de volume na partícula.

As condições de contorno para o problema são dadas por:

Em:

$$\begin{aligned} r=0, \quad \frac{dS}{dr} &= 0 \\ r=R, \quad D \frac{dS}{dr} &= k_L (S_o - S) \end{aligned} \quad (16)$$

Onde:

S	Substrato consumido
S_0	Substrato inicial
r	Posição radial no <i>pellet</i>
R	Raio do <i>pellet</i> (Superfície da partícula)
k_L	Constantes de inibição (Monod)
D	Coefficiente de difusividade

Escrevendo o modelo com variáveis adimensionalizadas:

$$\varphi = \frac{S}{S_0} \quad (17)$$

$$\xi = \frac{r}{R} \quad (18)$$

Tem-se o modelo adimensional e com D constante,

$$\frac{1}{\xi^2} \frac{d}{d\xi} \left(\xi^2 \frac{d\varphi}{d\xi} \right) = \frac{R^2}{DS_0} R_\varphi \quad (19)$$

As condições de contorno na forma adimensional são,

$$\text{Em } \xi = 0, \quad \frac{d\varphi}{d\xi} = 0 \quad (20)$$

$$\text{Em } \xi = 1, \quad \frac{d\varphi}{d\xi} = \frac{k_L R}{D} (1 - \varphi) = Sh(1 - \varphi) \quad (21)$$

A simulação computacional desse modelo é simples e pode ser feita utilizando uma metodologia de discretização acoplada a um algoritmo para solução de sistemas de equações não lineares. Nesse trabalho utilizou-se a técnica de colocação ortogonal com polinômios de Jacobi (VILLADSEN e MICHELSEN, 1978) em um ambiente Scilab. A investigação preliminar utilizou-se uma cinética do tipo Michaelis-Menten dada pela expressão de taxa:

$$R_s = \frac{kC_x S}{K_m + S} \quad (22)$$

A dificuldade de se medir a concentração de glicose (S) dentro da partícula fez com que se escolhesse uma abordagem paramétrica de investigação preliminar onde investiga-se o efeito dos parâmetros que descrevem o modelo. Nesse aspecto, busca-se valores que possibilitem compreender o efeito a ser verificado experimentalmente em trabalhos futuros. O sistema investigado, com $\gamma = \frac{S_o}{K_m}$ e vários valores de módulo de Thiele, $\phi^2 = \frac{KCR^2}{DK_m}$, apresenta o comportamento descrito na Figura 39. Merece destaque o fato de que como a concentração de células aumenta com o tempo, a exploração do comportamento desse sistema para uma faixa de valores do módulo de Thiele permite esboçar o comportamento que esse modelo descreve para o comportamento do sistema. De forma análoga, o raio da partícula possui influência quadrática nesse comportamento.

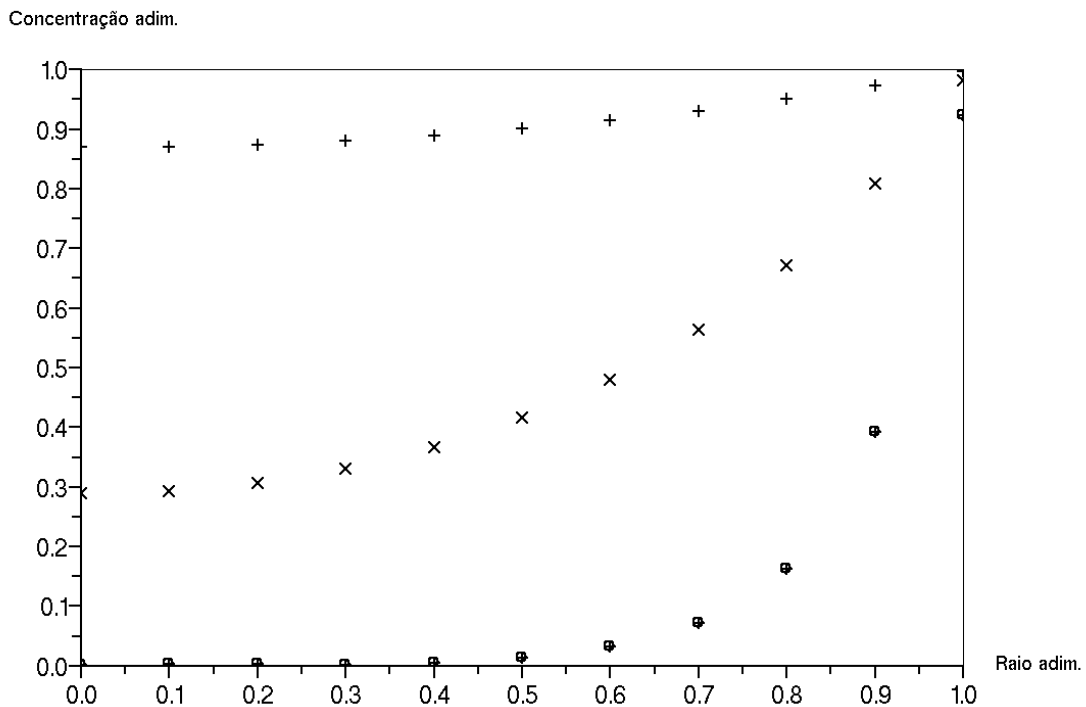


Figura 39 - Comportamento estacionário de uma partícula com 5 pontos de colocação internos, polinômio de Jacobi com $\alpha = 1$, $\beta = 1$, $Sh=100$, $\gamma = 0,2$ e $\phi^2 = [1(+), 10(x), 100(o)]$.

O módulo de Thiele apresenta explicitamente, para uma partícula esférica com raio fixo, uma proporcionalidade direta com a concentração de células, indicando assim que durante a operação do sistema o comportamento qualitativo que se espera no tempo seja algo similar ao resultado mostrado na Figura 39, considerando comportamento estacionário com três níveis de concentração de células na partícula. Pode-se, também, investigar o efeito da resistência externa à transferência de massa. Nesse trabalho, procurou-se minimizar esses efeitos com uma agitação eficiente no sistema.

O sistema operando com células imobilizadas apresenta menores problemas em relação a inibição pelo substrato. Mesmo assim, estudos do metabolismo das células imobilizadas e avaliação dos mecanismos difusivos no interior de uma partícula num processo de fermentação com células imobilizadas merecem ainda a atenção futura. Procurando explorar os efeitos que tal descrição de modelo pode apresentar, faz-se na Figura 40 uma análise com uma cinética com inibição pelo substrato e expressão de taxa dada por:

$$R_s = \frac{kCS}{(K_m + S)(1 + S/K_i)} \quad (23)$$

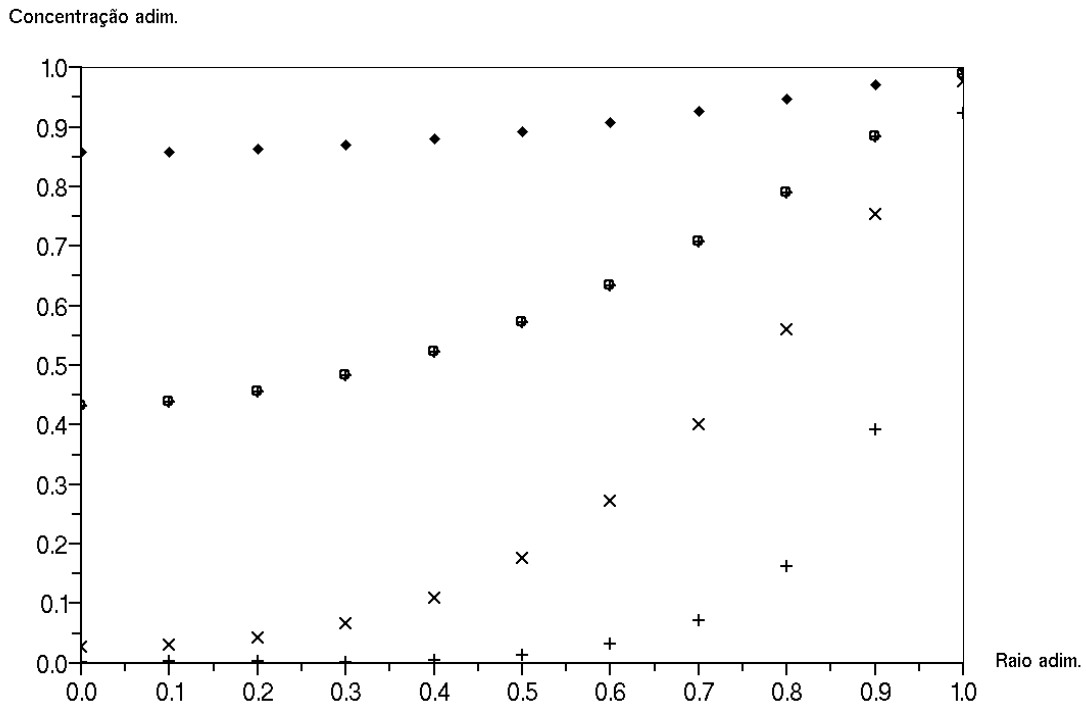


Figura 40 - Comportamento estacionário de uma partícula com 5 pontos de colocação internos, polinômio de Jacobi com $\alpha = 1$, $\beta = 1$. $Sh=100$, $\gamma = 0,2$, $\phi^2=100$ e $\gamma_2=[0(+), 10(x), 25(●), 100(♦)]$.

A simulação para elevados níveis de módulos de Thiele faz com que o efeito de inibição pelo substrato seja entendido à medida que o parâmetro de inibição $\gamma_2 = \frac{S_o}{K_i}$ aumenta, ou seja, com o aumento da inibição têm-se a esperada redução na queda de concentração do substrato dentro da partícula. É fato também que com o crescimento celular, os mecanismos difusivos se alteram e considerar que o coeficiente de difusividade interno é constante pode não representar bem a realidade. De acordo com FERREIRA (1986), os coeficientes de partição em partículas de gel contendo *Saccharomyces cerevisiae* são funções da concentração celular, e possuem a tendência de redução com o aumento da concentração de células no interior da partícula.

A consideração de uma cinética com inibição pelo produto segue mesmos padrões da inibição pelo substrato e fornece uma expressão do tipo das Equações 24 e 25 para inibição não competitiva e competitiva, respectivamente.

$$R_s = \frac{kC_x S}{(K_m + S)(1 + P / K_i)} \quad (24)$$

$$R_s = \frac{kC_x S}{K_m + S + (K_m / K_i) P} \quad (25)$$

No caso da inibição pelo substrato, exige-se que o balanço de massa para o produto também seja feito na partícula. Assim, o modelo descrevendo o sistema tem a forma:

$$\frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left(r^2 D \frac{dS}{dr} \right) = R_s \text{ e } \frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left(r^2 D_p \frac{dP}{dr} \right) = -R_s \quad (26)$$

Onde D_p é a difusividade do etanol na partícula. Escrevendo o sistema na forma adimensionalizada, com:

$$\theta = \frac{P}{S_o} \text{ e } \delta = \frac{D_p}{D}, \text{ têm-se:}$$

$$\frac{1}{\xi^2} \frac{d}{d\xi} \left(\xi^2 \frac{d\varphi}{d\xi} \right) = \frac{R^2}{DS_o} R_{\varphi\theta} \text{ e } \frac{1}{\xi^2} \frac{d}{d\xi} \left(\xi^2 \frac{d\theta}{d\xi} \right) = -\frac{R^2}{DS_o} \frac{1}{\delta} R_{\varphi\theta} \quad (27)$$

As condições de contorno na forma adimensional são,

$$\text{Em } \xi = 0, \frac{d\varphi}{d\xi} = 0 \text{ e } \frac{d\theta}{d\xi} = 0 \quad (28)$$

$$\text{Em } \xi = 1, \frac{d\varphi}{d\xi} = \frac{k_L R}{D}(1 - \varphi) = Sh(1 - \varphi) \quad (29)$$

$$\text{e } \frac{d\theta}{d\xi} = \frac{k_L R}{D\delta}(\theta_o - \theta) = \frac{Sh}{\delta}(\theta_o - \theta) \quad (30)$$

onde $\theta_o = \frac{P_o}{S_o}$.

Somando-se as equações dos modelos pode-se mostrar que:

$$\theta = \theta_o + \frac{1 - \varphi}{\delta} \quad (31)$$

Isso permite que modelo seja resolvido apenas substituindo θ na expressão da taxa e resolve-se o balanço de massa para o substrato. A resolução desse sistema para o caso em que a concentração do produto na fase líquida é nula, $\gamma_3 = \frac{S_o}{K_I}$ é investigada numa faixa inibitória de 0 a 100 e $\delta = 1$. A Figura 41 apresenta o comportamento para o substrato.

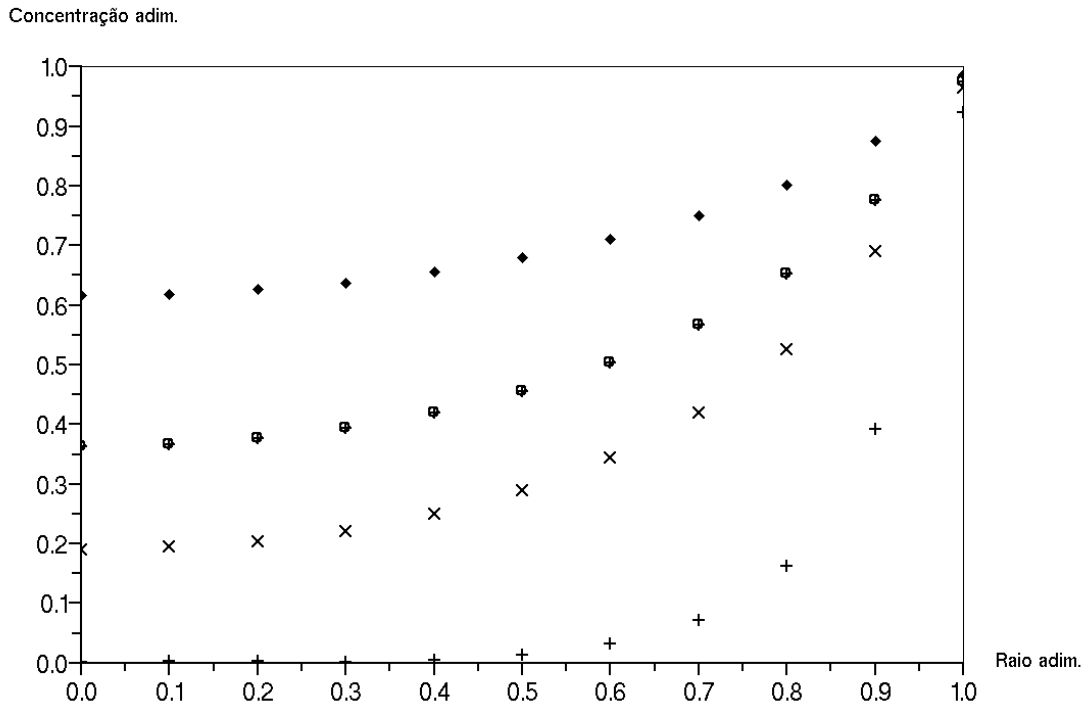


Figura 41- Comportamento estacionário de uma partícula com inibição pelo produto de forma não competitiva utilizando 5 pontos de colocação internos, polinômios de Jacobi com $\alpha = 1$, $\beta = 1$, $\gamma = 0,2$, $Sh=100$, $\phi^2=100$ e $\gamma_3=[0(+), 10(x), 25(\bullet), 100(\diamond)]$.

A análise apresentada não considera casos em que a difusividade é função da concentração. Entretanto, essa consideração pode ser facilmente implementada nos sistemas investigados nessa seção se tal comportamento constitutivo for conhecido.

Da avaliação preliminar do comportamento estacionário da concentração de substrato dentro de uma partícula esférica pode-se inferir que o comportamento quando o número de células precisa também ser considerado não é de todo simples para uma descrição transiente. Abordando-se o reator de mistura investigado (e considerado em mistura perfeita), pode-se escrever o balanço de células, etanol e glicose conforme seguem:

Balanço de células livres no fermentador:

$$\frac{dC_L}{dt} = R_{ef}, \quad C_L(0) = \varepsilon \quad (32)$$

onde R_{ef} é a taxa efetiva de crescimento celular no exterior da partícula com células imobilizadas e ε a concentração inicial de células livres ($\ll 1$ g/L). Uma expressão para R_{ef} para uma cinética tipo Monod pode ser dada por:

$$R_{ef} = \frac{\mu_{\max} C_{gf}}{K_m + C_{gf}} C_L + K_p C_{cd}^n, \quad (33)$$

Assim, tem-se:

$$\frac{dC_L}{dt} = \frac{\mu_{\max} C_{gf}}{K_m + C_{gf}} C_L + K_p C_{cd}^n \quad (34)$$

onde;

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>
$\mu_{\max}$	<i>Velocidade específica máxima</i>

Na Equação 34, a primeira parcela é resultante do crescimento celular das células livres e a segunda parcela origina-se do desprendimento da própria partícula, sendo K_p e n constantes que dependem fundamentalmente do processo utilizado para a confecção da partícula e da operação do fermentador (resistência a estresse, etc.). Pelos resultados experimentais apresentados nesse estudo, que não reutilizou partículas em fermentações subseqüentes, a contribuição do número de células por desagregação de partículas pode ser negligenciada, mantidos os níveis operacionais conforme investigado.

A avaliação do comportamento do substrato e produto para o sistema pode ser descrita pelos balanços:

Balanço de Etanol:

$$\frac{VdC_{ef}}{dt} = Y_{p/c} \frac{\mu_{\max} C_{gf}}{K_m + C_{gf}} C_L V + \dot{m}_{ef} ; C_{ef}(0) = 0 \quad (35)$$

onde $\dot{m}_{ef}$ é a quantidade de etanol, gerada no interior da partícula, e que foi transferido para a fase *bulk* do fermentador. Esse termo pode ser descrito conforme comumente feito na literatura de transferência de massa, nesse caso, $\dot{m}_{ef}$ é proporcional a $(P - P_o)$, ou seja $\dot{m}_{ef} \propto (P - P_o)$.

Balanço de Glicose:

$$\frac{VdC_{gf}}{dt} = -Y_{S/c} \frac{\mu_{\max} C_{gf}}{K_m + C_{gf}} C_L V - \dot{m}_{gf}; C_{ef}(0) = C_{go} \quad (36)$$

onde $\dot{m}_{gf}$ é a quantidade de glicose consumida no interior da partícula, e que foi retirada da fase *bulk* do fermentador, nesse caso $\dot{m}_{gf} \propto (C_{gf} - S)$, $C_{gf} = S_o$.

Evidentemente o modelo pode ser facilmente ajustado para considerar expressões cinéticas de fermentação de glicose com *Saccharomyces cerevisiae* mais complexas. Os balanços dentro da partícula podem ser expressos por:

Balanço dentro da Partícula

$$\frac{\partial S}{\partial t} = \frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left(r^2 D \frac{dS}{dr} \right) - R_S \quad (37)$$

$$\frac{\partial P}{\partial t} = \frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left(r^2 D_p \frac{dP}{dr} \right) + R_S \quad (38)$$

Onde S e P são as concentrações de glicose e etanol no interior da partícula. As condições de contorno para caso de coeficientes de transferência de massa nas vizinhanças externas à partícula dadas por k_L , são descritas por:

$$\text{Em } r=0, \quad \frac{dS}{dr} = \frac{dP}{dr} = 0 \quad (39)$$

$$\text{Em } r=R, \quad D \frac{dS}{dr} = k_L (S_o - S) \text{ e } D_p \frac{dP}{dr} = k_L (P_o - P) \quad (40)$$

O conjunto de equações descrevendo o modelo desse sistema, embora não seja simples, ainda é tratável de um ponto de vista numérico, necessitando, entretanto, de parâmetros cinéticos, de operação e internos à partícula. A simulação e validação do modelo proposto, bem como a avaliação dos resultados experimentais, serão deixadas como sugestão de continuidade desse trabalho.

CAPÍTULO 05 – CONCLUSÕES

O uso de técnicas estatísticas para a condução dos ensaios, apresentou-se como uma ferramenta robusta para a avaliação do processo fermentativo, permitindo a avaliação de fatores que não são observáveis ou mensuráveis diretamente para sistemas complexos e as interações entre eles.

Dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- A concentração de alginato de sódio influi diretamente no rendimento fermentativo, como demonstrado no planejamento *Screen*. O ensaio realizado na condição em que a concentração de alginato, o tempo de cura e a concentração de cloreto operaram nos níveis: 1%, 0h, 0,2M , respectivamente, produziram o melhor rendimento observado, embora com *pellets* pouco estáveis.
- A alteração da concentração de cloreto de cálcio influi no rendimento fermentativo, de forma não isolada e sim combinada com o tempo de cura. O aumento da concentração de cloreto indica que em tempos de cura relativamente curtos, existe a necessidade de saturação da solução de cloreto. Nos experimentos do planejamento 2³, verificou-se que as partículas eram afetadas demasiadamente para os níveis de concentração de glicose investigados, mesmo para elevadas concentrações de cloreto de cálcio e tempos de cura de 24 horas. Essa constatação levou a mudança no procedimento de preparação das partículas com a adoção de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, que levou a partículas de maior resistência mecânica e com eficiente imobilização de células no seu interior, mesmo para partículas com 4,9mm de diâmetro e sob condições de suspensão mantida com agitação mecânica.
- O alginato de sódio mostrou-se isoladamente importante ou em interação com outros fatores estudados e até mesmo em interações quadráticas, como mostrado no planejamento composto central.
- A matriz de gel é robusta à concentração de glicose e etanol no meio. O gráfico das médias marginais mostra que a glicose não teve atuação significativa no processo no intervalo de confiança estudado.
- A técnica de gotejamento do alginato de sódio mostrou-se satisfatória para a produção

de *pellets* com elevado grau de esfericidade.

- Não foi estudado o tipo de empacotamento da célula no interior no *pellet*, mas pode-se inferir que ele não foi agressivo para o microrganismo, em virtude da taxa de crescimento celular verificada no *pellet* após a sua solubilização.
- A função *desirability* (desejabilidade) para a fração 2^4 teve seu alvo global de 97,55%, mostrando que a escolha das variáveis independentes para otimizar o rendimento fermentativo foi adequado, de outra forma, o planejamento composto central tipo 3^{4-1} teve sua alvo global de 100%, mostrando que a ampliação da faixa investigada para as variáveis independentes levou ao aperfeiçoamento da região experimental. A faixa de concentração de glicose com maior *desirability* acontece próximos aos extremos do planejamento, indicando que a avaliação de uma faixa mais ampla pode ser importante para esse estudo.
- As avaliações conduzidas com a função valor desejado mostram que a região investigada captura um ponto de ótimo rendimento. Dentre os experimentos realizados, esse ponto é próximo aos valores de concentração de glicose igual a 65g/L, concentração de alginato igual a 2,2%, a concentração de cloreto igual a 0,26M e o diâmetro do *pellet* igual a 5,2mm.
- Analisando a formação do *pellet* como uma mistura de três componentes e utilizando o algoritmo de Piepel e Snee, com as devidas restrições, foi possível construir e projetar um planejamento estatístico bem posto e avaliar quais foram os fatores mais significativos e que impactaram no processo fermentativo.
- A alteração da concentração de alginato influi no rendimento fermentativo diretamente. Os fenômenos de transferência de massa e difusividade estão fortemente ligados à concentração de alginato de sódio usada para confecção das esferas.
- O tratamento das partículas com $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ contribuiu para melhoria de estabilidade do *pellet* estudado e de sua resistência mecânica, garantindo uma melhor capacidade de retenção celular em comparação aos *pellets* obtidos e tratados com tempo de cura. A imobilização das células nas condições investigadas manteve grau elevado de

atividade celular, o que constitui em fator promissor da utilização industrial desses *pellets* na produção de etanol.

- A investigação do sistema nas condições estabelecidas pelos planejamentos de experimentos confirmam que o uso de técnicas estatísticas para a condução dos ensaios permite a avaliação de fatores que não são observáveis ou mensuráveis diretamente para sistemas complexos e as interações entre eles.

CAPÍTULO 06 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Ampliar a faixa de concentração de glicose para valores acima de 100 g/L e verificar, se existe ação inibitória para o microrganismo, problemas relativos a transferência de massa e difusividade no gel.
- Determinar a faixa de concentração ótima de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ que proporciona *pellets* com características adequadas de baixa resistência à transferência de massa com elevada resistência mecânica.
- Desenvolver técnicas analíticas compatíveis com a precisão necessária a uma maior fundamentação experimental do fenômeno de fermentação com células imobilizadas. Nesse aspecto, a utilização da cromatografia de alta resolução (HPLC) para o cálculo do coeficiente de partição do etanol e da glicose pode ser uma contribuição valiosa.
- Otimizar as condições de operação de um bioreator em sistema batelada.
- Analisar as condições de imobilização em bioreatores operando em sistema contínuo em regimes de leito fixo e fluidizado.
- Avaliar outros tipos de suporte para a investigação da imobilização.
- Desenvolver experimentos para medida de parâmetros de transferência de massa para o sistema partícula-fermentador.
- Validar modelo e simular os diversos esquemas de bioreator descritos nesse texto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGLEIS, D.F., NETO, O.P., LUDWING, K.M, Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica, *Ciência e tecnologia de alimentos*, n.21, p.63-68, 2001.
- ALVA, J.C.R. *Crescimento e atividade invertásica de células de Saccharomyces cerevisiae imobilizadas em alginato de cálcio cultivadas com diferentes fontes de carbono*. Rio de Janeiro, Outubro de 1997. 73p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- ALCAZAR, E.B. *Atividade de células de Saccharomyces cerevisiae sob diferentes condições de estresse: Efeitos do aprisionamento em alginato de cálcio*. Rio de Janeiro, Outubro de 2000. 136p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)- Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- ATALA, D.I.P. *Fermentação alcoólica com alta densidade celular: modelagem cinética, covalidação de parâmetros e otimização do processo*. Campinas, Março de 2000. 135p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- ALTERTHUM, F. *Produção de etanol utilizando bactéria recombinante* [on line]. Brasil: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), 2004 [citado em 29 de maio de 2004]. Disponível na Word Wide Web: <UTL: http://www.Revistapesquisa.fapesp.br/print.php?lang=pt&id=revistas1.fapesp..20020617.19980430..SEC7_3>.
- ALTERTHUM, F. Produção de etanol por *Escherichia coli* KO11, *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n.27, p.24-27, 2002.
- BATISTA, M.A., CARVALHO, W., SILVA, S.S. Imobilização de células de *Candida guilliermondii* em gel de alginato de cálcio: Efeito do tempo de cura na viabilidade celular. In: Simpósio de Iniciação Científica, 3, 1999, Marília, Brasil. *anais...*Marília: UNIMAR – Universidade de Marília, 1999. p.150.
- BRANDENBERG, H., WIDMER, F., A new multinozzle encapsulation / immobilization system to produce uniform beads of alginate. *Journal of Biotechnology*. V.63, p.73-80, 1998.
- BIROL, G., DORUKER, P., KIDAR, B., ÖNSAN, Z.I., ÜLGEN, K. Mathematical description of ethanol fermentation by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, v.33, n.7, p.763-771, 1998.
- BORZANI, W., AQUARONE, E., LIMA, U.A., SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: EDGARD BLÜCHER, 2001. 541p.
- CASSIOLA, F.M. *Crisotila como suporte para Saccharomyces cerevisiae: origem físico-química da preservação da vitalidade*. Campinas, Setembro de 2001. 102p. Tese (Doutorado em Química)- Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

- CALLADO, V., MONTGOMERY, D.C. *Planejamento de experimentos usando o Statistica*. Rio de Janeiro: E-PAPERS, 2003. 260p.
- CARVALHO, C. *Estudo da imobilização de Candida guilliermondii FTI 20037 para obtenção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar*. Lorena, 2000. 108p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial)-Departamento de Biotecnologia Industrial, Faculdade de Engenharia Química de Lorena.
- CREMASCO, M.A. *Fundamentos da transferência de massa*. Campinas: UNICAMP, 2002. 729p.
- DERRINGER, G., SUCHI, R. Simultaneous optimization of several response variables, *Journal of Quality Technology*, v.12, pp.214-219, 1980.
- DORRY, E. *Celulose pode produzir álcool* [on line]. Brasil: Folha de São Paulo, 2001 [citado em 18 de junho de 2004]. Disponível na Word Wide Web: <UTL: <http://www1.folha.uol.com.br/folha/ciencia/ult306u3557.shtml>>.
- ERGUN, M., MUTLU, S.F. Application of a statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioresource Technology*, v.73, p.251-255, 2000.
- FERREIRA, R.S. *Coeficientes de partição de solutos em gel contendo microrganismos imobilizados*, São Carlos, 1986. 69p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos.
- FERREIRA, A.A. *Simulação da fermentação alcoólica de meios à base de glicose por Saccharomyces cerevisiae*, Uberlândia, 1998. 70p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia.
- FREGONESI, A.A. *Adesão de células de Saccharomyces sp. em materiais inorgânicos para a produção de etanol*. Ourinhos, Setembro de 1998. 69p. Dissertação (Mestrado em Química)-Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
- GAVA, A.J. *Princípios da tecnologia de alimentos*. São Paulo: NOBEL, 2004. 284p.
- GENARI, A.N. *Configuração de um bioreator de leito fixo para hidrólise de lactose*. Mirai, Agosto de 1999. 70p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agrícola)-Faculdade de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa.
- GOLDEMBERG, J. "The Brazilian Alcohol Program – An Overview", *Energy for Sustainable Development*. Vol.1, nº 1, pp. 17-22. [on line]. Brasil: Ministério da Ciência e Tecnologia, 1994 [citado em 18 de junho de 2004]. Disponível na Word Wide Web: <UTL: http://www.mct.gov.br/CLIMA/comunic_old/alcohol3.htm>.
- HANDRIKOVÁ, G., STEFUCA, V., POLAKOVIC, M., BALES, V. Determination of effective diffusion coefficient of substrate in gel particles with immobilized biocatalyst, *Enzyme and Microbial Technology*, v.18, p.581-584, 1996.

- INCROPERA, F., DEWITT, D. *Transferência de calor e de massa*: Rio de Janeiro, LTC, 2002, 698p.
- ISONO, Y., ARAYA, G., HOSHINO, A. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* for Ethanol Fermentation on γ -Alumina particles using a Spray-Dryer, *Process Biochemistry*, v.30, n.8, p.743-746, 1995.
- JAMI, L., SENDIDE, K., ETTAYEBI, K., ERRACHIDI, F., ALAMI, O.H., TAHRI-JOUTI, M., ERRACHIDI, F., HAMDOUNI-ALAMI, O., TAHRI-JOUTI, M.A., MCDERMOTT, T. Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate-immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiology Letters*, v.204, p.375-379, 2001.
- LEHNINGER, A., COX, M.M., NELSON, N.D. *Princípios de bioquímica*. São Paulo: SAVIER, 2002. 975p.
- LEVENSPIEL, O. *Engenharia das reações químicas*: Rio de Janeiro: EDGARD BLÜCHER, 2002. 563p.
- LIMA, K.G.C. Produção de etanol por *Escherichia coli* KO11, *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n.27, p.24-27, 2002.
- MAIORELLA, B.L., BLANCH, W.H., WILKE, C.R., Economic evaluation of alternative ethanol fermentation processes, *Biotechnology Report*, v.26, p.1003-1025, 1984.
- MARQUES, A.T.M. *Imobilização de células em reator fermentativo constituído por crushed pellets*. Rio Claro, Agosto de 2001. 88p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.
- MARCONDES. A.A. *Álcool Carburante*: Curitiba: UFPR, 2002. 246p.
- MTC. *O programa do Álcool*. [on line]. Brasil: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2004 [citado em 18 de junho de 2004]. Disponível na Word Wide Web: <URL: http://www.mct.gov.br/CLIMA/comunic_old/alcohol1.htm>.
- NAJAFPOUR, G., YOUNESI, H., ISMAIL, K.S. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioresource Technology*, v.92, p.251-260, 2004.
- NETO, B., B., SCARMÍNIO, I. S., BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos*. Campinas: UNICAMP, 1995. 401p.
- PELCZAR JUNIOR., MICHAEL, J., CHAN, E.C.S., KRIEG, N.R. *Microbiologia Conceitos e Aplicações*. São Paulo, PEARSON MAKRON BOOKS, 2004. 524p.
- NETO, B., B., SCARMÍNIO, I. S., BRUNS, R. E. *Como fazer experimentos*. Campinas: UNICAMP, 1995. 401p.
- ORIVE, G., PONCE, S., HERNÁNDEZ, R.M., GASCÓN, A.R., IGARTUA, M., PEDRAZ, J.L. Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates, *Biomaterials*, v.23, p.3825-3831, 2002.

- KOURKOUTAS, Y., BEKATOROU, A., BANAT, I.M., MARCHANT, R., KOUTINAS, A.A. Immobilization technologies and support material suitable in alcohol beverage production: a review. *Food microbiology*, v.21, p.373-397, 2004.
- RIGO, M. *Estudo de fermentação alcoólica por células de Saccharomyces cerevisiae imobilizadas em crisotila*. Campinas, Março de 2001. 88p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- ROCCA, E., CAMESELLE, C., NUNEZ, M.J., LEMAS, J.M. Continuous ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* immobilised in Ca-Alginate beads hardened with Al^{+3} , *Biotechnology techniques*, v.9, p.815-820, 1995.
- SANTOS, S.F.M. *Modelagem e simulação da fermentação alcoólica contínua extrativa*. Campina Grande, Fevereiro de 2002. 95p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Faculdade de Engenharia, Universidade Federal da Paraíba.
- SCHMIDT. *Hydrogen from ethanol goes portable*. [on line].EUA: Science Funding, 2004 [citado em 13 de fevereiro de 2004]. Disponível na Word Wide Web: <UTL: <http://www.sciencemag.or>>.
- SILVA, F.L.H. *Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua extrativa*. Campinas, Agosto de 1998. 161p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- SILVA, E.P. *Carro transforma álcool em hidrogênio*. [on line].Brasil: Folha de São Paulo, 2003 [citado em 18 de junho de 2004]. Disponível na Word Wide Web:<UTL: <http://www1.folha.uol.com.br/folha/ciencia/ult306u9695.shtml>>.
- STEUER, D. Multi-criteria-optimisation and desirability indices. *Technical Report 20*, Universität Dortmund, FB Statistik, Vogelposthsweg 87, 44221 Dortmund, 1999.
- STREMEL, D.P. *Desenvolvimento de modelos estruturados alternativos para o processo de produção de etanol*. Tubarão, Abril de 2001. 316p. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.
- STUPELLO, P.J. Aspectos comparativos das tecnologias de produção de álcool antes do pró-álcool e presentemente, *Tecnologia e pesquisa*, n.5, p.25-27, 1984.
- TAKAHASHI, C.M. Produção de etanol por *Escherichia coli* KO11, *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n.27, p.24-27, 2002.
- UDOP. *Processos de fabricação de álcool etílico*. [on line].Brasil: Usinas e Destilarias do Oeste Paulista [citado em 16 de junho de 2004]. Disponível na Word Wide Web: <UTL: http://www.udop.com.br/versão_impressão/alcohol.php?not_n_cod=898>
- VASCONCELOS, J.N. *Fermentação alcoólica com levedura imobilizada em colmos de cana-de-açúcar*. Maceió, Abril de 1998. 110p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)-Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

- VALLERO, M.V.G. *Avaliação da atividade biológica das células livres e imobilizadas formadas em um reator anaeróbio*. Araraquara, Junho de 1999. 151p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento)-Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- VIEGAS, M.C. *Desenvolvimento de um reator de bancada de leito fluidizado para produção de etanol utilizando linhagens de levedura floculantes*. Campinas, Maio de 1999. 84p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.
- VILLADSEN, J.V. E MICHELSEN, M. L. *Solution of Differential Equation Models by Polynomial Approximation*, Prentice Hall. (1978).
- WENDHAUSEN JÚNIOR, R. *Estudo sobre utilização de crisotila como suporte de células de *Saccharomyces cerevisiae* para o uso em processo contínuo de fermentações*. Blumenau, Fevereiro de 1998. 80p. Tese (Doutorado em Química)-Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

Apêndices

Apêndice A

1 - Curvas de Calibração

As curvas de calibração para a quantificação da concentração de etanol e celular foram elaboradas utilizando-se o *software* Origin 7.0[®]. O teste estatístico utilizado para sua validação foi o teste *t-Student*, com resultados apresentados na Tabela A1, onde a absorbância (ABS) é correlacionada à concentração celular e de etanol conforme metodologia apresentada por NETO *et al.* (2001).

Tabela A1 – Curvas de calibração para concentração celular e de etanol

Concentração celular			
$ABS = -9,023 \times 10^{-4} + 0,0437 \times [\text{concentração (g/L)}]$			
Correlação	Desvio Padrão	Número de amostras (N)	t
0,999	0,009	7	<0,0001
Concentração de etanol			
$ABS = 0,011 + 0,031 \times [\text{concentração (g/L)}]$			
Correlação	Desvio Padrão	Número de amostras (N)	t
0,996	0,007	6	<0,0001

Apêndice B

1- Resultados dos Ensaios de Fermentação Realizados

Tabela B1 - Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 01

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
1	41,35	3,5	2,2	0,1
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	41,35	0	8,1
2	6,25	25,24	0,0272	11,36
4	12,16	10,20	0,0653	17,16
6	17,95	0	0,2893	26,68
8	—	—	—	—
10	—	—	—	—
12	—	—	—	—

Tabela B2 - Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 02

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
2	88,65	3,5	2,2	0,1
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	88,65	0	8,1
2	5,56	76,25	0,02610	11,78
4	13,25	60,01	0,06432	17,25
6	20,12	42,15	0,2791	25,65
8	25,10	21,36	0,50400	40,39
10	37,73	4,30	0,5850	46,31
12	—	—	—	—

Tabela B3 - Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 03

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
3	41,35	4,9	2,2	0,1
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	41,35	0	8,1
2	4,58	29,24	0,04789	10,89
4	10,69	16,20	0,06532	16,25
6	15,67	3,51	0,5873	27,98
8	—	—	—	—
10	—	—	—	—
12	—	—	—	—

Tabela B4 - Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 04

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
4	88,65	4,9	2,2	0,1
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	88,65	0	8,1
2	3,69	77,12	0,02320	10,16
4	11,25	57,26	0,05522	16,10
6	17,04	44,15	0,2893	27,60
8	25,12	22,33	0,50380	36,40
10	29,59	5,30	1,026	49,34
12	34,70	0,71	1,4121	53,12

Tabela B5 - Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 05

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
5	41,35	3,5	2,8	0,1
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	41,35	0	8,1
2	2,36	31,00	0,02611	11,00
4	6,72	19,03	0,07513	16,99
6	9,11	11,1	0,2997	26,89
8	10,23	4,09	0,5200	38,25
10	14,28	0,66	0,5800	41,33
12	—	—	—	—

Tabela B6 - Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 06

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
6	88,65	3,5	2,8	0,1
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	88,65	0	8,1
2	6,8	66,21	0,02720	12,46
4	11,01	55,09	0,06532	18,36
6	17,21	41,19	0,2893	24,78
8	28,12	24,26	0,50380	35,25
10	31,54	9,25	0,5800	42,43
12	34,21	0	0,9923	49,65

Tabela B7 - Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 07

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
7	41,35	4,9	2,8	0,1
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	41,35	0	8,1
2	4,10	29,23	0,02680	11,77
4	6,75	16,20	0,06342	16,75
6	11,24	9,77	0,2689	27,11
8	15,02	3,35	0,5134	33,13
10	17,24	0	0,9685	40,24
12	—	—	—	—

Tabela B8 - Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 08

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
8	88,65	4,9	2,8	0,1
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	88,65	0	8,1
2	3,12	76,25	0,02517	9,31
4	6,65	60,01	0,06223	14,98
6	14,56	42,15	0,2961	23,64
8	23,61	21,36	0,52650	32,41
10	31,04	4,30	0,5678	42,31
12	37,6	0	1,0030	45,97

Tabela B9 - Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 09

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
9	41,35	3,5	2,2	0,26
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	41,35	0	8,1
2	8,1	19,89	0,02915	10,98
4	15,4	11,24	0,06262	16,94
6	18,2	0	0,2762	22,52
8	—	—	—	—
10	—	—	—	—
12	—	—	—	—

Tabela B10 - Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 10

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
10	88,65	3,5	2,2	0,26
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	88,65	0	8,1
2	1,45	66,25	0,02496	12,26
4	12,11	55,01	0,06312	19,00
6	19,26	43,15	0,2743	25,78
8	31,51	11,16	0,5920	39,55
10	36,4	0,60	0,5911	41,23
12	—	—	—	—

Tabela B11 - Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 11

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
11	41,35	4,9	2,2	0,26
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	41,35	0	8,1
2	1,1	27,24	0,02817	13,34
4	9,23	12,20	0,06966	20,12
6	10,17	3,1	0,3025	29,51
8	16,78	0	0,49985	31,24
10	—	—	—	—
12	—	—	—	—

Tabela B12 - Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 12

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
12	88,65	4,9	2,2	0,26
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	88,65	0	8,1
2	4,3	69,20	0,02986	11,51
4	9,21	57,01	0,06345	17,19
6	16,12	43,15	0,3000	25,91
8	27,1	19,98	0,5975	38,95
10	31,04	9,12	0,6104	44,39
12	35,56	1,22	1,1253	47,32

Tabela B13 - Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 13

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
13	41,35	3,5	2,8	0,26
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	41,35	0	8,1
2	2,54	28,72	0,02699	8,3
4	8,59	14,03	0,05932	19,14
6	11,23	7,16	0,2811	24,23
8	16,13	5,6	0,57280	26,25
10	—	—	—	—
12	—	—	—	—

Tabela B14 - Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 14

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
14	88,65	3,5	2,8	0,26
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	88,65	0	8,1
2	5,85	68,25	0,02520	13,25
4	11,26	54,01	0,06592	17,12
6	17,45	47,31	0,2943	27,63
8	23,2	23,16	0,5180	40,44
10	29,41	16,31	0,5750	45,30
12	31,06	7,52	0,6500	49,32
14	36,39	1,11	1,3012	49,11

Tabela B15 - Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 15

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
15	41,35	4,9	2,8	0,26
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	41,35	0	8,1
2	3,9	25,24	0,02719	11,23
4	12,6	10,20	0,06585	16,13
6	18,6	5,63	0,2800	21,68
8	—	—	—	—
10	—	—	—	—
12	—	—	—	—

Tabela B16 - Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 16

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
16	88,65	4,9	2,8	0,26
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	88,65	0	8,1
2	3,1	76,25	0,02310	10,94
4	8,5	60,01	0,05532	17,45
6	17,4	42,15	0,2993	25,36
8	26,1	21,36	0,5280	38,44
10	29,3	4,30	0,6100	41,31
12	38,53	0	1,0500	52,32

Tabela B17 - Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 17

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
17	65	4,2	2,5	0,18
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	65	0	8,1
2	3,45	33,41	0,02729	13,02
4	11,62	20,84	0,06542	19,14
6	25,69	10,12	0,27226	28,66
8	27,6	2,70	0,55886	39,55
10	—	—	—	—
12	—	—	—	—

Tabela B18 - Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 18

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
18	30	4,2	2,5	0,18
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	30	0	8,1
2	3,21	22,11	0,03020	12,36
4	13,51	0,11	0,09512	17,12
6	—	—	—	—
8	—	—	—	—
10	—	—	—	—
12	—	—	—	—

Tabela B19- Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 19

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
19	100	4,2	2,5	0,18
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	100	0	8,1
2	3,54	80,01	0,02729	10,94
4	12,59	72,15	0,06530	17,14
6	17,56	63,03	0,2356	24,69
8	27,6	44,17	0,5000	36,44
10	31,94	29,30	0,5622	39,37
12	27,61	19,12	0,6529	44,31
14	37,25	8,59	0,9564	49,22
16	45,27	1,66	1,60982	52,24

Tabela B20 - Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 20

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
20	65	3,1	2,5	0,18
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	65	0	8,1
2	1,05	49,01	0,02785	12,32
4	8,69	32,82	0,06409	19,10
6	17,69	12,43	0,2762	23,58
8	26,11	6,56	0,5168	41,65
10	29,61	2,11	0,5600	42,10
12	—	—	—	—

Tabela B21 - Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 21

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
21	65	5,2	2,5	0,18
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	65	0	8,1
2	0,98	41,01	0,02320	13,00
4	6,13	30,82	0,06329	16,99
6	19,5	12,43	0,2863	28,56
8	20,2	7,56	0,5022	39,45
10	23,4	2,71	0,5150	44,43
12	25,61	0,95	1,1548	46,31

Tabela B22 - Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 22

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
22	65	4,2	2	0,18
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	65	0	8,1
2	3,1	38,06	0,02633	12,36
4	8,6	29,82	0,06522	16,16
6	25,4	10,43	0,2988	25,68
8	27,12	0,33	0,5301	41,45
10	—	—	—	—
12	—	—	—	—

Tabela B23 - Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 23

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
23	65	4,2	3	0,18
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	65	0	8,1
2	4,9	52,25	0,02990	9,36
4	7,9	30,82	0,07032	14,16
6	15,63	16,43	0,3193	21,68
8	19,21	10,56	0,56380	36,45
10	20,89	5,62	0,64890	43,13
12	21,04	0,6	1,2569	45,42
14	23,14	0	1,6589	47,44

Tabela B24 - Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 24

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
24	65	4,2	2,5	0,05
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	65	0	8,1
2	3,4	49,21	0,03129	11,74
4	8,9	36,82	0,07219	17,58
6	13,45	17,43	0,31052	25,68
8	20,2	6,56	0,58964	38,41
10	24,51	0	0,69982	41,33
12	—	—	—	—

Tabela B25 - Resultado da cinética de fermentação – Ensaio 25

Ensaio	Concentração de Glicose (g/L)	Diâmetro do <i>Pellet</i> (mm)	Concentração de Alginato de Sódio (% p/v)	Concentração de Cloreto de Cálcio (M)
25	65	4,2	2,5	0,3
Tempo (h)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Células Livres (g/L)	Concentração de Células Imobilizadas (g/L)
0	0	65	0	8,1
2	0,56	42,12	0,0242	12,46
4	5,1	31,25	0,0593	19,13
6	9,33	19,63	0,3193	28,67
8	15,28	12,51	0,5838	39,41
10	19,78	8,91	0,7100	41,37
12	21,07	4,18	0,9988	47,24
14	26,84	0,41	1,2358	49,86