

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA
DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA

**IMOBILIZAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* EM ALGINATO
DE CÁLCIO COM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS**

SAMARA ORTIZ

FLORIANÓPOLIS – SC, 2017

SAMARA ORTIZ

**IMOBILIZAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* EM ALGINATO
DE CÁLCIO COM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Junior

FLORIANÓPOLIS – SC, 2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ortiz, Samara

Imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em alginato de cálcio com nanopartículas magnéticas / Samara Ortiz; orientador, Agenor Furigo Jr - Florianópolis, SC, 2017.
97 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Imobilização celular. 3. Partículas magnéticas. 4. Alginato de cálcio. 5. Fermentação Alcoólica. I. Furigo Jr, Agenor. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

Dedico este trabalho aos meus
pais, Celso e Rosane, e ao meu
esposo, Diego

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Agenor Furigo Junior, agradeço por me motivar e incentivar, instigando minha curiosidade e desenvolvendo meu lado de pesquisadora e cientista.

Ao Prof. António André Chivanga Barros, que me coorientou no início no primeiro ano, por fazer eu me encantar pela Engenharia Química em 2003, e depois almejar o mestrado e o doutorado.

À Prof.^a Cíntia Soares, pelo exemplo de dedicação na docência, na pesquisa e na coordenação.

Aos colegas do EngeBio, que me ensinaram sobre os equipamentos e metodologias, que me fizeram companhia após às 18h, entre outros diversos favores e momentos vividos. Agradeço em especial à Denise Moritz, à Eliane Cicolatti, à Stéphanie Baía, à Silvana Licodiedoff e à Luciana Fontinelle.

Ao Jonathan Alexsander Bork e à Rosana Henriques, agradeço pela inspiração do tema desta tese, pelos artigos e conhecimentos compartilhados e pela paciência que tiveram em atender minhas dúvidas.

À Luana Benetti agradeço pela realização do magnômetro da amostra vibrante e pelo auxílio na interpretação dos dados obtidos. Ao Bernardo Haas agradeço pela análise da microscopia eletrônica de varredura e por não ter rido da minha empolgação com as imagens obtidas.

À Mylena Fernandes e à Gabriela Duarte Karasiak que me ajudaram na realização das análises das amostras por cromatografia líquida de alta eficiência.

À banca que se dispôs a avaliar este trabalho.

À CAPES e UFSC, agradeço pelo apoio financeiro e institucional.

“Ninguém é digno de contribuir para a ciência se não usar suas dores e insônia nesse processo. Risos e lágrimas, sucessos e fracassos, aplausos e vaias fazem parte do currículo de cada ser humano, em especial daqueles que são apaixonados por produzir novas ideias.”

Augusto Cury

Não é sobre ter todas as pessoas do mundo pra si
É sobre saber que em algum lugar alguém zela por ti
É sobre cantar e poder escutar mais do que a própria voz
É sobre dançar na chuva de vida que cai sobre nós

É saber se sentir infinito num universo tão vasto e bonito
É saber sonhar e, então, fazer valer a pena cada verso
Daquele poema sobre acreditar

Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu
É sobre ser abrigo
E também ter morada em outros corações
E assim ter amigos contigo em todas as situações

A gente não pode ter tudo
Qual seria a graça do mundo se fosse assim?
Por isso, eu prefiro sorrisos
E os presentes que a vida trouxe pra perto de mim

Não é sobre tudo que o seu dinheiro é capaz de comprar
E sim sobre cada momento sorrindo a se compartilhar
Também não é sobre correr contra o tempo pra ter sempre mais
Porque quando menos se espera
A vida já ficou pra trás

Segura teu filho no colo, sorria e abraça teus pais
Enquanto estão aqui
Que a vida é trem-bala, parceiro
E a gente é só passageiro prestes a partir

Ana Vilela

DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

IMOBILIZAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* EM ALGINATO DE CÁLCIO COM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Por quê?

A utilização de reator de leito fluidizado estabilizado magneticamente apresenta vantagens econômicas e operacionais, além de ser considerada uma alternativa promissora para processos fermentativos.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* apresenta alta produtividade em fermentação alcoólica.

A imobilização celular melhora a resistência da levedura durante a fermentação, aumenta a produtividade e melhora a qualidade do produto obtido.

Quem já fez?

A grande maioria dos trabalhos publicados sobre partículas magnéticas avalia sua utilização na imobilização de enzimas.

Não consta na literatura trabalhos de imobilização celular de *Saccharomyces cerevisiae* com alginato de cálcio e magnetita.

São poucos os trabalhos de imobilização celular que utilizam partículas magnéticas no suporte.

Hipóteses?

É possível imobilizar levedura com alginato de cálcio juntamente com a magnetita e manter o suporte em mais de uma batelada de 24 horas.

A presença da magnetita não interfere no consumo de glicose pela levedura.

É possível obter máxima produtividade da fermentação apesar da presença da magnetita.

É possível alterar a concentração de levedura e o teor de alginato de cálcio utilizados na imobilização celular para aumentar o número de ciclos de reutilização das esferas imobilizadas sem comprometer a produtividade.

Métodos

Caracterização do suporte imobilizado (densidade, MAV, MEV, estudo de absorção de água pelo suporte).

Quantificação dos açúcares consumidos e do etanol e glicerol gerados a cada ciclo de 24 horas.

Respostas

Comprovar que a presença da magnetita no suporte não interfere na produtividade da fermentação.

Determinar as melhores condições experimentais, dentre as avaliadas, de concentração de levedura e de teor de alginato de sódio utilizados na imobilização celular que possibilitem o maior número de ciclos de reutilização das esferas imobilizadas sem comprometer a produtividade.

Obter dados experimentais iniciais que sirvam de base para estudos mais específicos, como: aplicação em reator de leito fluidizado estabilizado magneticamente.

RESUMO

Uma das vantagens da utilização de células imobilizadas em processos fermentativos é a facilidade de separação da célula do meio de cultivo. As alterações que a imobilização causará no crescimento celular ou na atividade metabólica das células são imprevisíveis. Como suporte de imobilização celular, utiliza-se amplamente o alginato de cálcio. A utilização de material magnético em imobilização se destaca pela sua utilização em reatores de leito fluidizados estabilizados magneticamente, configuração esta, que permite grande flexibilidade operacional. Sendo assim, o presente trabalho possui como objetivo geral a imobilização celular por aprisionamento em alginato de cálcio da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com nanopartículas magnéticas de magnetita. Após a síntese da magnetita, constatou-se a escala nano das partículas por microscopia eletrônica de transmissão. Para a etapa de imobilização celular preparou-se 10 mL de solução de alginato de sódio e adicionou-se as partículas magnéticas e *Saccharomyces cerevisiae*. Esta mistura foi gotejada na solução de cloreto de cálcio, formando-se assim, as esferas de células imobilizadas. Com base nos resultados do estudo de absorção de água pela célula imobilizada, constatou-se que a absorção de água pela esfera não causa as rachaduras presentes no suporte durante a fermentação, concluindo que estas rachaduras são causadas pelo crescimento celular no interior da esfera. A análise da microscopia eletrônica de varredura indicou a eficiência da ligação entre as nanopartículas de magnetita, o alginato e as células de levedura. Os resultados obtidos pelo magnômetro da amostra vibrante indicaram que o alginato e a levedura não interferem nas propriedades magnéticas da magnetita, e que o suporte sintetizado neste trabalho possui propriedades magnéticas válidas para ser aplicadas em reator de leito fluidizado magneticamente estabilizado. Para a condução da fermentação alcoólica, os erlenmeyers contendo o meio e as esferas de células imobilizadas foram mantidos em incubadora por 24 h. Pela análise cinética do consumo de substrato durante a fermentação alcoólica, é possível afirmar que a presença da nanopartícula magnética no suporte não possui influência significativa no processo fermentativo. Pela análise qualitativa do estudo da influência da concentração de levedura e do teor de alginato na integridade das esferas, constatou-se pelo teste Qui-Quadrado, que apenas o teor de alginato possui evidência estatística de possuir associação com a integridade do suporte imobilizado. A análise quantitativa indicou que a variação na concentração de levedura e no teor de alginato utilizados na imobilização não interfere na produtividade da fermentação. Sendo assim,

para a determinação das condições de imobilização promissoras para futuros trabalhos, considerou-se ambas as análises. As melhores condições de imobilização consideradas são 1% de alginato de sódio e 100 g L⁻¹ de levedura, que manteve a integridade das esferas por 2 ciclos, ambos com rendimento acima de 70%; e 2% de alginato de sódio e 50 g L⁻¹ de levedura, que manteve a integridade das esferas por 4 ciclos, porém apenas 2 ciclos resultaram em rendimento superior a 70%.

Palavras-chaves: alginato, *Saccharomyces cerevisiae*, magnetita, imobilização celular, fermentação alcoólica.

ABSTRACT

One of the advantages of using immobilized cells in fermentative processes is the facility of cell separation from the culture medium. The changes that immobilization causes in cell growth or in cell metabolic activity are unpredictable. As cell immobilization support, the calcium alginate is largely used. The magnetic supports are distinguished by their use in magnetically stabilized fluidized bed reactors, a configuration that allows great operational flexibility. Therefore, this work has as main objective the cell immobilization by imprisonment in calcium alginate of yeast *Saccharomyces cerevisiae* with magnetite magnetic nanoparticles. After the magnetite synthesis, the nanoscale of the particles synthesized was determined by transmission electron microscopy. For the cell immobilization step it was prepared 10 mL of sodium alginate solution and then the magnetic particles and *Saccharomyces cerevisiae* were added. This mixture was dropped into the calcium chloride solution, thus forming the beads. Regarding water absorption study by the immobilized cell, it was verified that the water absorption by the beads does not induce the cracks present in the support during the alcoholic fermentation, leading to the conclusion that these cracks are caused by the cell growth inside the beads. The scanning electron microscopy indicated the bond efficiency between magnetite nanoparticles, alginate and yeast cells. The results obtained by the vibrating sample magnetometer indicated that alginate and yeast do not interfere in the magnetic properties of the magnetite, and that the support synthesized in this work has valid magnetic properties to be applied in a magnetically stabilized fluidized bed reactor. For the alcoholic fermentation, the erlenmeyer flasks containing the medium and the beads were placed in an incubator for 24 h. By the kinetic analysis of the substrate consumption during the alcoholic fermentation, it is possible to affirm that the presence of the magnetic nanoparticle in the support does not have significant influence in the fermentative process. By the qualitative analysis of the yeast concentration and the alginate content influence study on the beads integrity, it was verified by the Chi-Square test that only the alginate content has statistical evidence of having an association with the integrity of the immobilized support. The quantitative analysis indicated that the variation in yeast concentration and alginate content used in immobilization does not interfere in the fermentation productivity. Thus, both analyzes were considered for the determination of the promising immobilization conditions for future work. The best immobilization conditions considered are 1% of sodium alginate and 100 g L⁻¹ of yeast,

condition that maintained the beads integrity for 2 cycles, both with yield above 70%; and 2% of sodium alginate and 50 g L⁻¹ of yeast, which maintained the beads integrity for 4 cycles, but only 2 cycles resulted in yields above 70%.

Keywords: alginate, *Saccharomyces cerevisiae*, magnetite, cell immobilization, alcoholic fermentation.

LISTA DE EQUAÇÕES

| | |
|---|----|
| Equação 1 – Densidade de partículas porosas..... | 60 |
| Equação 2 – Velocidade instantânea do consumo de substrato..... | 61 |
| Equação 3 – Velocidade específica de consumo de substrato..... | 62 |
| Equação 4 – Fator de conversão de substrato em produto..... | 62 |
| Equação 5 – Produtividade da fermentação alcoólica..... | 62 |
| Equação 6 – Rendimento da fermentação alcoólica..... | 62 |
| Equação 7 – Estequiometria da fermentação alcoólica..... | 62 |
| Equação 8 – Fator de conversão máximo teórico de substrato em produto..... | 63 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Representação da estrutura molecular do etanol (C_2H_5OH), sendo “C” a molécula de carbono, “O” representa a molécula de oxigênio e “H” representa a molécula de hidrogênio..... | 29 |
| Figura 2 – Representação das estruturas moleculares do trifosfato de adenosina (ATP) e do difosfato de adenosina (ADP) | 30 |
| Figura 3 – Esquema representativo das diferentes matérias primas utilizadas e das etapas do processo para obtenção do bioetanol de 1 ^a , 2 ^a e 3 ^a geração | 31 |
| Figura 4 – Fotografias de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> comercial: (a) foto macro e (b) foto micro com aumento de 400×..... | 34 |
| Figura 5 – Representação dos diferentes métodos de imobilização celular, sendo (a) fixação ou adsorção na superfície de um suporte sólido; (b) retenção dentro de uma matriz porosa (aprisionamento); (c) auto agregação pela floculação (natural) e (d) contenção de células por barreiras..... | 36 |
| Figura 6 – Representação da estrutura química do alginato de sódio .. | 41 |
| Figura 7 – Representação da ligação dos blocos de homopolímeros através de íons de cálcio, formando o egg-box model | 42 |
| Figura 8 – Eletromicrografia com ampliação de 3000× de uma esfera seca de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> JAY 270 imobilizada com 3,0 % ($m v^{-1}$) de alginato de sódio..... | 44 |
| Figura 9 – Esquema ilustrativo das diversas áreas de pesquisa que utilizam óxido de ferro | 47 |
| Figura 10 – Imagem da aparência dos cristais pretos metálicos da magnetita | 48 |
| Figura 11 – Ilustração do modelo da estrutura cristalina da magnetita, sendo que as moléculas de ferro estão representadas em azul e as moléculas de oxigênio em branco | 49 |
| Figura 12 – Representação gráfica da curva de histerese: (a) reversível e (b) irreversível..... | 51 |
| Figura 13 – Representação do modelo de reator de leito fluidizado magneticamente estabilizado..... | 53 |
| Figura 14 – Esquema ilustrativo da metodologia da imobilização celular com magnetita | 59 |
| Figura 15 – Fluxograma representativo do processo de utilização da levedura imobilizada com uma etapa de decisão | 65 |
| Figura 16 – Partículas de magnetita sendo atraídas pelo ímã..... | 67 |
| Figura 17 – Imagem da microscopia de transmissão eletrônica das partículas de magnetita em escala nanométrica..... | 67 |

| | |
|---|----|
| Figura 18 – Eletromicrografia com ampliação de (a) 50 ×, (b) 100 × e (c) 300 × de uma esfera seca imobilizada com 1,0 % (m v ⁻¹) de alginato de sódio, 100 g L ⁻¹ de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e magnetita após 2 ciclos de reutilização de 24 h em fermentação alcoólica | 71 |
| Figura 19 – Eletromicrografia com ampliação de (a) 500 × (b) 1000 × e (c) 2000 × de uma esfera seca imobilizada com 1,0% (m v ⁻¹) de alginato de sódio, 100 g L ⁻¹ de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e magnetita após 2 ciclos de reutilização de 24 h em fermentação alcoólica..... | 71 |
| Figura 20 – Curva de histerese da levedura imobilizada com magnetita e alginato de cálcio | 72 |
| Figura 21 – Concentração de substrato ao longo do tempo de fermentação com célula imobilizada sem a presença da magnetita e com a presença da magnetita com coleta de amostra a cada 2 h | 74 |
| Figura 22 – Esferas de células imobilizadas com as partículas magnéticas sendo atraídas pelo ímã após 24 horas de cultivo | 76 |
| Figura 23 – Resultado do Teste Qui-quadrado para as variáveis teor de alginato (% m v ⁻¹) e a concentração celular (g L ⁻¹), com p-value do teste de 0,05..... | 77 |
| Figura 24 – Imagens das esferas imobilizadas com magnetita após 24 h utilizando: (a) 1%, (b) 1,5% e (c) 2% (m v ⁻¹) de alginato de sódio na imobilização | 78 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Principais informações dos trabalhos explorados utilizando diferentes suportes para a imobilização de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . | 40 |
| Tabela 2 – Dados comparativos entre reator de leito estabilizado magneticamente, de leito fixo e de leito fluidizado..... | 53 |
| Tabela 3 – Exemplos de aplicação de reator de leito fluidizado estabilizado magneticamente presentes na literatura..... | 54 |
| Tabela 4 – Principais trabalhos que avaliaram a imobilização celular em suporte magnético e os respectivos microrganismos imobilizados | 55 |
| Tabela 5 – Condição de imobilização de cada amostra, sendo estes o teor de alginato de sódio e a concentração de células | 64 |
| Tabela 6 – Propriedades da esfera imobilizada, de acordo com os diferentes teores de alginato de sódio adicionados no suporte na etapa de imobilização celular | 69 |
| Tabela 7 – Valores da magnetização de saturação (M_s), da coercividade (H_c) e da magnetização remanente (M_r) da magnetita e das esferas imobilizadas com magnetita em alginato | 73 |
| Tabela 8 – Velocidades de consumo de substrato da fermentação alcoólica conduzida com células imobilizadas sem a presença da magnetita e com a presença da magnetita para os respectivos intervalos de tempo de fermentação..... | 75 |
| Tabela 9 – Condições de imobilização com a magnetita e quantidades de ciclos de reutilização de cada amostra avaliada | 77 |
| Tabela 10 – Dados obtidos no final de cada ciclo de 24 h para a concentração de substrato e de etanol e os valores calculados da produtividade e do rendimento da fermentação para cada amostra indicando as condições de imobilização com a magnetita | 79 |
| Tabela 11 – Principais trabalhos que avaliaram a imobilização de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com alginato de sódio e a maior conversão de substrato em produto obtida em cada trabalho com o respectivo teor de alginato utilizado na imobilização..... | 81 |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-------------|---|
| K_S | coeficiente de saturação |
| m_S | coeficiente de manutenção |
| ρ_p | densidade de partículas porosas |
| m_p | massa da esfera |
| v_p | volume deslocado pela esfera se sua superfície fosse não porosa |
| r_s | velocidade do consumo de substrato |
| μ'_s | velocidade específica de consumo de substrato com base na concentração inicial de células |
| X_i | concentração inicial de células |
| $Y_{P/S}$ | fator de conversão de substrato em produto |
| $Y^*_{P/S}$ | fator de conversão máximo teórico de substrato em produto |
| P_f | concentração final do produto |
| P_i | concentração inicial do produto |
| S_i | concentração inicial do substrato |
| S_f | concentração final do substrato |
| P_r | produtividade da fermentação alcoólica |
| t_f | tempo final de fermentação |
| R | rendimento da fermentação alcoólica |
| MM | massa molar |

LISTA DE UNIDADES

| | |
|--------------|-------------------------|
| atm | atmosfera |
| cm | centímetro |
| emu | unidade eletromagnética |
| g | grama |
| h | hora |
| kcal | quilocaloria |
| kg | quilograma |
| kHz | quilohertz |
| kOe | quilo-oersted |
| L | litro |
| M | molar |
| m | metro |
| mg | miligrama |
| min | minuto |
| mL | mililitro |
| mm | milímetro |
| mmol | milimol |
| nm | nanômetro |
| Oe | oersted |
| rpm | rotações por minuto |
| μ L | microlitro |
| μ m | micrometro |
| $^{\circ}$ C | graus Celsius |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 27 |
| 1.1 Objetivos | 28 |
| 1.2 Objetivos específicos..... | 28 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA..... | 29 |
| 2.1 Fermentação alcoólica..... | 29 |
| 2.1.1 Etanol de 1 ^a , 2 ^a e 3 ^a geração..... | 31 |
| 2.1.2 Leveduras..... | 33 |
| 2.2 Imobilização celular | 35 |
| 2.2.1 Alginatos..... | 41 |
| 2.3 Partículas magnéticas | 46 |
| 2.3.1 Magnetita | 47 |
| 2.3.2 Suportes magnéticos | 49 |
| 2.3.3 Propriedades magnéticas..... | 51 |
| 2.4 Reator de leito fluidizado magneticamente estabilizado | 52 |
| 2.5 Estado da arte e justificativa do estudo | 54 |
| 3 METODOLOGIA | 57 |
| 3.1 Síntese e caracterização da magnetita | 57 |
| 3.2 Microrganismo | 58 |
| 3.3 Imobilização celular | 58 |
| 3.4 Caracterização da célula imobilizada | 59 |
| 3.4.1 Estudo da absorção de água pela célula imobilizada | 59 |
| 3.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) | 60 |
| 3.4.3 Magnetômetro da amostra vibrante (MAV)..... | 60 |
| 3.5 Fermentação alcoólica..... | 61 |
| 3.5.1 Meio fermentativo..... | 61 |
| 3.5.2 Condução do processo fermentativo | 61 |
| 3.5.3 Análise Cinética da Fermentação Alcoólica | 61 |
| 3.6 Estudos da fermentação com células imobilizadas com Nanopartículas..... | 63 |
| 3.6.1 Determinação da concentração do substrato durante a fermentação alcoólica | 63 |

| | |
|--|----|
| 3.6.2 Avaliação da influência da concentração de alginato de sódio e da concentração celular na integridade da esfera imobilizada..... | 63 |
| 3.7 Métodos analíticos | 65 |
| 3.7.1 Quantificação dos açúcares redutores..... | 65 |
| 3.7.2 Quantificação da glicose, do etanol e do glicerol | 66 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 67 |
| 4.1 Síntese e caracterização da magnetita..... | 67 |
| 4.2 Caracterização da célula imobilizada..... | 68 |
| 4.2.1 Absorção de água pela célula imobilizada..... | 68 |
| 4.2.2 Análise da microscopia eletrônica de varredura | 70 |
| 4.2.3 Análise das propriedades magnéticas | 72 |
| 4.3 Análise da influência da partícula magnética na fermentação alcoólica | 74 |
| 4.3.1 Cinética do consumo de substrato na fermentação alcoólica...74 | |
| 4.3.2 Avaliação qualitativa da influência da concentração de alginato de sódio e da concentração celular no processo fermentativo | 76 |
| 4.3.3 Avaliação quantitativa da influência da concentração de alginato de sódio e da concentração celular no processo fermentativo | 78 |
| 5 CONCLUSÕES | 83 |
| REFERÊNCIAS..... | 87 |

1 INTRODUÇÃO

A fermentação alcoólica é um processo bioquímico que é realizado pelas leveduras e algumas bactérias. O principal produto desta reação é o etanol, sendo que também pode-se obter outros compostos, como o glicerol. Tanto para a síntese destes produtos, quanto para o crescimento celular, o microrganismo necessita de energia e nutrientes. Em fermentações alcoólicas em escala industrial a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a mais utilizada atualmente por apresentar alto rendimento de reação e baixo custo.

Os estudos em fermentação alcoólica avaliam a utilização de diferentes microrganismos, composição de meio de cultivo, suportes de imobilização celular, entre outros. As pesquisas atuais em imobilização celular avaliam diferentes suportes e a melhoria dos mesmos pela adição de outros componentes com o intuito de melhorar a integridade da imobilização e a produtividade da fermentação (DUARTE et al., 2013).

Como diversos estudos relatam que imobilização celular aumenta a produtividade da fermentação em relação à célula livre, este trabalho é adequado às tendências de pesquisa em fermentação alcoólica (NORTON; D'AMORE, 1994; MALLOUCHOS et al., 2003; KOURKOUTAS et al., 2004; KOSSEVA et al., 2009; GALANAKIS et al., 2012).

O atual cenário da ciência estuda amplamente a utilização de magnetita e maguemita em imobilização enzimática. Porém, pouco se relata do seu uso em imobilização celular. Apenas recentemente foram apresentadas informações sobre imobilização de células com partículas magnéticas, afirmando que a estrutura destas partículas faz com que estas sejam adequadas à imobilização celular e que as células se mantêm ativas após imobilização neste suporte (AL-QODAH et al., 2015).

Para imobilização de biocatalisadores, Li et al. (2009) destacam que a vantagem de utilização dos suportes magnéticos é a facilidade de separação do suporte do meio. Outra vantagem, citada por Al-Hassan et al. (1991), é que o a levedura imobilizada com material magnético pode ser utilizada em reatores de leito fluidizado, sendo que a estabilização do mesmo é realizada magneticamente. O uso de partículas magnéticas em reatores de leito fluidizado elimina o problema do arraste de pequenas partículas, uma vez que estas estão estabilizadas pelo campo magnético (BAHAR; ÇLEBI, 2000). Esta configuração de reator possui alta flexibilidade operacional, diferente do reator de leito fixo e do reator de leito fluidizado estabilizado por outros métodos (ZONG et al., 2013).

O presente trabalho se apresenta inovador no tema, pois avalia a imobilização da levedura que é utilizada nos processos industriais de obtenção de etanol. Este estudo demonstra capacidade e potencial para contribuir com a comunidade científica em uma área pouco investigada, a imobilização celular com partículas magnéticas, além de serem avaliados parâmetros de grande influência na integridade da imobilização celular por aprisionamento em matriz porosa, visando uma esfera de célula imobilizada resistente e de menor custo que possa ser utilizado em reator de leito fluidizado estabilizado magneticamente.

1.1 OBJETIVOS

Este trabalho possui como objetivo geral a imobilização celular por aprisionamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem comercial, com nanopartículas magnéticas de magnetita em alginato de cálcio.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Partindo do objetivo geral, são desmembrados os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Sintetizar e caracterizar a partícula de magnetita;
- ✓ Imobilizar a levedura com magnetita em alginato de cálcio;
- ✓ Caracterizar a esfera de célula imobilizada (levedura imobilizada em alginato de cálcio com magnetita);
- ✓ Verificar o comportamento magnético da esfera de célula imobilizada;
- ✓ Verificar se a presença da nanopartícula magnética influencia no consumo do substrato e na formação do produto durante a fermentação alcoólica;
- ✓ Testar a integridade das esferas em repetidos ciclos no modo batelada simples;
- ✓ Avaliar a produtividade das fermentações em modo batelada simples, utilizando a levedura imobilizada em alginato com magnetita.

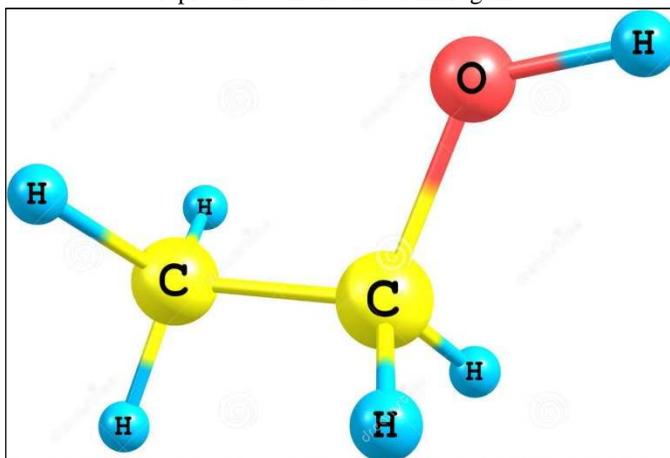
2 REVISÃO DA LITERATURA

Desde a mais remota antiguidade, o homem utilizava dos processos bioquímicos, porém sem ciência do que estava realizando. Foi quando Louis Pasteur demonstrou a verdadeira função dos organismos vivos nos processos já utilizados cotidianamente, que surgiu o interesse comercial em estudar e compreender os processos bioquímicos (AIBA; HUMPHREY; MILLIS, 1971; STANBURY; WHITAKER; HALL, 1995).

2.1 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Uma única célula é um complexo reator químico, no qual ocorrem mais de 1000 reações independentes. A fermentação alcoólica é realizada por certas bactérias e leveduras. Na fermentação alcoólica, a glicose é convertida em etanol (BAILEY; OLLIS, 1986). Na Figura 1 está representada a estrutura molecular do etanol (álcool etílico).

Figura 1 – Representação da estrutura molecular do etanol (C_2H_5OH), sendo “C” a molécula de carbono, “O” representa a molécula de oxigênio e “H” representa a molécula de hidrogênio



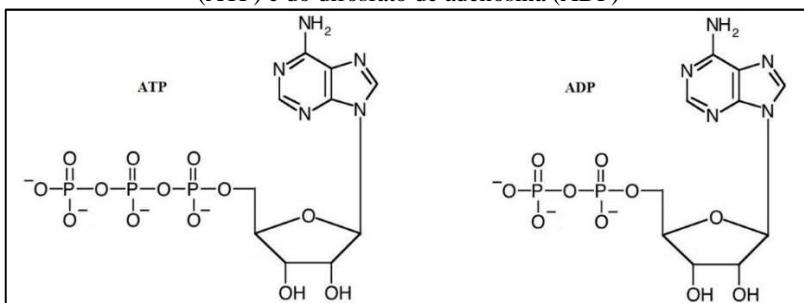
Fonte: adaptado de Dreamstime (2015).

Bruice (2006) relata que a síntese do material vivo exige o consumo de energia, sendo chamada de endergônica. A maioria dos fungos (incluindo levedura) e as bactérias obtém sua energia a partir da oxidação de nutrientes orgânicos. Em um organismo em fase de

crescimento, a energia é produzida por catabolismo (reações de degradação) e é transferida para uma cadeia de anabolismo (reações de síntese).

O transportador de energia livre, comumente, é o trifosfato de adenosina (ATP). A hidrólise de ATP em ADP (difosfato de adenosina) libera $7,3 \text{ kcal mol}^{-1}$ de energia. As leveduras obtêm seu ATP a partir da oxidação de açúcares. Na Figura 2 estão presentes as estruturas moleculares do trifosfato de adenosina (ATP) e do difosfato de adenosina (ADP).

Figura 2 – Representação das estruturas moleculares do trifosfato de adenosina (ATP) e do difosfato de adenosina (ADP)



Fonte: adaptado de Bruice (2006).

A glicólise (série de reações que transformam a glicose em piruvato) é constituída de duas fases. Na primeira fase, a glicose é convertida em frutose-1,6-bisfosfato e esta fase necessita de duas moléculas de ATP (BRUICE, 2006).

Na segunda fase da glicólise, ocorre a formação do piruvato, através da conversão da frutose-1,6-bisfosfato. Nesta fase, se utilizam as duas moléculas de ADP formadas na primeira fase da glicólise. A nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD^+) é o agente oxidante da fermentação alcoólica. O piruvato obtido da glicólise é descarboxilado em acetaldeído, o qual é reduzido em etanol (BAILEY; OLLIS, 1986; BRUICE, 2006).

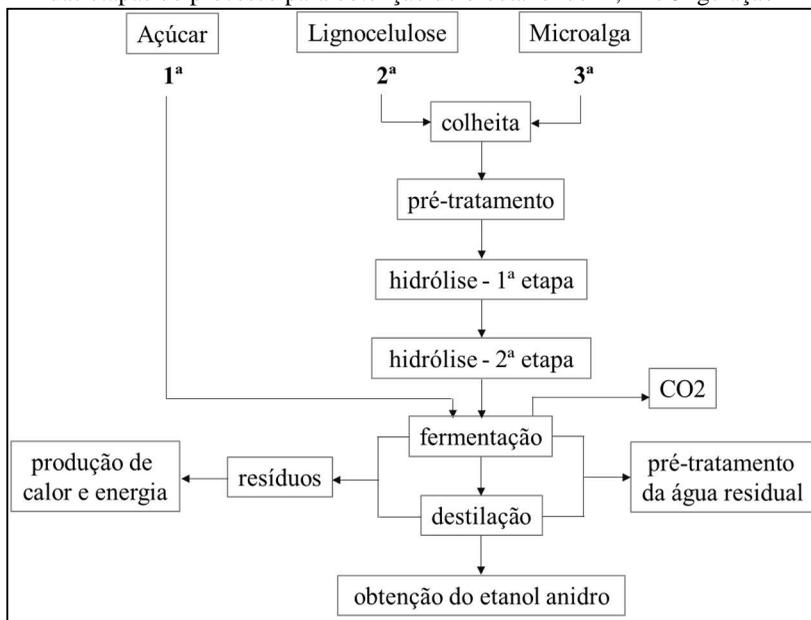
Durante a glicólise são produzidas quatro moléculas de ATP. Isto se deve ao fato de que a clivagem de frutose-1,6-bisfosfato produz duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato. A oxidação de cada molécula de gliceraldeído-3-fosfato em piruvato produz duas moléculas de ATP. Duas destas moléculas de ATP são utilizadas para a ativação de outra molécula de glicose. Com isto, têm-se o ganho de duas moléculas de ATP pela

glicólise a cada molécula metabolizada de glicose (BAILEY; OLLIS, 1986; BRUCE, 2006).

2.1.1 Etanol de 1ª, 2ª e 3ª geração

As gerações do bioetanol são definidas como sendo de 1ª, 2ª e 3ª geração. O que diferencia cada geração é a matéria-prima utilizada para a fermentação alcoólica, conforme descrição presente na Figura 3. No bioetanol de 1ª geração, a fermentação alcoólica é realizada a partir de matéria-prima a base de açúcares, como a cana-de-açúcar. No bioetanol de 2ª geração, a matéria-prima é lignocelulósica, sendo utilizados, principalmente, resíduos agroindustriais. E o bioetanol de 3ª geração é obtido, principalmente, de microalgas (ALAM; MOBIN; CHOWDHURY, 2015; BAEYENS et al., 2015).

Figura 3 – Esquema representativo das diferentes matérias primas utilizadas e das etapas do processo para obtenção do bioetanol de 1ª, 2ª e 3ª geração



Fonte: adaptado de Baeyens et al. (2015).

O etanol de 1ª geração, produzido em escala industrial, pode ser obtido tanto de açúcares quanto do amido. No Brasil, o etanol é obtido a partir da fermentação do caldo da cana-de-açúcar. O etanol oriundo do

amido é comumente obtido a partir de grãos como o milho, sendo este produzido por países como EUA, China, França, entre outros. Estima-se que a produção anual mundial de etanol de 1ª geração a partir de grãos seja de 60 milhões de m³, enquanto que a partir de cana-de-açúcar seja de 21 milhões de m³ (LENNARTSSON; ERLANDSSON; TAHERZADEH, 2014).

Uma alternativa adequada para os combustíveis fósseis é a produção de bioetanol a partir de resíduos agroindustriais (etanol de 2ª geração). As pesquisas neste contexto investigam a utilização de resíduos agroindustriais como fontes naturais de carbono para a fermentação alcoólica (DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA; TORRES-MUÑOZ; LÓPEZ, 2014).

Em relação ao etanol de 2ª geração, Aditiya et al. (2016) destacam que atualmente o foco das pesquisas é em etanol proveniente do resíduo de extração do óleo de palma, biomassa de arroz, leite de coco e biomassa de banana.

A biomassa do óleo de palma utilizada no trabalho apresentado por Ishola, Isroi e Taherzadeh (2014) foi proveniente dos resíduos da indústria. Inicialmente, os autores realizaram um pré-tratamento combinado de ácido fosfórico e biológico com o fungo *Pleurotus floridanus*. A levedura utilizada na fermentação alcoólica foi a *Saccharomyces cerevisiae* e o rendimento de etanol obtido nestas condições foi de 89,4% do máximo teórico.

A casca e a palha de arroz, também chamadas de biomassa de arroz, são abundantes no mundo devido a sua alta produção (ADITIYA et al., 2016). Singh, Bajar e Bishnoi (2014) avaliaram a produção de etanol a partir desta biomassa. Após pré-tratamento enzimático, a concentração inicial de açúcares redutores foi de 50 g L⁻¹ de meio. A fermentação alcoólica foi realizada pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* e pela sua co-cultura. As máximas conversões obtidas nestas condições foram 0,42 g_{etanol} g_{subs}⁻¹, 0,40 g_{etanol} g_{subs}⁻¹ e 0,36 g_{etanol} g_{subs}⁻¹, comprovando, assim, que dentre os microrganismos estudados, a *Saccharomyces cerevisiae* apresentou o melhor resultado.

Domínguez-Bocanegra, Torres-Muñoz e López (2014) investigaram a utilização de biomassa de abacaxi e leite de coco como meio para a produção de bioetanol sintetizado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* CDBB 790. Os rendimentos máximos obtidos foram de 22% utilizando a biomassa de abacaxi e 20% utilizando o leite de coco como meio de cultivo.

Oberoi et al. (2011) utilizaram casca de banana seca como substrato para produção de etanol por fermentação em estado sólido. Foi utilizado um único reator, tanto para o pré-tratamento enzimático, quanto para a fermentação em estado sólido. Isto contribuiu para o aumento na produção de etanol e economia no processo em geral, reduzindo tempo de operação e quantidade de operações unitárias. A levedura utilizada foi a *Saccharomyces cerevisiae*, obtendo conversão de $0,28 \text{ g}_{\text{etanol}} \text{ g}_{\text{subs}}^{-1}$.

As microalgas são a fonte de obtenção do etanol de 3ª geração, do biogás e do biodiesel. O biogás é obtido por meio do processo de degradação anaeróbica da biomassa e o biodiesel é obtido por meio dos lipídios que se acumulam nas células das algas. Já o bioetanol é comumente obtido das algas, as quais tendem a produzir açúcares e outros hidratos de carbono ao invés de lipídios (ALASWAD et al., 2015). As principais vantagens do etanol de algas é que elas não são utilizadas para alimento ou ração, como no caso da fonte de obtenção do etanol de 2ª geração, e podem ser cultivadas em terras não aráveis ou águas salinas (ALAM; MOBIN; CHOWDHURY, 2015).

2.1.2 Leveduras

As leveduras são formadas por uma única célula, sendo assim, elas crescem e se reproduzem rapidamente sendo por gemulação da célula-mãe ou por fissão. Por serem capazes de crescer tanto por processo aeróbio como anaeróbio, as leveduras são caracterizadas como microrganismos facultativo (FONSECA; TEIXEIRA, 2007). Em meio sólido, o crescimento das leveduras é semelhante à uma colônia de bactérias. O formato das células das leveduras pode ser esférico ou elíptico. Suas paredes celulares não contêm quitina e nem celulose. Com exceção do vírus, todos os microrganismos contêm, em média, 80% de água. De acordo com a análise química, as leveduras contêm 40-50% de proteína, 4-10% de ácido nucleico e 1-6% de lipídeos, sendo estas porcentagens em massa seca (AIBA; HUMPHREY; MILLIS, 1971).

Na formulação de um meio de cultura, deve-se optar pelo mais econômico, mas sem esquecer-se de suprir as exigências mínimas para o crescimento do microrganismo em questão. No crescimento da levedura, o composto mais importante na transformação de energia da célula, a adenosina trifosfato (ATP), é proveniente da oxidação de componentes orgânicos. As leveduras comumente produzem álcool ao metabolizar o substrato e elas não possuem a capacidade de assimilar nitrato (AIBA; HUMPHREY; MILLIS, 1971; FONSECA; TEIXEIRA, 2007).

Nos processos de fermentação alcoólica, as fontes de energia mais comumente utilizadas são o melão, a glicose, a sacarose, entre outros. Para a levedura, a fonte de carbono é suprida juntamente com a fonte de energia. Quando o metabolismo é completamente aeróbio, cerca de 50-55% da fonte de carbono é convertido em células. Quando o metabolismo é anaeróbio, apenas 10% do carbono do substrato é convertido em células (AIBA; HUMPHREY; MILLIS, 1971).

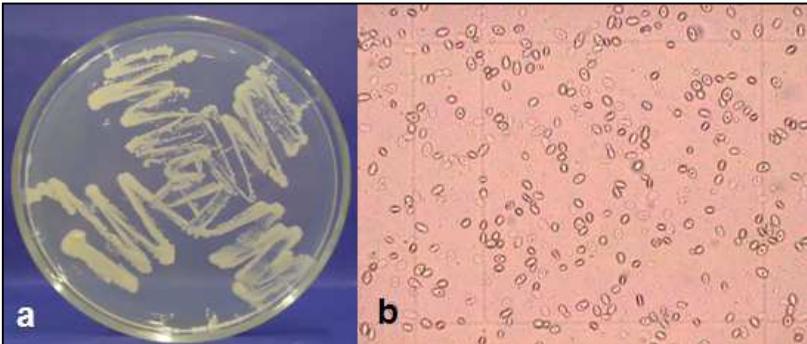
Como fonte de nitrogênio no meio de cultura, normalmente se utiliza amônia ou seus sais. Porém, a utilização de nitrogênio orgânico acelera o crescimento. Como exemplos economicamente viáveis deste pode-se citar a farinha de peixe, o extrato de levedura, o soro de leite, entre outros (AIBA; HUMPHREY; MILLIS, 1971).

A composição da biomassa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em termos dos elementos químicos maioritários é dada por $CH_{1,7}O_{0,46}N_{0,17}$. Seu coeficiente de saturação (K_S), obtido da equação de Monod, resulta em 25 mg L^{-1} , e o seu coeficiente de manutenção (m_s) em cultura descontínua anaeróbia é de $0,036 \text{ kg}$ de substrato por kg de célula a cada hora. Ambos os coeficientes foram obtidos em cultivos com a glicose como substrato.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é pertencente à família dos saccharomycetaceae, Reino Fungi. O genoma das leveduras *Saccharomyces* possui 6000 genes, sendo que mais de 2000 têm suas funções desconhecidas (FONSECA; TEIXEIRA, 2007).

Na Figura 4 ilustra-se a imagem macroscópica e microscópica (com aumento de $400\times$) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* da linhagem comercial.

Figura 4 – Fotografias de *Saccharomyces cerevisiae* comercial: (a) foto macro e (b) foto micro com aumento de $400\times$



Fonte: adaptado de Ortiz (2010).

2.2 IMOBILIZAÇÃO CELULAR

A imobilização de células pode ser definida como sendo a localização de células intactas em uma região específica ou como o confinamento destas células com a preservação de sua atividade catalítica (KAREL et al., 1985 apud KOURKOUTAS et al., 2004). A imobilização tende a imitar o que acontece naturalmente, pois muitos microrganismos possuem a capacidade de crescer sobre superfícies ou dentro de estruturas naturais (KOURKOUTAS et al., 2004). A vantagem mais evidente da utilização de células imobilizadas é a eliminação da etapa de separação da biomassa do produto final (KLEIN; VORLOP, 1983).

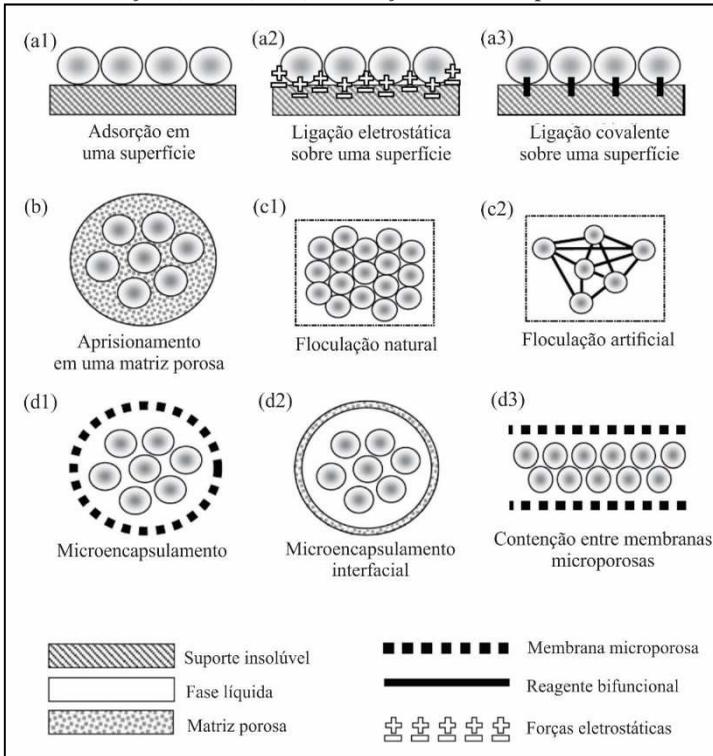
Com a imobilização celular é possível operar em processo contínuo. O suporte utilizado na imobilização pode atuar como protetor contra efeitos causados pela alteração de pH e de temperatura ocorridos no meio de cultivo. Em células imobilizadas, diminui-se o risco de contaminação (KOURKOUTAS et al., 2004).

Tanto em bactérias como em leveduras, a imobilização pode causar alterações no crescimento celular, na atividade metabólica e na fisiologia. Não se pode prever quais alterações irão ocorrer, ou mesmo a extensão das alterações causadas pela imobilização. Para facilitar a identificação destas alterações, alguns parâmetros são considerados, como, por exemplo, pressão osmótica, tensão superficial, morfologia celular, permeabilidade da membrana, entre outros. As diferenças morfológicas entre células de *Saccharomyces cerevisiae* livres e imobilizadas com alginato são atribuídas ao espaço limitante da imobilização. Nas células imobilizadas, a taxa de crescimento decai com o aumento de células no interior das esferas (KOURKOUTAS et al., 2004).

Norton e D'Amore (1994) sugerem que o aumento da tolerância das células imobilizadas ao etanol deve-se à existência da camada protetora resultante da imobilização. Cita-se também o fato de que em células imobilizadas ocorre a diminuição da atividade de água, acarretando em maior tolerância à compostos tóxicos.

Existem diversos tipos de métodos de imobilização descritos na literatura, os quais podem ser classificados em quatro categorias baseando-se no mecanismo físico utilizado. Na Figura 5 ilustra-se a representação destes métodos, que são: (a) fixação ou adsorção na superfície de um suporte sólido; (b) retenção dentro de uma matriz porosa (aprisionamento); (c) auto agregação pela floculação (natural) ou por ligações cruzadas (induzida artificialmente) e (d) contenção de células por barreiras (DEMAIN; SOLOMON, 1986; PILKINGTON et al., 1998).

Figura 5 – Representação dos diferentes métodos de imobilização celular, sendo (a) fixação ou adsorção na superfície de um suporte sólido; (b) retenção dentro de uma matriz porosa (aprisionamento); (c) auto agregação pela floculação (natural) e (d) contenção de células por barreiras



Fonte: adaptado de Kourkoutas et al. (2004).

Adsorção, aprisionamento em uma matriz porosa e ligação covalente são os três métodos de imobilização mais comumente utilizados em processos biológicos. Em processamentos de alimentos, a imobilização celular mais indicada é por aprisionamento, utilizando polímeros naturais como alginato, quitosana, pectina, entre outros. Estes polímeros possuem as vantagens de serem atóxicos, biocompatíveis e de baixo custo.

Em sistemas de células imobilizadas, um dos fatores de maior importância é a escolha do reator adequado. Esta decisão depende diretamente do tipo de suporte utilizado e do tipo de imobilização, assim como dos requisitos de transferência de massa e das condições do processo (GENISHEVA et al., 2014).

A imobilização celular tem sido proposta como metodologia de melhora da resistência da levedura durante a fermentação, de aumento da produtividade e de melhora da qualidade do produto, além de reduzir os impactos ambientais (KOSSEVA et al., 2009). Mallouchos et al. (2003) e Kourkoutas et al. (2004) relatam que o aumento de temperatura até 32 °C durante o processo de fermentação aumenta a ativação de células imobilizadas, podendo-se diminuir o tempo do processo. No entanto, pouco se relata na literatura sobre o efeito da pressão no processo fermentativo operado com células imobilizadas (GALANAKIS et al., 2012).

Com a utilização de técnica de policondensação da resina epóxi para a imobilização celular, obtém-se ligações covalentes com grande estabilidade mecânica e química. Os problemas desta técnica são a toxicidade do componente amino e o fato da cadeia polimérica possuir baixa porosidade. A toxicidade pode ser minimizada com a adição de um agente de cura antes da adição das células. A porosidade pode ser melhorada com a adição de um gel ionotrópico, como, por exemplo, o alginato. A gelificação ionotrópica também tem a função de controlar o tamanho e a forma da partícula formada (KLEIN; VORLOP, 1983).

Para a imobilização celular, não existe o melhor método de imobilização e nem o melhor suporte para todos os tipos de células. Cada caso deve ser avaliado individualmente, pois para cada qual se opta por um determinado método e suporte mais apropriados, especialmente se as células imobilizadas forem destinadas à indústria de bebidas ou alimentos pois, nestes casos, devem atender aos requisitos de segurança das agências governamentais (DEMAIN; SOLOMON, 1986; NORTON; VUILLEMARD, 1994 apud KOSSEVA, 2011). Os métodos químicos para a imobilização celular podem causar danos nas células devido às características tóxicas do componente químico utilizado (DEMAIN; SOLOMON, 1986).

Uma aplicação da imobilização celular é na produção de aminoácidos (L-ácido aspártico e ácido L-glutâmico), os quais são amplamente utilizados na medicina, na indústria alimentícia e na de cosméticos, além de serem base para a síntese de produtos químicos. Adicionalmente, na área da medicina, se utiliza a imobilização de células para a produção de antibióticos como, por exemplo, a penicilina G e a cefalosporina C. Para a produção de ácidos orgânicos, os quais são utilizados na indústria de alimentos e na medicina, a imobilização celular normalmente é utilizada na produção de ácido cítrico, ácido málico e ácido urocânico. Outra aplicação de células imobilizadas é na produção de álcoois, como o *n*-butanol e o etanol (DEMAIN; SOLOMON, 1986).

A imobilização celular também serve como proteção para as células contra o cisalhamento durante processos agitados. A utilização de células imobilizadas na produção de etanol em escala industrial ainda é limitada. Para que este uso seja expandido, necessita-se do desenvolvimento de metodologias de imobilização que sejam facilmente ampliadas (SWAIN et al., 2007).

A escolha do suporte para a imobilização é um fator importante, pois possui grande influência na atividade da célula imobilizada. O suporte deve ser de baixo custo, estável, não tóxico, reutilizável e permitir altas concentrações celulares. Dos diferentes métodos de imobilização, o aprisionamento de células em suportes poliméricos (gelatina, agarose, alginato de cálcio, k-carragena, entre outros) tem sido amplamente estudado para a produção de bioetanol (SWAIN et al., 2007).

Casca de arroz, palha de arroz e serragem foram avaliados como suportes em imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* no estudo de Cha et al. (2014). Neste estudo, a serragem foi considerada mais prática na imobilização, em termos de durabilidade em culturas agitadas a 150 rpm, contendo apenas 3,04 g L⁻¹ de células no meio. As células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em gel de agarose foram utilizadas por Tafurt-Cardona et al. (2015), atuando no estudo como agente de ligação na determinação seletiva de metilmercúrio (MeHg) em águas de rios.

Yu, Zhang e Tan (2007) utilizaram o bagaço do sorgo, na forma natural, sem tratamentos, como suporte na imobilização de *Saccharomyces cerevisiae*. O suporte foi mantido no reator sem rupturas por 20 dias, sendo que a concentração de células livres no efluente manteve-se abaixo de 5 g L⁻¹. A máxima produtividade da fermentação (16,68 g L⁻¹ h⁻¹ - 55% de conversão de glicose) foi obtida com 200 g L⁻¹ de glicose.

No estudo apresentado por Galanakis et al. (2012), os efeitos da temperatura e da pressão na fermentação alcoólica utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* da linhagem comercial imobilizada nos poros de pastilhas cilíndricas de γ -alumina (γ -Al₂O₃) foram investigados. O processo foi conduzido em batelada, durante 36 h. A maior produtividade de etanol obtida foi de ~ 1,67 g L⁻¹ h⁻¹, com processo mantido a 30 °C.

Outra opção de matriz para imobilização celular é o Lentikat®. Sua apresentação é em forma de pastilhas, sendo uma matriz constituída de álcool polivinílico (PVA) que possui alta estabilidade mecânica e elástica. O estudo apresentado por Mathew et al. (2014) teve por objetivo avaliar a produção contínua de bioetanol a partir do hidrolisado do bagaço de óleo de canola utilizando células de *Saccharomyces cerevisiae*

imobilizadas em Lentikat®. O estudo avaliou a concentração de substrato no meio fermentativo. A maior produtividade obtida foi de $12,88 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, com concentração de substrato de 60 g L^{-1} , sendo considerada pelos autores a melhor concentração de substrato dentre os valores avaliados.

Genisheva et al. (2014) estudaram o processo de vinificação envolvendo a fermentação alcoólica, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* comercial imobilizada em cascas e caules da uva branca, separadamente. O processo fermentativo com a levedura imobilizada nos suportes propostos mostrou-se mais eficiente do que o mesmo processo tradicionalmente realizado com células livres.

A imobilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* da linhagem AXAZ-1 em bagaço de malte deslignificado foi estudada por Kopsahelis, Kanellaki e Bekatorou (2007). A maior produtividade de etanol ($1,54 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) foram obtidas nas fermentações mantidas a temperatura de $15 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 25 h.

Singh et al. (2013) avaliaram a imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 174 em agarose e bagaço de cana-de-açúcar. Com a célula imobilizada em agarose, a produtividade resultou em $0,26 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e com a célula imobilizada em bagaço de cana-de-açúcar, a produtividade obtida foi de $0,42 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, sendo esta considerada a mais viável pelos autores.

Ganatsios et al. (2014) avaliaram a fermentação da maltose em temperaturas de $5 \text{ }^\circ\text{C}$ e $10 \text{ }^\circ\text{C}$ utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* AXAZ-1 livre e imobilizada em serragem de madeira deslignificada. Na fermentação conduzida a $10 \text{ }^\circ\text{C}$, as células imobilizadas apresentaram melhor produtividade em comparação com as células livres. Na fermentação conduzida a $5 \text{ }^\circ\text{C}$, as células livres foram incapazes de fermentar a maltose, enquanto que utilizando as células imobilizadas a fermentação ocorreu normalmente.

Os principais trabalhos explorados estão listados em ordem cronológica na Tabela 1, indicando os autores, o suporte utilizado e a linhagem de levedura.

Tabela 1 – Principais informações dos trabalhos explorados utilizando diferentes suportes para a imobilização de *Saccharomyces cerevisiae*

| Referência | Suporte | Microrganismo |
|--|---|--|
| Kopsahelis, Kanellaki e Bekatorou (2007) | bagaço de malte | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AXAZ-1 |
| Yu, Zhang e Tan (2007) | bagaço do sorgo | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| Galanakis et al. (2012) | γ -alumina | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| Singh et al. (2013) | agarose; bagaço de cana-de-açúcar | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> MTCC 174 |
| Cha et al. (2014) | casca de arroz; palha de arroz; serragem | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| Ganatsios et al. (2014) | serragem de madeira | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AXAZ-1 |
| Genisheva et al. (2014) | casca de uva branca; caules de uva branca | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| Mathew et al. (2014) | lentikat® | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| Tafurt-Cardona et al. (2015) | gel de agarose | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |

Fonte: elaborado pela autora (2017).

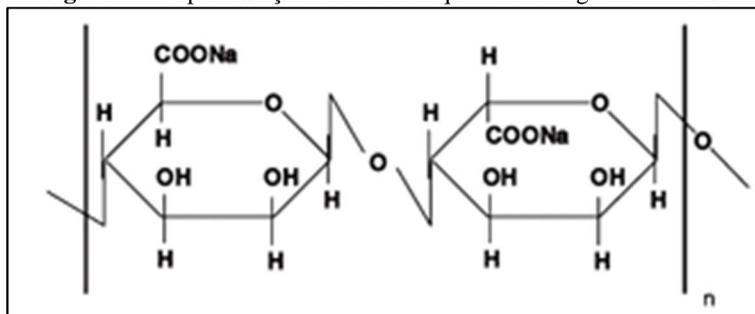
McGhee, Julian e Detroy (1982) realizaram um estudo utilizando células imobilizadas na fermentação alcoólica, comparando o processo em modo contínuo com o modo batelada (ciclos). Para a imobilização, foi utilizado 20 g (peso úmido) de levedura *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-2034 e 1 g de alginato de sódio, misturados com 100 mL de água destilada esterilizada. A concentração da glicose inicial contida no meio de cultivo foi de 100 g L⁻¹. A fermentação conduzida em modo contínuo obteve concentração de etanol de 48 g L⁻¹, não atingindo o rendimento máximo teórico, e mostrou-se inviável a partir de 40 dias de fermentação. Já a fermentação em modo batelada obteve concentração de etanol de 55,1 g L⁻¹, atingindo o rendimento máximo teórico, e mostrou-se viável por mais de 60 dias. Esta informação embasa a decisão presente neste trabalho de avaliar o processo em modo batelada.

2.2.1 Alginatos

O alginato é um copolímero linear pertencente a um grupo de polissacarídeos comumente extraído da parede celular de algas marinhas marrons (MACKIE et al., 2016). Sua estrutura química pode ser visualizada na Figura 6.

Compondo cerca de 40% da massa seca de várias espécies de algas marinhas (*Phaeophyta*), o alginato promove flexibilidade e rigidez à parede celular. Extrai-se anualmente 30 mil ton de alginato das algas marinhas, valor este que não atinge nem 10% do material naturalmente biossintetizado por elas (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008). A produção de alginatos em escala industrial iniciou-se na década de 1930 nos Estados Unidos (CARGILL, 2014).

Figura 6 – Representação da estrutura química do alginato de sódio



Fonte: adaptado de Souza, Peralta-Zamora e Zawadzki (2008).

Além de ser encontrado nas algas marinhas, um polímero semelhante ao alginato pode também ser sintetizado por bactérias (do gênero *Pseudomonas* e *Azotobacter*), diferindo apenas por ser mais acetilado. A acetilação possui grande influência nas propriedades reológicas e físico-químicas. Portanto, o conhecimento da fonte biológica do alginato é importante para seu uso em pesquisas e no setor industrial.

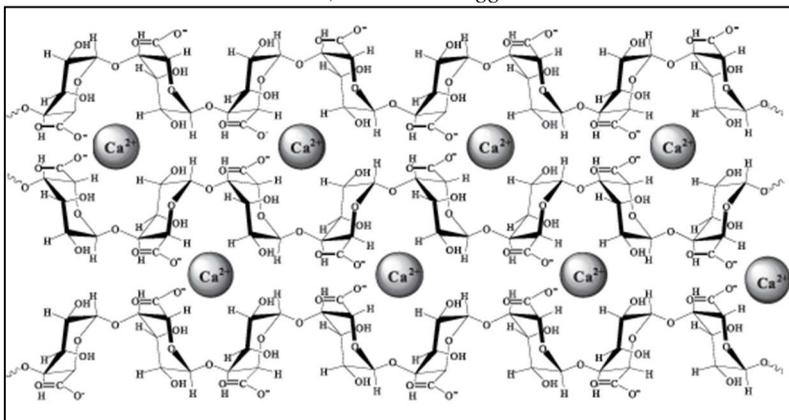
O alginato bacteriano foi descoberto em 1964 e acredita-se que sua produção permite obter materiais específicos (estrutura polimérica) com características uniformes (alta pureza), por ser realizada sob condições controladas e com substratos de qualidade. Através de dados experimentais, comprovou-se que as configurações glicosídicas do alginato de bactérias e do alginato de algas são similares (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008; MÜLLER; SANTOS; BRIGIDO, 2011).

O alginato é constituído de sais de ácidos algínicos, sendo estes o ácido manurônico (M) e o ácido gulurônico (G). Estes ácidos se ligam, formando blocos homopoliméricos M-M e G-G ou heteropoliméricos M-G. Esta ligação ocorre de acordo com a posição mais favorável energeticamente. A proporção dos blocos é dependente da espécie de alga marinha da qual se extrai o alginato. O comprimento e o número de blocos presentes determinam as propriedades físicas do material extraído (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008; CARGILL, 2014).

Os alginato de bário, de sódio e de cálcio são amplamente utilizados em encapsulamento celular, sendo o alginato de cálcio o mais adequado para utilização em fermentação alcoólica. Porém, para a produção de cerveja e de álcool potável, os alginatos não são mais utilizados na imobilização celular, pois este suporte causa alteração no aroma dos produtos finais (KOURKOUTAS et al., 2004).

O alginato de sódio é um composto amplamente utilizado em diversos setores por ser solúvel em água e tornar-se insolúvel na presença de cátions bivalentes (Ca^{++} ou Mg^{++} , por exemplo). Estes cátions se ligam entre os blocos homopoliméricos lineares (Figura 7) formando uma estrutura conhecida por *egg-box model* (modelo caixa de ovo), formando, assim, uma estrutura tridimensional gelatinosa, unida por íons de cálcio ou magnésio (SOUZA; PERALTA-ZAMORA; ZAWADZKI, 2008; CARGILL, 2014).

Figura 7 – Representação da ligação dos blocos de homopolímeros através de íons de cálcio, formando o *egg-box model*



Fonte: adaptado de Kawaguti e Sato (2009).

Este gel do alginato é capaz de formar micro leitos para incorporar tanto enzimas quanto células. Com isto, o alginato desperta interesse na biotecnologia, na área biomédica e na indústria de alimentos (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008).

O alginato é também utilizado na indústria de cosméticos, têxtil e de papel, tornando-se, assim, um produto de valor comercial. Na indústria de alimentos, acredita-se que a maior aplicação do alginato seja na produção de sorvete, na qual ele previne a cristalização, mantendo o produto mais homogêneo, além de ser utilizado em molhos para saladas e maioneses como estabilizante, evitando, assim, a separação das fases. Na área médica, o alginato é utilizado como excipiente para liberação de medicamentos, como material de impressão dental, entre outros diversos produtos farmacêuticos (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008; MÜLLER; SANTOS; BRIGIDO, 2011).

Devido ao fato de ser atóxico e de sua simplicidade de manuseio, o alginato de sódio é amplamente utilizado como suporte de imobilização (bactérias, leveduras). Um fator a ser considerado é que o gel de alginato limita a transferência de oxigênio no interior do gel, o que pode ser vantagem ou desvantagem, dependendo do tipo de biocatalisador retido (ZAIN; KOFLI; YAHYA, 2011). Uma das principais causas do rompimento das esferas de alginato é a ação de agentes quelantes, sendo este um problema simples de ser minimizado com a adição de mais íons de cálcio (Ca^{2+}) no meio (KAWAGUTI; SATO, 2009).

Na área biomédica e biotecnológica, desenvolvem-se pesquisas para utilizar o alginato em combinação com outros materiais. No trabalho de Finotelli et al. (2008), os autores avaliaram a combinação da biocompatibilidade do alginato com as propriedades magnéticas de nanopartículas de ferro e obtiveram um material que pode ser utilizado como suporte de medicamentos de liberação controlada por estímulos externos.

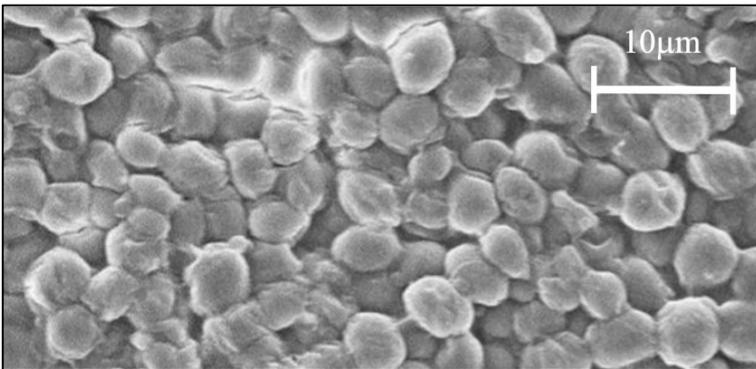
De acordo com o descrito por Cargill (2014), o processo de produção dos alginatos de algas marinhas baseia-se no fato de que o ácido algínico e seus sais de cálcio são pouco solúveis em água e os alginatos de sódio e de potássio são solúveis em água. O processo possui quatro principais etapas, iniciando pela desmineralização. Em seguida, ocorre a extração, a precipitação do ácido algínico e, por último, a neutralização e obtenção dos alginatos.

Sobre as propriedades mecânicas dos géis de alginato, assume-se que o coeficiente de Poisson seja igual a 0,5. Sendo assim, os géis são incompressíveis. Porém, não existe estudo que comprove este valor (SALSAC; ZHANG; GHERBEZZA, 2009).

A estabilidade mecânica de suportes de alginato em imobilização celular diminui ao longo do tempo. Isto pode ocorrer devido ao aumento de células na suspensão ou à baixa concentração de alginato no suporte. Para avaliação da atividade celular, deve-se considerar a área superficial, a porosidade e as propriedades hidrofóbicas das esferas formadas (KAWAGUTI; SATO, 2009). A viscosidade do alginato em solução diminui com o aumento da temperatura (CARGILL, 2014).

A morfologia da superfície das esferas imobilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* em alginato de cálcio (3,0 % $m v^{-1}$) pode ser observada na imagem presente na Figura 8, a qual foi obtida por microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 3000 \times (DUARTE et al., 2013).

Figura 8 – Eletromicrografia com ampliação de 3000 \times de uma esfera seca de *Saccharomyces cerevisiae* JAY 270 imobilizada com 3,0 % ($m v^{-1}$) de alginato de sódio



Fonte: adaptado de Duarte et al. (2013).

A casca de soja hidrolisada foi utilizada como fonte de substrato em fermentação alcoólica no trabalho descrito por Hickert et al. (2014). O microrganismo avaliado foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em alginato de sódio (4% $m v^{-1}$). A máxima conversão de substrato em produto foi de 88% e os autores concluíram que este resultado sugere ser viável o aumento de escala desde estudo.

Duarte et al. (2013) avaliaram a imobilização celular de *Saccharomyces cerevisiae* JAY-270 em alginato de sódio (3% $m v^{-1}$) em fermentação alcoólica utilizando glicose ou sacarose como substrato. As esferas imobilizadas permitiram seu reuso sem perda de eficiência por 8 bateladas de 10 h cada. Após 8 bateladas, as esferas apresentaram ruptura significativa, tornando-as impróprias para reuso. A conversão de substrato

em produto foi determinada a cada batelada, resultando em média de 64,5% tanto para a glicose, quanto para a sacarose como substrato.

Em outro estudo, o alginato de sódio foi preparado a partir de ácido algínico, água destilada e hidróxido de sódio. As porcentagens de alginato de sódio avaliadas foram de 2%, 3% e 4% (m v^{-1}), a levedura utilizada foi a *Saccharomyces cerevisiae* e os resultados foram avaliados após 8 h e 28 h de processo. A máxima conversão (80%) foi obtida utilizando-se 2% (m v^{-1}) de alginato de sódio na imobilização celular (CĂLINESCU et al., 2012).

Mathew et al. (2013) compararam a fermentação alcoólica de bagaço de canola hidrolisado utilizando células livres e imobilizadas de *Saccharomyces cerevisiae*. As matrizes de imobilização avaliadas foram alginato (5% m v^{-1}), Lentikat® e resíduos de cervejaria. As máximas conversões foram obtidas utilizando células imobilizadas em alginato (92,2%) e Lentikat® (90,2%), sendo que a imobilização em Lentikat® apresentou-se mais resistente.

O estudo comparativo da fermentação em batelada de flores de mahula com células livres e imobilizadas em alginato (4% m v^{-1}) é apresentado no trabalho de Swain et al. (2007). A fermentação alcoólica foi mantida por 24 h em temperatura de 30 °C utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CTCRI. Em análise quantitativa, a utilização de células livres e células imobilizadas não apresentou diferença significativa, sendo as conversões obtidas de 88,6% e 94,6%, respectivamente. Porém, em análise qualitativa, os autores destacam as vantagens da utilização de células imobilizadas devido ao baixo custo de recuperação e reúso, além da estabilidade celular.

Raei et al. (2015) avaliaram a influência da concentração de alginato (0,2% e 0,5%) na imobilização de lactoferrina isolada a partir de leite de camelo. A conclusão que os autores obtiveram foi que utilizando maior concentração de alginato, mais eficiente foi a imobilização.

A concentração de alginato em imobilização foi estudada também por Dong et al. (2014). Neste estudo, o objetivo foi imobilizar bactérias oxidantes de amônia. O intervalo de estudo foi de 3,0 a 5,0% (m v^{-1}). O melhor valor para a concentração de alginato determinado pelos autores foi de 4,5% (m v^{-1}). Valores abaixo deste resultaram em esferas pouco resistentes e valores acima resultaram em esferas duras, com pouca porosidade.

Ghorbani et al. (2011) utilizaram células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato de sódio (3% m v^{-1}) para produção de etanol a partir do melão de cana. A máxima conversão de substrato

em etanol obtida na fermentação conduzida em modo contínuo resultou em 96%, sendo considerada satisfatória pelos autores.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 174 foi imobilizada em alginato de sódio (4% $m v^{-1}$) no trabalho descrito por Singh et al. (2013). O meio de cultivo foi bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado. A fermentação alcoólica foi mantida por 72 h, porém com 36 h houve consumo total do substrato. No final da 4.^a batelada, o meio continha fragmentos das esferas, não sendo viável realizar mais bateladas. A máxima conversão foi obtida na 1.^a batelada (82,4%) e no final da 4.^a batelada a conversão foi de 64,7%.

No trabalho de Wu et al. (2014), a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Wu-Y2 foi imobilizada utilizando álcool polivinílico (9% $m v^{-1}$) e alginato de sódio (1% $m v^{-1}$). Para fins comparativos, a fermentação alcoólica foi conduzida com células livres e imobilizadas. As células imobilizadas apresentaram maior estabilidade operacional em relação às células livres. Após 48 h de fermentação, a eficiência de conversão de açúcares em etanol resultou em 87% para as células livres e 94% para as células imobilizadas, demonstrando o potencial das células imobilizadas.

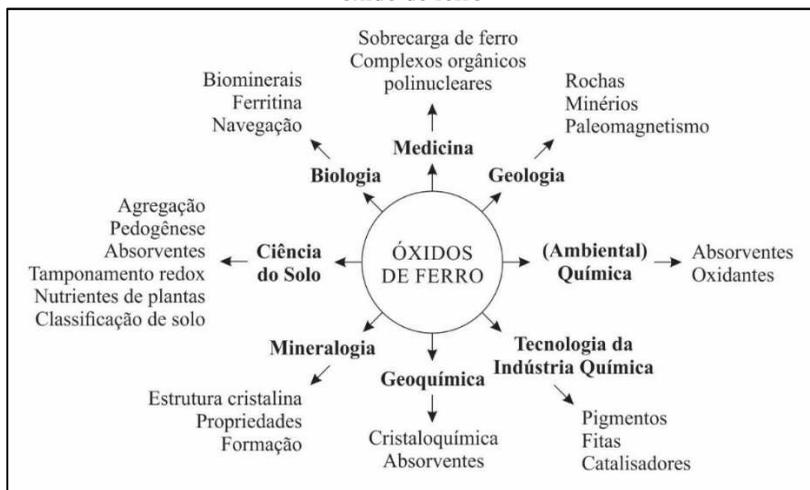
Jin, Liu e He (2012) avaliaram a produção de bioetanol a partir do caldo do talo de sorgo. As células de *Saccharomyces cerevisiae* CICC 1308 foram imobilizadas em alginato (2% $m v^{-1}$). A máxima conversão de substrato em produto foi de 51,7%, a qual os autores concluíram ser um resultado promissor para estudos futuros.

Estes trabalhos foram utilizados para a discussão dos resultados, sendo estas informações retomadas no item 4.3.3 de forma resumida com os dados dispostos na Tabela 11.

2.3 PARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Partículas magnéticas de óxidos de ferro são compostos comumente encontrados na natureza, além de poder ser sintetizados em laboratório. Eles estão presentes nas diversas esferas terrestres (atmosfera, biosfera, hidrosfera e litosfera). A consequência lógica desta distribuição generalizada é que diferentes áreas de pesquisas científicas demonstram interesse em óxidos de ferro, conforme descrito na Figura 9 (CORNELL; SCHWERTMANN, 2003).

Figura 9 – Esquema ilustrativo das diversas áreas de pesquisa que utilizam óxido de ferro



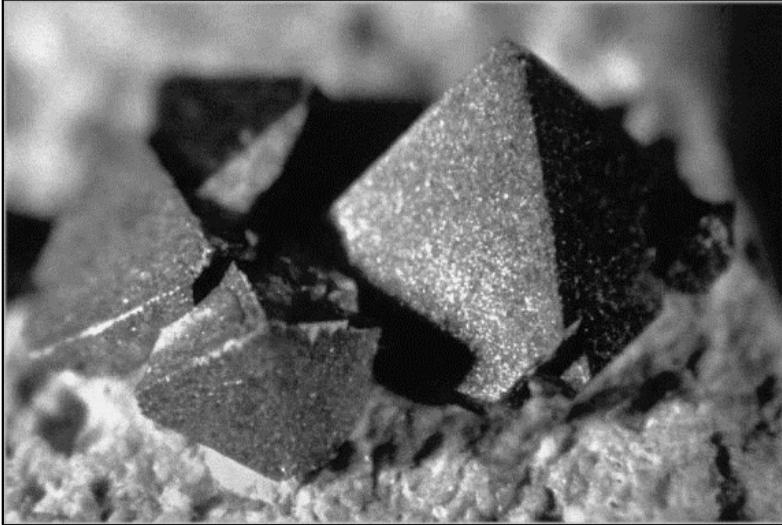
Fonte: adaptado de Cornell e Schwermann (2003).

2.3.1 Magnetita

De acordo com Silva, Souza e Costa (2010), a magnetita (Fe_3O_4) é um importante mineral ferrimagnético que ocorre nos solos e sedimentos, sendo formada por Fe II e Fe III. A magnetita apresenta coloração preta, como pode ser observado na Figura 10, possui estrutura de espinela inversa e sua densidade é de $5,18 \text{ g cm}^{-3}$.

A magnetita é conhecida também por óxido de ferro preto, minério de ferro magnético, óxido de ferro II e III, ferrite ferrosa, ímã natural, entre outros. Juntamente com a titanomagnetita, a magnetita é responsável pelas propriedades magnéticas das rochas (CORNELL; SCHWERTMANN, 2003).

Figura 10 – Imagem da aparência dos cristais pretos metálicos da magnetita

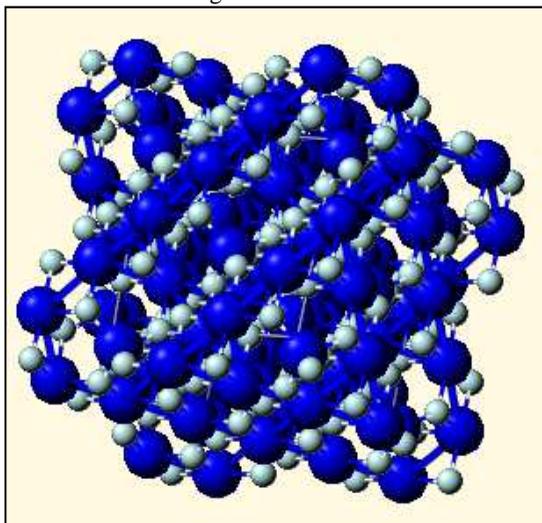


Fonte: adaptado de Perloff (2014).

A magnetita possui forma cristalina isométrica, sendo da classe hexaocáedrica. A partir de dados sobre a estrutura cristalina e a equação de estado de magnetita (pressão *versus* volume), Haavik et al. (2000) apresentaram dados de parâmetros estruturais refinados, o que possibilitou a simulação de um modelo da estrutura cristalina da magnetita. A magnetita, por se apresentar como material adsorvente, pode ser utilizada na recuperação de solos contaminados por resíduos industriais ou de mineração.

Na Figura 11 é apresentado um modelo da estrutura da magnetita, sendo em azul as moléculas de ferro e em branco as moléculas de oxigênio. Estima-se que a composição da magnetita é de 72,36% de ferro e 27,64% de oxigênio, sendo a distribuição em 31,03% de FeO e 68,97% de Fe₂O₃ (MAGNETITE MINERAL DATA, 2014).

Figura 11 – Ilustração do modelo da estrutura cristalina da magnetita, sendo que as moléculas de ferro estão representadas em azul e as moléculas de oxigênio em branco



Fonte: adaptado de Magnetite Mineral Data (2014).

Visando buscar alternativas para rejeitos magnéticos, Yang, Mun e Shim (2013) avaliaram a substituição da areia, na composição do concreto, por magnetita. Os autores afirmam que com o aumento da porcentagem de magnetita na composição do cimento e, conseqüentemente, menor porcentagem de areia, resultou um concreto com maior resistência mecânica e química e maior durabilidade, comparando-se com o concreto sem a adição de magnetita.

No trabalho apresentado por Horszczaruk, Sikora e Zaporowski (2015), os autores observaram que a presença de magnetita na composição do cimento diminui o impacto negativo que elevadas temperatura (~ 450 °C) causam nas propriedades mecânicas do material.

2.3.2 Suportes magnéticos

Até recentemente, os avanços na área de nanopartículas magnéticas se concentravam quase que exclusivamente na eletrônica, nos computadores e nas telecomunicações. Porém, atualmente, as nanopartículas magnéticas são estudadas para aplicações na biomedicina e bioengenharia (BEDÊ, 2010).

Para imobilização de biocatalisadores, os suportes magnéticos são mais favoráveis quando comparados com suportes não magnéticos, apresentando diversas vantagens. Além da facilidade de separação do suporte magnético, é possível a utilização de partículas extremamente pequenas. Com isto, viabiliza-se a utilização de partículas não porosas e, mesmo assim, pode-se manter a área superficial específica adequada para a imobilização do biocatalisador (LI et al., 2009).

Outra vantagem que pode ser citada, é que o suporte magnético pode ser utilizado em reatores de leito fluidizado magneticamente estabilizados, sendo assim uma opção em sistemas de reatores contínuos. Além disto, se utilizadas enzimas imobilizadas em partículas magnéticas em reatores de leito fluidizado, pode-se aumentar a taxa de diluição sem considerável perda de partículas (AL-HASSAN et al., 1991).

De acordo com Al-Hassan et al. (1991), a primeira vez que suportes magnéticos foram propostos para utilização em imobilização de biocatalisadores foi no trabalho de Robinson et al. (1973) apud Al-Hassan et al. (1991). Neste, o objetivo foi separar pequenas partículas imobilizadas de materiais insolúveis com o uso de dispositivos magnéticos. Dentre as possíveis aplicações de enzimas imobilizadas em suportes magnéticos, citam-se o processamento de resíduos, as fermentações, a hidrólise de carboidratos, as reações específicas de redução de compostos orgânicos, entre outras.

Os suportes magnéticos utilizados são tanto porosos quanto não porosos. Porém, os não porosos tendem a ser mais resistentes a incrustações e ao atrito que os suporte porosos. Os materiais não porosos mais comumente utilizados são o ferro, o cobalto e seus óxidos, sendo os métodos de preparação: adsorção, encapsulamento, uso de agente de acoplamento e formação de uma fina camada de polímero (AL-HASSAN et al., 1991).

Woo, Kwon e Lee (2015) utilizaram magnetita como suporte na imobilização de lipase. Após 10 ciclos, cerca de 80% da atividade inicial foi mantida. A recuperação das enzimas imobilizadas foi realizada por separação magnética.

As nanopartículas de magnetita foram avaliadas como suporte na imobilização química do ácido húmico e da albumina do soro humano por Bayrakci et al. (2014). Yusdy et al. (2009) utilizaram nanopartículas magnéticas como suporte na imobilização de lactato desidrogenase.

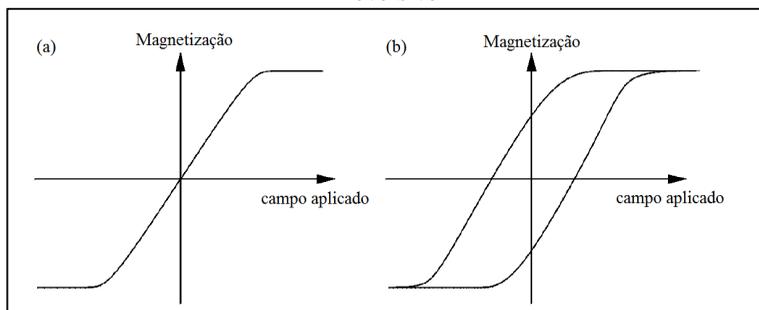
2.3.3 Propriedades magnéticas

Sinnecker (2000) descreve que a magnetização de materiais é determinada pelo balanço energético de diferentes tipos de energia. Dentre eles, o autor cita a energia magnetostática, a energia das fronteiras do domínio, a energia de anisotropia, entre outras. Estas energias afetam os locais e as direções da magnetização; sendo assim, afetam a magnetização total do material.

A curva de histerese (curva de magnetização) é uma forma de estudar os materiais ferromagnéticos, pois é possível observar o comportamento destes materiais quando submetidos a um campo magnético variável. Para a obtenção da curva de histerese, ocorre o ciclo de magnetização e desmagnetização do material. Na Figura 12 estão representadas as curvas de histerese reversível e irreversível (SMITH; HASHEMI, 2012).

Na curva reversível, mostrada na Figura 12 (a), é quando não ocorre perdas energéticas durante o processo de magnetização. Já na curva irreversível, como pode ser visualizado na Figura 12 (b), ocorre dissipação de energia, sendo esta, relacionada com a área interna formada durante o ciclo de magnetização e desmagnetização.

Figura 12 – Representação gráfica da curva de histerese: (a) reversível e (b) irreversível



Fonte: adaptado de Sinnecker (2000).

Com a aplicação deste campo magnético no material, é possível obter parâmetros para mensurar o momento magnético de um determinado material, como, por exemplo, a coercividade, a magnetização de saturação e a magnetização remanescente (RIBEIRO, 2000; SINNECKER, 2000).

A magnetização de saturação de um material é definida como sendo a intensidade da magnitude necessária para alinhar todos os momentos magnéticos. Ou seja, a saturação magnética é alcançada quando o material está completamente magnetizado. A coercividade está relacionada com a capacidade que o material apresenta em manter os momentos magnéticos em uma determinada posição, neste caso, alinhados. Sendo assim, é definida como o campo magnético necessário para remover a saturação magnética (SMITH; HASHEMI, 2012). A magnetização remanescente é definida como a magnetização que é retida no material após a aplicação e remoção do campo magnético (FONTANIVE et al., 2014).

2.4 REATOR DE LEITO FLUIDIZADO MAGNETICAMENTE ESTABILIZADO

Yang (2003) destaca que a principal característica dos reatores de leito fluidizado é que os sólidos se comportam como líquido. Para fins de processo, os sólidos podem ser tratados como fluido, permitindo a alimentação contínua. Operando de modo contínuo, aumenta-se a área de contato entre o sólido e o fluido, facilitando a transferência de calor e massa.

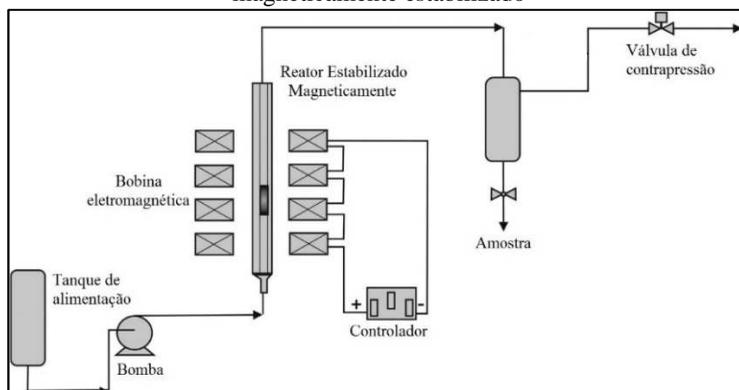
Porém, em reatores de leito fluidizado é importante determinar a velocidade ideal de alimentação, uma vez que o fluido pode arrastar a fase sólida, comprometendo o sistema operacional. A fluidização é uma ciência empírica, na qual apenas a modelagem pode não resolver problemas de operação. Em diversos casos é necessário ajustar parâmetros para cada fase líquida e fase sólida a serem utilizados (YANG, 2003).

Liu, Wang e Ou-Yang (2009) citam que o reator de leito fluidizado magneticamente estabilizado (MSFBR - *Magnetically Stabilized Fluidized Bed Reactor*) possibilita o aumento da velocidade do fluido, uma vez que a fase sólida apresenta maior resistência ao arraste. Sendo assim, a estabilização magnética apresenta-se mais vantajosa em processos que necessitem velocidades mais altas ou até mesmo contra fluxo. O MSFBR é considerado um sistema eficaz juntamente com enzimas ou células imobilizadas para otimização de biotransformações e biocatalises.

Zong et al. (2013) definem o reator de leito fluidizado magneticamente estabilizado como sendo constituído por partículas ferromagnéticas sujeitas a um campo magnético uniforme em relação ao espaço e ao tempo e espacialmente invariantes de tempo, dirigido na

direção axial em relação ao fluxo do fluido. Rossi et al. (2014) ilustram o MSFBR, conforme modelo presente na Figura 13.

Figura 13 – Representação do modelo de reator de leito fluidizado magneticamente estabilizado



Fonte: adaptado de Rossi et al. (2014).

O uso de partículas magnéticas em reatores de leito fluidizado elimina o problema do arraste de pequenas partículas, uma vez que estas estão estabilizadas pelo campo magnético. A intensidade do campo magnético é um parâmetro de grande importância, pois se for de alta intensidade, pode causar aglomeração das partículas na coluna, comprometendo o correto funcionamento do reator. Sendo assim, a intensidade deve ser a mínima possível para manter o sistema estabilizado, sem o risco de aglomeração ou arraste das partículas e sem comprometer a eficiência da reação (BAHAR; ÇLEBI, 2000).

Zong et al. (2013) compararam algumas características do reator de leito estabilizado magneticamente (MSFBR), do reator de leito fixo e do reator de leito fluidizado, conforme Tabela 2.

Tabela 2 – Dados comparativos entre reator de leito estabilizado magneticamente, de leito fixo e de leito fluidizado

| Reator | Investimento | Custo Operacional | Flexibilidade Operacional |
|------------------|--------------|-------------------|---------------------------|
| MSFBR | médio | médio | alta |
| Leito fixo | médio | baixo | baixa |
| Leito fluidizado | alto | alto | média |

Fonte: adaptado de Zong et al. (2013).

Este tipo de reator com campo magnético tem sido investigado, principalmente, para a relação gás-sólido, sendo que pouco se descreve para a relação gás-líquido e líquido-sólido. Pelos dados presentes na Tabela 3, o MSFBR apresenta vantagens operacionais (ZONG et al., 2013).

Atualmente, a aplicação de reator de leito fluidizado estabilizado magneticamente é variada, conforme breves exemplos apresentados na Tabela 3, demonstrando a flexibilidade de utilização deste modelo de reator.

Tabela 3 – Exemplos de aplicação de reator de leito fluidizado estabilizado magneticamente presentes na literatura.

| Referência | Aplicação |
|----------------------------|--|
| Liu, Wang e Ou-Yang (2009) | Produção de etanol |
| Bayramoglu et al. (2014) | Purificação de tripsina |
| Jovanovic et al. (2015) | Descloração de fenóis policlorados |
| Fidalgo et al. (2016) | Produção enzimática de biodiesel |
| Tian et al. (2016) | Aumento no crescimento de nanotubos de carbono |
| Hajar e Vahabzadeh (2016) | Produção de biolubrificantes |

Fonte: elaborado pela autora (2017).

Estes trabalhos são apenas alguns dentre os recentes publicados sobre o tema, que está em foco nas pesquisas científicas não apenas da área de engenharia bioquímica, mas como em diversas áreas da ciência.

2.5 ESTADO DA ARTE E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Neste item estão dispostas informações sobre as produções científicas relacionadas à utilização de material magnéticas em imobilização celular. De modo geral é possível observar que a aplicação de partículas magnéticas em imobilização celular é escassa na literatura.

Considerando o conteúdo apresentado na revisão da literatura, percebe-se que a maior parte das pesquisas que envolve o emprego da magnetita são referentes à imobilização de enzimas, sendo grande a carência de pesquisas de imobilização celular incluindo magnetita.

A imobilização por adsorção de *Saccharomyces cerevisiae* em magnetita foi estudada por Al-Hassan et al. (1991). O suporte magnético de magnetita (Fe_3O_4) foi coberto com uma camada do material aderente (carvão ativado em pó ou zeólito) com o auxílio de resina epóxi.

A suspensão de células foi misturada com o suporte magnético durante 3 h. Foram realizadas 6 bateladas de 42 h. O melhor resultado de conversão do substrato em etanol (84%) foi obtido utilizando carvão ativado como material aderente na imobilização celular.

Liu, Wang e Ou-Yang (2009) avaliaram a imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* GT4608 em pó de ferritas de manganês e zinco (5% m v⁻¹) com alginato de sódio (3% m v⁻¹). O parâmetro analisado foi a concentração de cloreto de cálcio na imobilização. Os resultados mostraram que em altas concentrações (4% a 8%), as esferas eram mais resistentes, porém apresentavam baixa produtividade em fermentação alcoólica. Os autores associaram esta baixa produtividade à barreira menos porosa que se formou, dificultando a transferência de massa. O melhor valor considerado para a concentração da solução de CaCl₂ foi de 2%. Na fermentação alcoólica utilizando a célula imobilizada no suporte magnético com o alginato, a conversão do substrato em etanol foi de 91,4%.

Células de *Escherichia coli* foram imobilizadas por adsorção em partículas de areia cobertas com magnetita no trabalho descrito por Al-Qodah et al. (2015). Neste trabalho, o foco foi avaliar tipos de suportes magnéticos. Os autores avaliaram dois suportes, sendo que um dos suportes consistia em núcleo de areia, uma camada interna de magnetita e uma camada externa de carvão ativado. O outro consistia em núcleo de areia, uma camada interna de magnetita e uma camada externa de cinzas volantes. Os autores concluíram que ambos os suportes se apresentaram viáveis na imobilização celular.

Na Tabela 4 consta um resumo dos principais trabalhos que avaliaram a imobilização celular em suportes magnéticos, listando os autores, o suporte avaliado e o respectivo microrganismo.

Tabela 4 – Principais trabalhos que avaliaram a imobilização celular em suporte magnético e os respectivos microrganismos imobilizados

| Referência | Suporte | Microrganismo |
|----------------------------|---|--|
| Al-Hassan et al. (1991) | magnetita com uma camada de carvão ativado em pó ou zeólito | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| Liu, Wang e Ou-Yang (2009) | pó de ferritas de manganês e zinco e alginato de sódio | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> GT4608 |
| Al-Qodah et al. (2015) | partículas de areia cobertas com magnetita | <i>Escherichia coli</i> |

Fonte: elaborado pela autora (2017).

Os poucos trabalhos presentes na literatura que avaliaram a imobilização celular com magnetita apresentaram resultados promissores, incentivando a realização do presente trabalho. O presente trabalho propõe o estudo da imobilização por aprisionamento, que se diferencia dos trabalhos citados.

O grande diferencial da imobilização por aprisionamento com partículas magnéticas é que mesmo se as esferas se partirem em pedaços menores durante o processo em reator de leito fluidizado estabilizado magneticamente, nenhuma parte será perdida, uma vez que todas as partes, por menores que sejam, possuem material magnético em sua composição.

Percebe-se também que a avaliação da integridade do suporte, a qual possibilita reutilização das células imobilizadas, é escassa. O presente estudo, além de imobilizar células com material magnético, avalia diferentes concentrações de alginato de sódio, visando manter a integridade do suporte em mais ciclos de fermentação, sem negligenciar a produtividade da fermentação.

Nestes quesitos, o presente trabalho se apresenta de caráter inovador e com potencial para contribuir com a comunidade científica em uma área pouco estudada. Sendo assim, sua execução é justificável.

3 METODOLOGIA

Neste capítulo estão descritas as metodologias utilizadas para a execução dos experimentos e para a análises das amostras coletadas durante o decorrer do estudo.

3.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA MAGNETITA

A etapa da síntese da magnetita foi realizada no Laboratório de Engenharia Bioquímica (EngeBio/UFSC).

A metodologia utilizada neste trabalho para a síntese da magnetita é baseada na metodologia proposta por Tie et al. (2006). Os reagentes utilizados foram: 11,0 g de sulfato de ferro II (FeSO_4), 5,7 g de oxalato de amônio ($\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4$), 16,0 g de sulfato de ferro III ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$), água destilada e álcool etílico.

Em um béquer, misturou-se o sulfato de ferro II e o oxalato de amônio em aproximadamente 100 mL de água destilada. Esta mistura foi colocada em banho termostático (90 °C), com agitação (800 rpm) até completa dissolução. Durante agitação, a mistura foi desoxigenada com nitrogênio. A temperatura da mistura permaneceu acima de 75 °C para a adição do sulfato de ferro III. Após esta adição, a mistura foi homogeneizada e o pH foi corrigido para 9,0 com hidróxido de amônio. A temperatura e a agitação foram mantidas por 1 h. Com auxílio de um magneto, a suspensão foi lavada três vezes com água destilada e uma vez com álcool etílico. Para finalizar, a mistura permaneceu em estufa (40 °C) até secar.

O tamanho médio das partículas sintetizadas foi determinado através da análise de imagens obtidas por microscopia de transmissão eletrônica (MTE). Esta análise foi realizada no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC), em equipamento JEM-1011, operando a 100 kV.

As amostras analisadas foram previamente preparadas misturando-se 100 mg de nanopartículas de magnetita, trituradas manualmente com auxílio de um almofariz com pistilo, em 10 mL de água destilada. Após breve agitação manual, esta dispersão foi submetida a tratamento ultrassônico com frequência de 25 kHz durante 3 min em temperatura ambiente. Este procedimento foi realizado visando a completa diluição, evitando assim a sobreposição e aglomeração das partículas, facilitando sua observação e análise. Em seguida, uma alíquota de 10 μL foi depositada em uma grade de cobre recoberta com filme de

carbono/Formvar® de 200 mesh e de diâmetro de 3,05 mm e mantidas em temperatura ambiente por 24 h para a evaporação da água excedente.

3.2 MICRORGANISMO

O microrganismo selecionado para ser utilizado neste estudo foi a levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (fonte comercial - Fleischmann).

3.3 IMOBILIZAÇÃO CELULAR

Esta etapa do experimento foi realizada no Laboratório de Engenharia Bioquímica (EngeBio/UFSC).

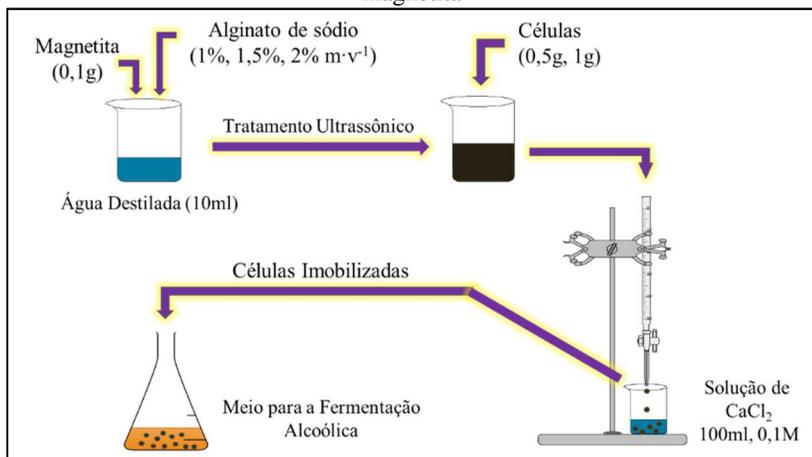
A técnica de imobilização celular avaliada neste trabalho foi a de aprisionamento em matriz porosa, sendo esta matriz sintetizada *in situ* em torno das células. A metodologia apresentada é baseada na descrição metodológica do trabalho de Teixeira (2011).

Inicialmente, preparou-se 10 mL de solução de alginato de sódio (concentração estipulada de acordo com o estudo em questão). Esta solução foi mantida em agitador magnético para a total dissolução dos grânulos. Então, as partículas magnéticas (100 mg), previamente trituradas manualmente com auxílio de um almofariz com pistilo, foram adicionadas. Após breve agitação manual, a suspensão alginato de sódio e partículas magnéticas foi submetida a tratamento ultrassônico com frequência de 25 kHz, juntamente com agitação mecânica de 600 rpm, durante 30 min para a completa dispersão. Em paralelo, preparou-se 100 mL de solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,1 M.

Na mistura alginato de sódio e magnetita, adicionou-se *Saccharomyces cerevisiae* (massa seca estipulada de acordo com o estudo em questão). Então, esta mistura foi adicionada em uma bureta e gotejada na solução de cloreto de cálcio com vazão de 3 mL min^{-1} , agitação manual e altura de gotejamento de 24 cm. As esferas formadas permaneceram por pelo menos 2 h imersas na solução a temperatura de 4°C e, então, foram lavadas com água destilada esterilizada, estando prontas para uso em processos fermentativos.

Conforme previamente descrito, na Figura 14 apresenta-se um esquema ilustrativo das principais etapas da imobilização celular em alginato e magnetita.

Figura 14 – Esquema ilustrativo da metodologia da imobilização celular com magnetita



Fonte: elaborado pela autora (2017).

3.4 CARACTERIZAÇÃO DA CÉLULA IMOBILIZADA

Neste item estão presentes as metodologias da caracterização da levedura imobilizada com magnetita em alginato de cálcio, sendo estes o estudo da absorção de água pela esfera imobilizada, a obtenção das imagens de microscopia eletrônica de varredura e a avaliação do comportamento magnético das esferas imobilizadas.

3.4.1 Estudo da absorção de água pela célula imobilizada

Este estudo foi realizado para verificar se as rachaduras observadas na fermentação alcoólica podem estar relacionadas com a absorção de água pela esfera de célula imobilizada. Para isto, fixou-se a agitação em 150 rpm e a concentração de células em 100 g L^{-1} . Os valores estudados para a concentração de alginato de sódio foram 1%, 1,5% e 2% ($\text{massa volume}^{-1} = \text{m v}^{-1}$). O teste foi realizado em 100 mL de água destilada estéril, mantido a temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 h.

As massas das esferas foram determinadas no início e no final do estudo, avaliando o volume de água absorvido e a situação visual das esferas. A medição do diâmetro foi realizada com aumento de 4 vezes de imagens fotográficas, conforme metodologia apresentada por Yang (2003).

Existem diversos métodos relatados na literatura para determinação da densidade de partículas porosas (ρ_p), porém, os resultados não diferem significativamente do método tradicional, além de serem demorados. Com isto, o método tradicional para determinação da densidade de partículas porosas (Equação 1) foi utilizado neste trabalho (YANG, 2003):

$$\rho_p = \frac{m_p}{v_p} \quad (1)$$

sendo m_p a massa da esfera (g) e v_p o volume que a esfera deslocaria se sua superfície fosse não porosa (cm³).

3.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV) são de grande interesse na caracterização de materiais metálicos e semicondutores pois permitem a observação da morfologia, de trincas, das camadas superficiais, da composição, da topografia, entre outros parâmetros de interesse qualitativo e quantitativo (LIMA, 2010 apud FONTANIVE et al., 2014).

A avaliação da superfície das esferas imobilizadas foi realizada por imagens obtidas através de microscopia eletrônica de varredura, equipamento modelo JEOL JSM-6390LV. As análises foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC).

As esferas foram mantidas em estufa a 60 °C por 24 h para remoção da umidade. Com auxílio de uma fita adesiva dupla face de carbono, as esferas secas foram fixadas nos *stubs* para serem recobertas com uma fina camada de carbono, estando prontas para análise no equipamento.

3.4.3 Magnetômetro da amostra vibrante (MAV)

Fontanive et al. (2014) definem um magnetômetro como sendo um equipamento composto por um conjunto de equipamentos utilizados para mensurar o momento magnético de um determinado material com a aplicação de um campo magnético pré-estabelecido.

Sendo assim, o comportamento magnético das esferas imobilizadas foi avaliado através da curva de magnetização, obtida a partir de ensaios de magnetização da amostra vibrante. As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Caracterização Magnética de

Materiais, localizado no Departamento de Física (UFSC), em magnetômetro da marca Magmet Systems, modelo 3473-70 Electromagnet, operando com campos magnéticos entre -20 kOe e 20 kOe.

3.5 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A etapa da fermentação alcoólica foi realizada no Laboratório de Engenharia Bioquímica (EngeBio/UFSC).

3.5.1 Meio fermentativo

O meio de cultivo foi composto por 100,0 g L⁻¹ de glicose (C₆H₁₂O₆), 1,0 g L⁻¹ de extrato de levedura, 10,3 g L⁻¹ de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), 0,5 g L⁻¹ de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄) e 0,5 g L⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄·7H₂O). O meio foi previamente esterilizado em autoclave por 15 min a 121 °C.

3.5.2 Condução do processo fermentativo

Para estes ensaios foram preparados 100 mL de meio de cultivo para 10 gramas de suporte imobilizado, proporção definida baseando-se nos resultados de Zain, Kofli e Yahya (2011). O meio e as esferas, contidos em erlenmeyers de 250 mL, foram colocados em incubadora à temperatura de 30 °C e a agitação foi definida de acordo com o estudo em questão.

3.5.3 Análise cinética da fermentação alcoólica

A velocidade instantânea do consumo de substrato (r_s) foi calculada pela Equação (2):

$$r_s = -\frac{dS}{dt} \quad (2)$$

sendo S a concentração de substrato em g L⁻¹ e t o tempo em horas. A velocidade específica de consumo de substrato (μ'_S), calculada tendo a concentração inicial de células como referência, é apresentada pela Equação (3):

$$\mu'_s = \frac{1}{X_i} \cdot \left(-\frac{dS}{dt} \right) \quad (3)$$

sendo X_i a concentração inicial de células em $g L^{-1}$, que corresponde à massa de células adicionada, pois como a célula é imobilizada, o crescimento celular ocorre no interior da esfera (NAJAFPOUR; YOUNESI; ISMAIL, 2004, JIN; LIU; HE, 2012).

O fator de conversão de substrato em produto foi determinado pela Equação (4):

$$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad (4)$$

As concentrações final e inicial do produto ($g L^{-1}$) são representadas por P_f e P_i . S_f e S_i correspondem às concentrações final e inicial do substrato ($g L^{-1}$), respectivamente. O termo P_i , correspondente à concentração inicial de produto (etanol), que foi considerada nula.

A produtividade (P_r) da fermentação alcoólica com células imobilizadas será obtida considerando a concentração final e inicial do produto (P_f e P_i) e o tempo final de fermentação (t_f), conforme descrito pela Equação (5):

$$P_r = \frac{P_f - P_i}{t_f} \quad (5)$$

O rendimento da fermentação alcoólica foi determinado conforme descrito pela Equação (6):

$$R = \frac{Y_{P/S}}{Y_{P/S}^*} \quad (6)$$

Para fins de cálculo, considera-se a massa específica do etanol de $789,3 g L^{-1}$, conforme descrito por Najafpour e Lim (2002). O fator de conversão máximo teórico ($Y_{P/S}^*$) foi utilizado como 0,51 grama de etanol por grama de glicose consumida, de acordo com a estequiometria da fermentação alcoólica, conforme Equação (7):



Sendo a massa molar do etanol 46 g mol^{-1} e da glicose 180 g mol^{-1} , o fator de conversão máximo teórico de substrato em produto foi calculado de acordo com a Equação (8):

$$Y_{P/S}^* = \frac{2 \times MM_{\text{etanol}}}{1 \times MM_{\text{glicose}}} = \frac{2 \times 46}{1 \times 180} = 0,51 \text{ g g}^{-1} \quad (8)$$

3.6 ESTUDOS DA FERMENTAÇÃO COM CÉLULAS IMOBILIZADAS COM NANOPARTÍCULAS

3.6.1 Determinação da concentração do substrato durante a fermentação alcoólica

Inicialmente realizou-se um ensaio de 24 horas, coletando-se amostras a cada 2 horas para a determinação da concentração de substrato. Com isto, é possível verificar se a presença da partícula magnética possui influência no processo fermentativo e na eficiência da imobilização celular com as partículas magnéticas.

Para este estudo, estipulou-se as quantidades para a imobilização celular sendo de 0,1 g de partículas magnéticas, 0,15 g de alginato de sódio ($1,5\% \text{ m v}^{-1}$) e 1,0 g de levedura em 10 mL de água destilada. A agitação foi mantida em 150 rpm durante a fermentação alcoólica. O ensaio foi realizado em duplicata. As amostras foram analisadas para determinar as concentrações do substrato (açúcares redutores).

Para a análise cinética da fermentação deste estudo, foram calculadas as velocidades instantâneas do consumo de substrato (r_s) pela Equação (2) e a velocidade específica de consumo de substrato pela Equação (3).

3.6.2 Avaliação da influência da concentração de alginato de sódio e da concentração celular na integridade da esfera imobilizada

De acordo com Xin et al. (2016), sabe-se que a camada de alginato interfere nas propriedades magnéticas de partículas magnéticas e que quando a célula é imobilizada por aprisionamento, o crescimento celular pode deformar o suporte. Por isto, realizou-se o estudo da influência da variação da concentração de alginato de sódio e da concentração celular durante o processo fermentativo.

Os valores avaliados para a concentração de alginato de sódio e para a concentração celular na etapa de imobilização estão dispostos na Tabela 5, expressos em g L^{-1} , sendo que se fixou em 10 mL o volume de

imobilizado a ser utilizado para 100 mL de meio de cultivo. A temperatura foi mantida em 30 °C e a agitação em 150 rpm.

Tabela 5 – Condição de imobilização de cada amostra, sendo estes o teor de alginato de sódio e a concentração de células

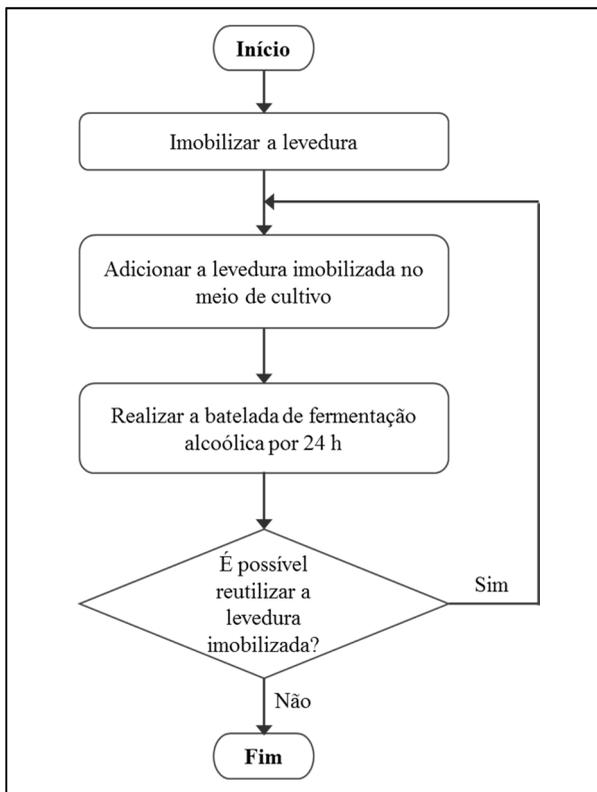
| Amostra | Alginato de Sódio (% m v⁻¹) | Concentração de Células (g L⁻¹) |
|----------------|---|---|
| A | 1,0 | 50 |
| B | 1,0 | 100 |
| C | 1,5 | 50 |
| D | 1,5 | 100 |
| E | 2,0 | 50 |
| F | 2,0 | 100 |

Fonte: elaborado pela autora (2017).

Todos os experimentos foram testados, se possível, em mais de 1 ciclo de 24 h, verificando-se, entre cada ciclo, a integridade das esferas visualmente. Para critérios de avaliação, considerou-se a presença de rachaduras nas esferas e a presença de fragmentos das esferas no meio de cultivo. O aumento ciclos de reutilização foi mantido enquanto os resultados visuais se mostrassem viáveis.

O fluxograma do processo de utilização da levedura imobilizada está representado na Figura 15, indicando a etapa que ocorre a tomada de decisão de reutilizar ou não as esferas, com base na avaliação qualitativa da integridade das mesmas.

Figura 15 – Fluxograma representativo do processo de utilização da levedura imobilizada com uma etapa de decisão



Fonte: elaborado pela autora (2017).

Foram coletadas amostras no final de cada batelada para análise da cinética da fermentação alcoólica. Para esta análise foram avaliados dois parâmetros, sendo estes a produtividade (Equação 5) e o rendimento da fermentação (Equação 6).

3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.7.1 Quantificação dos açúcares redutores

Para a quantificação dos açúcares redutores foi utilizado o método de quantificação em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 540 nm e o reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), proposto por

Miller (1959) e adaptado por Gonçalves et al. (2010) para sua realização em placas de micro titulação. A concentração dos açúcares redutores foi obtida através de uma curva padrão. As amostras foram lidas em espectrofotômetro modelo BEL SP1105 com comprimento de onda de 540 nm.

3.7.2 Quantificação da glicose, do etanol e do glicerol

As amostras coletadas durante a fermentação alcoólica foram centrifugadas por 10 min com velocidade de agitação de 3500 rpm na centrífuga de tubos Quimis modelo Q-222TM. O sobrenadante foi separado e filtrado em membrana millipore GSWP-01300, com porosidade de 0,22 μm e analisado para quantificação dos açúcares (sacarose, glicose e frutose), do etanol e do glicerol.

As análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras (UFSC) por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE (LC-2000 Plus, Jasco), com detector por índice de refração (RI-2031 Plus, Jasco). A coluna utilizada foi Bio-Rad Aminex® HPX-87H 300 mm por 7,8 mm, com solução de H_2SO_4 5 mmol L^{-1} , como fase móvel, a uma vazão de 0,3 mL min^{-1} e tempo de análise de 30 min para cada amostra.

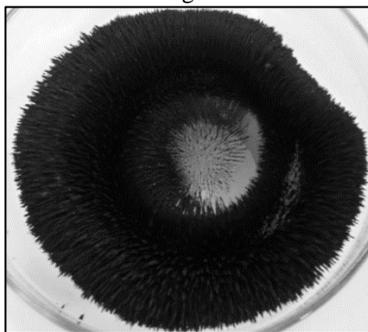
As curvas de calibração foram obtidas utilizando cinco diferentes concentrações (2,5; 5; 10; 30 e 50 g L^{-1}) para cada componente analisado. Os componentes analisados foram a glicose, o glicerol e o etanol, conforme metodologia proposta por Fernandes (2013).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA MAGNETITA

As partículas de magnetita foram sintetizadas conforme metodologia proposta e podem ser observadas na Figura 16, na qual as partículas apresentam-se dispostas em um béquer posicionado sobre um ímã circular, sendo atraídas pelo ímã.

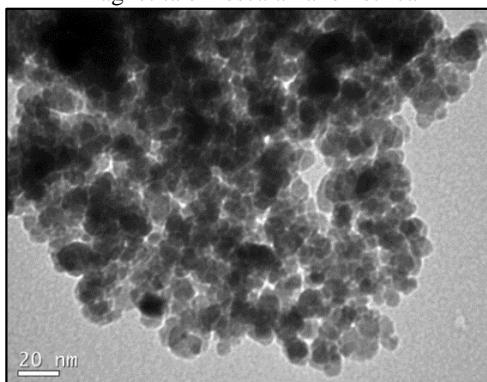
Figura 16 – Partículas de magnetita sendo atraídas pelo ímã



Fonte: elaborado pela autora (2017).

A Figura 17 apresenta o resultado da análise de microscopia de transmissão eletrônica (MTE) realizada para se obter imagem direta ampliada das partículas de magnetita sintetizadas.

Figura 17 – Imagem da microscopia de transmissão eletrônica das partículas de magnetita em escala nanométrica



Fonte: elaborado pela autora (2017).

Apesar do tratamento ultrassônico, algumas nanopartículas de magnetita estão parcialmente sobrepostas e aglomeradas, ou seja, o limite de cada partícula é indefinido. Com isso, o tamanho médio preciso das partículas não pode ser determinado. Porém, conforme observado na Figura 17, o tamanho de cada partícula situa-se em torno de 10 nm, caracterizando um material nanométrico, conforme proposto neste trabalho.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA CÉLULA IMOBILIZADA

Neste item estão presentes os resultados obtidos da caracterização das esferas de célula imobilizada com magnetita em alginato de cálcio. Os estudos referentes à caracterização são a absorção de água pela esfera imobilizada, as imagens obtidas da microscopia eletrônica de varredura e a avaliação realizada do comportamento magnético das esferas imobilizadas.

4.2.1 Absorção de água pela célula imobilizada

No estudo da absorção de água pela célula imobilizada, verificou-se a diferença da massa das esferas após 48 h imersas em 100 mL de água destilada estéril com agitação de 150 rpm e temperatura de 30 °C. O teor de água absorvido refere-se à massa de água retida pelo suporte em relação ao seu peso inicial. Em adicional, mediu-se o diâmetro das esferas, determinou-se o volume e a densidade (Equação 1). Os resultados apresentados na Tabela 6 foram obtidos em três condições: inicial (logo após a imobilização), final (após 48 h imersa em água destilada) e da esfera seca.

Tabela 6 – Propriedades da esfera imobilizada, de acordo com os diferentes teores de alginato de sódio adicionados no suporte na etapa de imobilização celular

| Propriedade | | Teor de alginato de sódio no suporte | | |
|--|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| | | 1% (m v ⁻¹) | 1,5% (m v ⁻¹) | 2% (m v ⁻¹) |
| Teor (%) | Água absorvida ^a | 55,5 | 57,4 | 48,2 |
| Massa (mg) 1 esfera | Inicial ^b | 58,4 ± 0,08 | 53,1 ± 0,07 | 41,2 ± 0,03 |
| | Final ^{a,b} | 90,8 ± 0,11 | 83,5 ± 0,02 | 61,0 ± 0,06 |
| | Esfera seca ^b | 5,0 ± 0,09 | 5,2 ± 0,05 | 5,8 ± 0,07 |
| Diâmetro (mm) 1 esfera | Inicial ^b | 3,1 ± 0,00 | 3,1 ± 0,02 | 3,1 ± 0,01 |
| | Final ^{a,b} | 4,0 ± 0,02 | 3,9 ± 0,01 | 3,9 ± 0,00 |
| | Esfera seca ^b | 0,7 ± 0,00 | 0,75 ± 0,01 | 0,9 ± 0,00 |
| Volume (mm ³) 1 esfera | Inicial ^c | 15,6 | 15,6 | 15,6 |
| | Final ^{a,c} | 31,1 | 33,5 | 33,5 |
| | Esfera seca ^c | 0,18 | 0,22 | 0,38 |
| Densidade (mg mm ⁻³) 1 esfera | Inicial ^c | 3,7 | 3,4 | 2,6 |
| | Final ^{a,c} | 2,7 | 2,7 | 1,9 |
| | Esfera seca ^c | 27,8 | 23,5 | 15,2 |

^a Após 48 h. ^b Foram analisadas 10 esferas de cada teor de alginato.

^c Calculados a partir das médias da massa e do diâmetro.

Fonte: elaborado pela autora (2017).

Pode-se perceber que utilizando maior teor de alginato de sódio na imobilização (2% m v⁻¹), a porcentagem de água absorvida é menor. Najafpour, Younesi e Ismail (2004) avaliaram a influência do teor de alginato (1,5%, 2%, 3% e 6%) na imobilização de *Saccharomyces cerevisiae*. As esferas de célula imobilizada com 1,5% de alginato na imobilização apresentaram pouca integridade e pouca estabilidade. Esferas com 6% de alginato apresentaram muita rigidez e houve baixo consumo de substrato. Com isto, os autores constataram que com o aumento da concentração de alginato de sódio, obtém-se um suporte menos poroso para a transferência de água e, conseqüentemente, de nutrientes.

Liu, Wang e Ou-Yang (2009) avaliaram a influência da concentração de cloreto de cálcio, com alginato de sódio (3% m v⁻¹), na imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* GT4608. Os resultados mostraram que em altas concentrações de cloreto de cálcio (4% a 8%), as esferas eram mais resistentes, porém a fermentação alcoólica apresentava baixa produtividade de reação. Sendo assim, a baixa produtividade foi associada à barreira menos porosa que se formou, a qual dificultou a transferência de massa.

Em relação ao diâmetro inicial das esferas (3,1 mm), os resultados são próximos dos apresentados por Liu, Wang e Ou-Yang (2009), no qual os autores relatam que as esferas de *Saccharomyces cerevisiae* GT4608 imobilizadas em alginato e pó de ferritas de manganês e zinco mediam 3,2 mm. Ghorbani et al. (2011) e Najafpour, Younesi e Ismail (2004) relatam que o tamanho da esfera de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada somente com alginato foi de 5,0 mm em média.

Foi possível verificar que a absorção de água pelo suporte imobilizado não causa as rachaduras presentes no suporte durante a fermentação alcoólica. O aumento na massa de água retida pelas células imobilizadas causou aumento do diâmetro das esferas de 0,9 mm para o suporte que contém 1% ($m v^{-1}$) de alginato de sódio e um aumento de 0,8 mm para os suportes com 1,5% e 2% ($m v^{-1}$) de alginato.

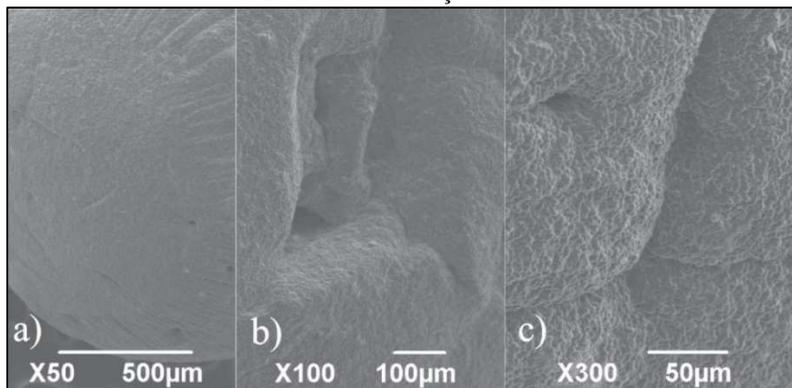
A densidade da esfera seca imobilizada com menor teor de alginato ($27,84 \text{ mg mm}^{-3}$) é maior que a esfera que contém maior teor de alginato ($15,2 \text{ mg mm}^{-3}$). Isto pode ser explicado pelo fato de que, por conter menos alginato na composição da mistura para a imobilização, o espaço na esfera é ocupado por partículas magnéticas durante o gotejamento. Sendo assim, quanto mais alginato de sódio, menos partículas magnéticas estariam presentes em cada esfera unitária imobilizada.

4.2.2 Análise da microscopia eletrônica de varredura

As imagens obtidas da microscopia eletrônica de varredura estão presentes nas Figuras 18 e 19 e foram obtidas das esferas secas imobilizadas com 1,0 % ($m v^{-1}$) de alginato de sódio, 100 g L^{-1} de *Saccharomyces cerevisiae* e nanopartículas de magnetita após 2 ciclos de reutilização em fermentação alcoólica. Na Figura 18 estão ilustradas as ampliações de $50 \times$, $100 \times$ e $300 \times$.

Analisando as imagens da Figura 18 é possível observar que a superfície é rugosa e irregular, com a presença de cavidades de diferentes formatos e tamanhos. Estas cavidades podem ser originadas pelo crescimento celular ocorrido no interior das esferas, como descrito por Vilela et al. (2012). Zimmermann (2001) relata que estas cavidades podem ser originárias da secagem do alginato. Neste trabalho, ambas as causas são consideradas válidas para as cavidades presentes na esfera seca.

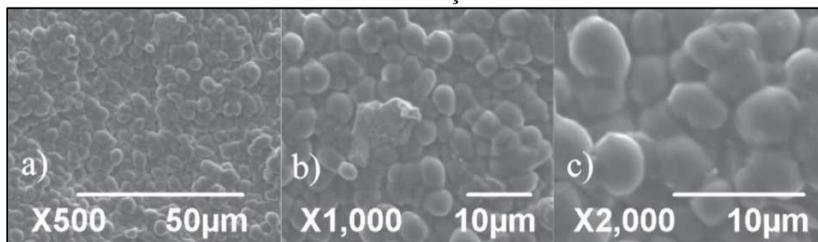
Figura 18 – Eletromicrografia com ampliação de (a) 50 ×, (b) 100 × e (c) 300 × de uma esfera seca immobilizada com 1,0 % (m v⁻¹) de alginato de sódio, 100 g L⁻¹ de *Saccharomyces cerevisiae* e magnetita após 2 ciclos de reutilização de 24 h em fermentação alcoólica



Fonte: elaborado pela autora (2017).

Na Figura 19 estão ilustradas as ampliações de 500 ×, 1000 × e 2000 × de uma esfera immobilizada com 100 g L⁻¹ de *Saccharomyces cerevisiae*, magnetita e 1,0% (m v⁻¹) de alginato de sódio após 2 ciclos de 24 horas cada.

Figura 19 – Eletromicrografia com ampliação de (a) 500 × (b) 1000 × e (c) 2000 × de uma esfera seca immobilizada com 1,0% (m v⁻¹) de alginato de sódio, 100 g L⁻¹ de *Saccharomyces cerevisiae* e magnetita após 2 ciclos de reutilização de 24 h em fermentação alcoólica



Fonte: elaborado pela autora (2017).

Observando-se as imagens presentes na Figura 19 é possível confirmar a eficiência da ligação entre as nanopartículas de magnetita, o alginato e as células de levedura, formando aglomerados de tamanho médio de ~ 5 μm. Os resultados estão coerentes com os relatados no

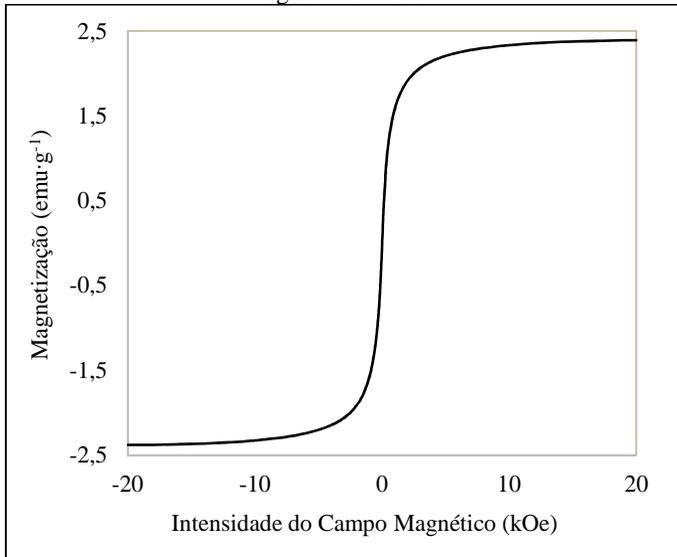
trabalho de Duarte et al. (2013), no qual a levedura *Saccharomyces cerevisiae* JAY-270 foi imobilizada somente com alginato 3% (m v^{-1}). Os aglomerados relatados pelos autores possuíam tamanho médio similar ao deste trabalho, indicando que a presença da magnetita não interferiu no processo de imobilização da célula.

Não foi encontrado na literatura trabalho similar de caracterização de esfera de levedura imobilizada com material magnético para a discussão destes resultados.

4.2.3 Análise das propriedades magnéticas

O comportamento magnético das esferas de células imobilizadas em função da intensidade do campo magnético aplicado foi determinado por meio da curva de histerese, a qual está ilustrada na Figura 20.

Figura 20 – Curva de histerese da levedura imobilizada com magnetita e alginato de cálcio



Fonte: elaborado pela autora (2017).

Analisando-se a curva de histerese presente na Figura 20, é possível afirmar que a presença do alginato e da levedura não influenciou na magnitude da magnetita, uma vez que a curva apresenta característica reversível, indicando que não houve perda energética com a aplicação do campo magnético variável. A partir desta curva, obtiveram-se os valores

da magnetização de saturação (M_s), da coercividade (H_c) e da magnetização remanente (M_r). Os valores destes parâmetros para as esferas imobilizadas com magnetita em alginato estão presentes na Tabela 7, na qual apresentam-se também os valores dos mesmos parâmetros para a nanopartículas de magnetita, conforme descrito por Henriques (2016), que utilizou a mesma metodologia para síntese da partícula.

Tabela 7 – Valores da magnetização de saturação (M_s), da coercividade (H_c) e da magnetização remanente (M_r) da magnetita e das esferas imobilizadas com magnetita em alginato

| Amostra | M_s (emu g ⁻¹) | H_c (Oe) | M_r (emu g ⁻¹) |
|---------------------------------------|------------------------------|------------|------------------------------|
| Magnetita (HENRIQUES, 2016) | 57,0 | 750 | 0,027 |
| Esferas imobilizadas com magnetita | 2,393 | 4,57 | 0,007 |

Fonte: elaborado pela autora (2017).

Os valores presentes na Tabela 7 indicam a necessidade de maior intensidade de campo magnético aplicado para que se possa manter a estabilidade magnética das esferas imobilizadas com magnetita em alginato, como por exemplo, manter as esferas suspensas no reator. Isto devido a presença dos componentes não magnéticos no suporte, ou seja, o alginato de cálcio e a levedura.

No trabalho apresentado por Liu, Wang e Ou-Yang (2009), os autores avaliaram a produção de etanol com *Saccharomyces cerevisiae* GT4608 imobilizadas em pó de ferrita de manganês zinco (5% m v⁻¹) com alginato de sódio (3% m v⁻¹) em reator de leito fluidizado magneticamente estabilizado. O volume do reator utilizado no estudo foi de 2,76 L e possuía duas bobinas nas laterais de fio de cobre de 10 cm de altura com capacidade para produzir um campo magnético de intensidade máxima de 500 Oe.

De acordo com Jiles (2015), a magnetização de saturação da ferrita manganês zinco é ~ 48,3 emu g⁻¹ e sua coercividade é ~ 335 Oe, sendo ambas menores que a da magnetita utilizada no presente trabalho. Liu, Wang e Ou-Yang (2009) não avaliaram as propriedades magnéticas do suporte imobilizado, tornando inviável a comparação entre os trabalhos. Porém, os autores descrevem que durante os experimentos, a intensidade máxima necessária foi de 120 Oe, menos de 25% da capacidade total projetada para o reator.

Sendo assim, pode-se afirmar que as esferas imobilizadas com a magnetita avaliadas neste trabalho possuem propriedades magnéticas válidas para serem aplicadas em reator de leito fluidizado magneticamente estabilizado, conforme modelo previamente proposto pela literatura.

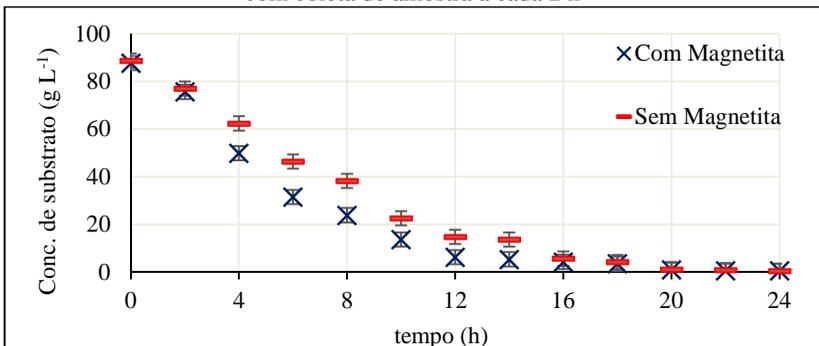
4.3 ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA PARTÍCULA MAGNÉTICA NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

4.3.1 Cinética do consumo na fermentação alcoólica

Para verificar se a presença das partículas magnéticas possui influência na cinética do processo fermentativo, foi realizada a fermentação com a levedura imobilizada em alginato juntamente com as nanopartículas magnéticas. A fermentação com a levedura imobilizada somente em alginato foi realizada para fins comparativos.

Na Figura 21 apresentam-se os respectivos gráficos da concentração do substrato (açúcares redutores) *versus* o tempo de fermentação. Em ambos, é possível observar comportamento similar, alcançando concentração aproximadamente nula de substrato no tempo proposto de estudo.

Figura 21 – Concentração de substrato ao longo do tempo de fermentação com célula imobilizada sem a presença da magnetita e com a presença da magnetita com coleta de amostra a cada 2 h



Fonte: elaborado pela autora (2017).

As velocidades do consumo de substrato (r_s) foram calculadas conforme Equação (2) descrita no item 4.5.3. Na Tabela 8 estão

apresentados os valores obtidos para as velocidades instantâneas de consumo de substrato para a fermentação alcoólica conduzida com células imobilizadas sem a presença da magnetita e com a presença da magnetita, considerando o intervalo de tempo de 4 h de fermentação.

Tabela 8 – Velocidades de consumo de substrato da fermentação alcoólica conduzida com células imobilizadas sem a presença da magnetita e com a presença da magnetita para os respectivos intervalos de tempo de fermentação

| Intervalos de tempo (h) | Imobilização sem magnetita (g L⁻¹ h⁻¹) | Imobilização com magnetita (g L⁻¹ h⁻¹) |
|--------------------------------|---|---|
| 0 – 4 | 6,58 | 9,46 |
| 4 – 8 | 6,03 | 6,50 |
| 8 – 12 | 5,87 | 4,39 |
| 12 – 16 | 2,27 | 0,50 |
| 16 – 20 | 1,12 | 0,83 |
| 20 – 24 | 0,17 | 0,10 |

Fonte: elaborado pela autora (2017).

A velocidade específica média de consumo de substrato, para ambos os casos, foi calculada pela Equação (3) descrita no item 4.5.3, considerando o tempo total de fermentação (24 h) e a concentração inicial e final de substrato. Conforme descrito anteriormente, a concentração de células foi considerada a inicial (10 g L⁻¹), uma vez que as análises de concentração celular no meio de cultivo resultaram na ausência de células no meio.

Para a fermentação alcoólica conduzida com células imobilizadas sem partículas magnéticas, a velocidade específica de consumo de substrato resultou em 0,3674 g g⁻¹ h⁻¹. Para a fermentação alcoólica conduzida com células imobilizadas juntamente com partículas magnéticas, a velocidade específica de consumo de substrato resultou em 0,3631 g g⁻¹ h⁻¹.

A partir desta análise cinética pode-se afirmar que a presença da nanopartícula magnética não possui influência significativa no processo fermentativo ao se analisar o consumo de substrato. Al-Hassan et al. (1991) obtiveram a mesma resposta em seu estudo, no qual afirmaram que as partículas magnéticas não possuem efeitos adversos nas células de levedura, pois as mesmas exibem comportamento catalítico semelhante ao de células de leveduras sem a presença de materiais magnéticos.

Na análise visual, não se percebeu a presença de espuma ou qualquer outra alteração no meio de cultivo. Após 24 h de cultivo, as

células imobilizadas com as partículas magnéticas apresentavam atração pelo ímã e rachaduras, conforme pode ser visualizado na Figura 22.

Figura 22 – Esferas de células imobilizadas com as partículas magnéticas sendo atraídas pelo ímã após 24 horas de cultivo



Fonte: elaborado pela autora (2017).

Pode-se observar na Figura 22 que as esferas não se desfizeram durante o processo fermentativo com a ação da agitação, deformando-se apenas devido ao crescimento celular interno na esfera, uma vez que não havia células no meio de cultivo.

4.3.2 Avaliação qualitativa da influência da concentração de alginato de sódio e da concentração celular no processo fermentativo

Conforme dados apresentados no item anterior, o estudo das condições de imobilização (variação no teor de alginato e na concentração de levedura) durante a fermentação alcoólica mostra-se viável. Na Tabela 9 estão presentes os resultados da quantidade de ciclos que foi possível realizar com cada uma das condições estudadas.

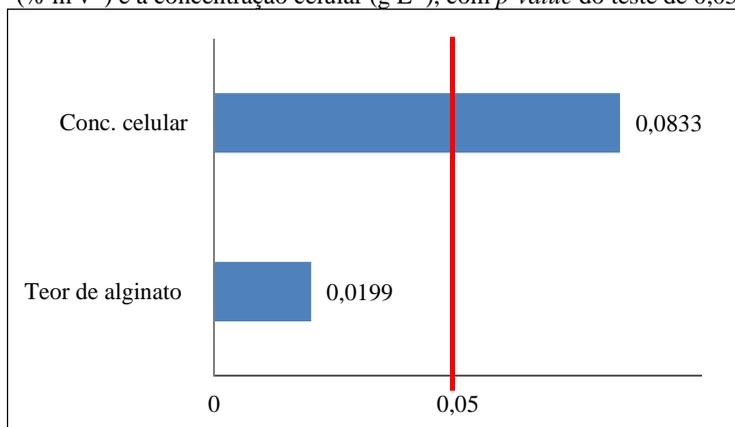
Tabela 9 – Condições de imobilização com a magnetita e quantidades de ciclos de reutilização de cada amostra avaliada

| Amostra | Condição de Imobilização | | Ciclos de 24 h |
|---------|---------------------------------|-------------------------------|----------------|
| | Alginato (% m v ⁻¹) | Levedura (g L ⁻¹) | |
| A | 1,0 | 50 | 2 |
| B | 1,0 | 100 | 2 |
| C | 1,5 | 50 | 4 |
| D | 1,5 | 100 | 2 |
| E | 2,0 | 50 | 4 |
| F | 2,0 | 100 | 2 |

Fonte: elaborado pela autora (2017).

Para fins de análise, considerou-se como viável a condição que atingiu 4 ciclos de 24 horas e inviável a condição que atingiu 2 ciclos. O resultado do Teste Qui-quadrado para as duas variáveis estudadas para a imobilização celular, sendo estas o teor de alginato (% m v⁻¹) e a concentração celular (g L⁻¹), está presente na Figura 23, indicando o *p-value* do teste igual a 0,05.

Figura 23 – Resultado do Teste Qui-quadrado para as variáveis teor de alginato (% m v⁻¹) e a concentração celular (g L⁻¹), com *p-value* do teste de 0,05



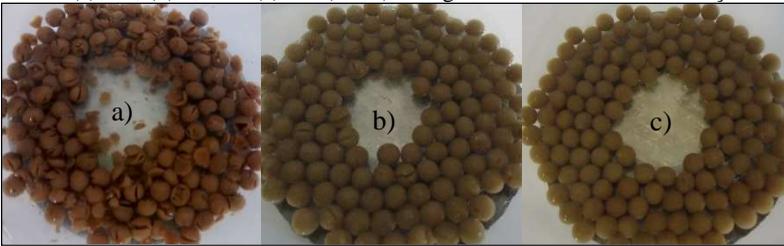
Fonte: elaborado pela autora (2017).

Analisando a variável concentração celular (g L⁻¹), o *p-value* calculado resultou em 0,0833, sendo este um valor maior que o *p-value* do teste (0,05). Com isto, os dados amostrais não indicam evidência estatística que a concentração celular está associada à integridade das esferas imobilizadas.

Analisando a variável teor de alginato de sódio (% m v⁻¹) utilizado na etapa de imobilização celular, o *p-value* calculado resultou em 0,0199, sendo menor que o *p-value* do teste (0,05). Com isto, os dados amostrais indicam que há evidência estatística de que a concentração de alginato de sódio está associada à integridade das esferas imobilizadas.

Na Figura 24 estão apresentadas as imagens após o primeiro ciclo de 24 h de fermentação alcoólica utilizando 1%, 1,5% e 2% (m v⁻¹) de alginato de sódio na imobilização.

Figura 24 – Imagens das esferas imobilizadas com magnetita após 24 h utilizando: (a) 1%, (b) 1,5% e (c) 2% (m v⁻¹) de alginato de sódio na imobilização



Fonte: elaborado pela autora (2017).

Nas Figuras 24 (a), (b) e (c), a concentração de levedura utilizada na imobilização foi de 50 g L⁻¹ e a velocidade de agitação durante o processo fermentativo foi de 150 rpm. É possível constatar visualmente o aumento da integridade das esferas com o aumento da concentração de alginato.

4.3.3 Avaliação quantitativa da influência da concentração de alginato de sódio e da concentração celular no processo fermentativo

A partir da análise realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, foi possível determinar os valores das concentrações de glicose e das concentrações dos produtos (glicerol e etanol) obtidos no final de cada ciclo de 24 h para as diferentes condições de imobilização da levedura com a magnetita. O valor inicial de substrato obtido por cromatografia líquida de alta eficiência e utilizado para os cálculos foi de 98,021 g L⁻¹, sendo que na composição do meio fermentativo foi adicionado 100 g L⁻¹ de glicose. A concentração média de glicerol obtida nas amostras foi de 5,562 g L⁻¹, com desvio padrão de 1,28 g L⁻¹.

Na Tabela 10 estão dispostos os valores das concentrações de substrato e de etanol e os valores de produtividade e rendimento da fermentação calculados conforme Equações (5) e (6), respectivamente.

Tabela 10 – Dados obtidos no final de cada ciclo de 24 h para a concentração de substrato e de etanol e os valores calculados da produtividade e do rendimento da fermentação para cada amostra indicando as condições de imobilização com a magnetita

| Amostra | Condição de Imobilização | | Ciclo de 24 h | Resultados obtidos no final de cada ciclo | | | |
|---------|-------------------------------|-------------------------------|---------------|---|-----------------------------|---|-------|
| | Alginato (m v ⁻¹) | Levedura (g L ⁻¹) | | Glicose (g L ⁻¹) | Etanol (g L ⁻¹) | P _r (g L ⁻¹ h ⁻¹) | R (%) |
| A | 1,0 | 50 | 1° | 18,624 | 24,44 | 1,02 | 60,38 |
| | | | 2° | 0,961 | 33,17 | 1,38 | 67,02 |
| B | 1,0 | 100 | 1° | 5,142 | 36,76 | 1,53 | 77,62 |
| | | | 2° | 2,794 | 35,07 | 1,46 | 72,23 |
| C | 1,5 | 50 | 1° | 34,57 | 13,34 | 0,56 | 41,25 |
| | | | 2° | 14,05 | 23,00 | 0,96 | 53,71 |
| | | | 3° | 7,18 | 26,51 | 1,10 | 57,24 |
| | | | 4° | 17,71 | 25,18 | 1,05 | 61,49 |
| D | 1,5 | 100 | 1° | 26,12 | 4,37 | 0,18 | 11,93 |
| | | | 2° | 15,29 | 32,08 | 1,34 | 76,05 |
| E | 2,0 | 50 | 1° | 27,59 | 14,74 | 0,61 | 41,04 |
| | | | 2° | 15,05 | 30,58 | 1,27 | 72,28 |
| | | | 3° | 4,51 | 35,65 | 1,49 | 74,76 |
| | | | 4° | 13,48 | 24,53 | 1,02 | 56,90 |
| F | 2,0 | 100 | 1° | 45,47 | 24,24 | 1,01 | 90,50 |
| | | | 2° | 12,64 | 7,61 | 0,32 | 17,84 |

Fonte: elaborado pela autora (2017).

Observando-se os dados presentes na Tabela 10, pode-se perceber que em poucas amostras obteve-se rendimento superior a 70%, sendo que apenas na Amostra B todos os ciclos resultaram em valores maiores que 70%, sendo 77,62% para o 1° ciclo de 24 h e 72,23% para o 2° ciclo. Esta condição de imobilização foi também a que obteve alto consumo de substrato e alta geração de etanol em todos os ciclos, sendo que apenas a produtividade resultou em valores que podem ser reavaliados pela cinética da reação, verificando-se a possibilidade de redução do tempo de fermentação, sem negligenciar o rendimento da reação.

A amostra D obteve rendimento de 76,05% no 2° ciclo, mesmo com menos consumo de substrato que na amostra B. Porém, o rendimento do 1° ciclo (11,93%) desmotiva nesta condição, sendo que a integridade das esferas manteve-se por apenas 2 ciclos de 24 h.

A amostra E obteve rendimento de 41,04% no 1° ciclo, 72,28% no 2° ciclo, mesmo com menos consumo de substrato que na amostra B, 74,76% no 3° ciclo e 56,9% no 4° ciclo. Esta condição de imobilização apresentou produtividade acima da média nos 4 ciclos, sendo que a média

da produtividade da fermentação para as amostras estudadas resultou em $1,02 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Sendo assim, esta condição é viável para futuros estudos, pois a integridade das esferas manteve-se por 4 ciclos de 24 h e seus resultados apresentam-se promissores.

A amostra F apresentou rendimento de 90,5% no 1º ciclo, mesmo com menos consumo de substrato que todas as outras amostras. Porém, no 2º ciclo, o rendimento decaiu para 17,84, desmotivando estudos nesta condição.

Conforme o resultado apresentado pelo teste Qui-Quadrado presente no item 4.3.2, na análise qualitativa, os dados amostrais indicam que não há evidência estatística de que a concentração de células esteja associada com a integridade das esferas imobilizadas. Por este motivo, a discussão dos resultados será focada em relação ao teor de alginato utilizado na imobilização celular. Desta forma, integra-se a análise qualitativa com a quantitativa.

Os teores de alginato de sódio ($\% \text{ m v}^{-1}$) avaliados na imobilização celular (Tabela 10) com a partícula magnética foram de 1,0%, 1,5% e 2,0%. Na Tabela 11 apresenta-se um resumo em ordem cronológica dos trabalhos descritos na revisão da literatura que avaliaram a imobilização celular com diferentes teores de alginato de sódio para fins de discussão dos resultados presentes na Tabela 10. Os resultados estão discutidos com base no rendimento da reação.

Tabela 11 – Principais trabalhos que avaliaram a imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* com alginato de sódio e a maior conversão de substrato em produto obtida em cada trabalho com o respectivo teor de alginato utilizado na imobilização

| Referência | Microrganismo estudado | Teor de alginato (% m v ⁻¹) | R (%) |
|-------------------------|---|---|-------|
| Swain et al. (2007) | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CTCRI | 4 | 94,6 |
| Ghorbani et al. (2011) | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 3 | 96,0 |
| Călinescu et al. (2012) | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 2 | 80,0 |
| Jin, Liu e He (2012) | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CICC 1308 | 2 | 51,7 |
| Duarte et al. (2013) | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> JAY 270 | 3 | 64,5 |
| Mathew et al. (2013) | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 5 | 92,2 |
| Singh et al. (2013) | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> MTCC 174 | 4 | 82,4 |
| Hickert et al. (2014) | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 4 | 88,0 |
| Wu et al. (2014) | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Wu-Y2 | 1 | 94,0 |
| Neste trabalho (2017) | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 1 | 77,6 |
| | | 1,5 | 76,0 |
| | | 2 | 90,5 |

Fonte: elaborado pela autora (2017).

Para os quatro ciclos das amostras (A e B) imobilizadas com 1,0% de alginato de sódio, todos os ciclos resultaram em rendimento acima de 60%, sendo o valor máximo de 77,52%. Wu et al. (2014) avaliaram o mesmo teor de alginato e obtiveram rendimento máximo de 94%. O rendimento máximo obtido no presente trabalho está abaixo do valor citado na literatura, porém, esta condição de imobilização destaca-se positivamente por manter o rendimento da reação pouco variável em repetidos ciclos.

Para os seis ciclos das amostras (C e D) imobilizadas com 1,5% de alginato de sódio, 5 ciclos resultaram em rendimento acima de 40%, sendo o valor máximo de 76%. O rendimento do outro ciclo foi de 11,93%. Não foram encontrados dados na literatura sobre imobilização celular de *Saccharomyces cerevisiae* com o teor de alginato de 1,5% sem a presença de magnetita. Por isso, optou-se em discutir estes dados em

comparação com os trabalhos que avaliaram o valor de 2,0% para o teor de alginato na imobilização. Călinescu et al. (2012) e Jin, Liu e He (2012) avaliaram o teor de alginato de 2,0% e obtiveram rendimento máximo de 80% e 51,7%, respectivamente. Os resultados obtidos no presente estudo são promissores, uma vez que o valor máximo obtido para o rendimento foi de 76%, próximo do valor obtido por Călinescu et al. (2012) e acima do resultado obtido por Jin, Liu e He (2012).

Para os seis ciclos das amostras (E e F) imobilizadas com 2,0% de alginato de sódio, 3 ciclos resultaram em rendimento acima de 70%, sendo que o valor máximo obtido foi de 90,5%. De acordo com os dois trabalhos que utilizaram o mesmo teor de alginato na imobilização, Călinescu et al. (2012) e Jin, Liu e He (2012), o rendimento máximo obtido no presente estudo foi superior ao apresentado por ambos, demonstrando que a presença da magnetita não interferiu na reação.

A média obtida no presente estudo para o rendimento da reação dos ciclos que resultaram em valores acima de 40% (Tabela 10) é de 64,5%. O rendimento médio da reação, de acordo com os 9 valores obtidos da literatura, é de 82,6%, conforme descrito na Tabela 11. Realizando um Teste t de Hipóteses Bilateral com nível de significância de 5%, as duas médias não são estatisticamente diferentes.

Sendo assim, percebe-se que a presença da magnetita não impediu a ocorrência do processo fermentativo, pois o substrato foi consumido e o produto foi gerado. Ou seja, o rendimento da reação não foi afetado de forma estatisticamente significativa pelo fato do suporte conter a partícula magnética. Com isso, pode-se afirmar que a metodologia de imobilização proposta neste trabalho, além de inovadora, apresenta-se adequada às tendências científicas.

5 CONCLUSÕES

A imobilização celular de *Saccharomyces cerevisiae* em alginato com magnetita é um estudo inovador na área de fermentação alcoólica. Por este motivo, estudos preliminares são requeridos para demonstrar a viabilidade de estudos de maiores dimensões e obter parâmetros confiáveis.

Apesar da metodologia utilizada para evitar a presença de aglomerados na preparação da amostra para a análise de microscopia eletrônica de transmissão, houve a presença destes aglomerados. Porém, estes não impediram a correta análise da escala de tamanho das partículas. A análise da MET comprovou que as partículas sintetizadas possuem, de fato, tamanho na escala nano.

Foi possível realizar a imobilização celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com alginato de cálcio e as partículas magnéticas, uma vez que a presença da magnetita no suporte não impediu que a estrutura gelatinosa do alginato se formasse e nem que as células se mantivessem no interior do aprisionamento da camada gelatinosa.

Pelos resultados obtidos no estudo da absorção de água pela célula imobilizada, descartou-se a possibilidade de que as rachaduras presentes no suporte durante a fermentação alcoólica fossem causadas pelo aumento do volume de água no interior do suporte. Assim, a ocorrência principal das rachaduras foi associada ao crescimento celular interno nas esferas imobilizadas.

A caracterização da esfera imobilizada por microscopia eletrônica de varredura mostrou que a superfície das esferas possui aspecto rugoso e irregular, com a presença de cavidades de diferentes formatos e tamanhos. A análise das imagens obtidas pela microscopia eletrônica de varredura permitiu concluir que a presença da magnetita não interferiu no processo de imobilização da célula, uma vez que se confirmou a eficiência da ligação entre as nanopartículas de magnetita, o alginato e as células de levedura. Os aglomerados formados durante a imobilização apresentaram tamanho similar ao relatado na literatura em imobilização sem a presença da partícula magnética.

Analisando-se as propriedades magnéticas da magnetita, concluiu-se que a presença do alginato e da levedura não possui influência nas mesmas, uma vez que a curva de histerese se manteve com característica reversível, indicando que não houve a perda energética com aplicação do campo magnético variável. Sobre comportamento magnético do suporte imobilizado, pode-se concluir que o mesmo possui propriedades

magnéticas válidas para serem aplicadas em reator de leito fluidizado magneticamente estabilizado.

Em relação à análise das velocidades instantâneas de consumo de substrato, a presença da partícula magnética não apresentou influência significativa. Para a velocidade específica de consumo de substrato, a diferença entre os valores obtidos do processo conduzido com células imobilizadas somente em alginato e células imobilizadas com material magnético apresentou-se apenas na terceira casa decimal (0,3674 e 0,3631 $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$, respectivamente). A imobilização, nas condições estudadas, manteve sua integridade no tempo estipulado de 24 h, mostrando-se viável para os estudos seguintes.

As condições de imobilização foram estudadas em pequena escala visando compreender a influência das nanopartículas magnéticas na imobilização celular em processos fermentativos. A continuidade de reutilização das esferas em mais ciclos foi decidida por observação visual, de acordo com a integridade das esferas, observando-se rachaduras, quebras e o formato das mesmas, obtendo-se dados qualitativos. As amostras foram classificadas de modo enumerativo (viável ou não viável), permitindo a realização do Teste Qui-Quadrado. Este teste indicou que, dentre as variáveis estudadas, apenas a concentração de alginato de sódio possui evidência estatística de estar associada à resistência das esferas imobilizadas.

A análise quantitativa indicou que a presença da magnetita no suporte não impediu o consumo do substrato e nem a formação dos produtos avaliados. Esta conclusão foi obtida comparando-se os dados presentes na literatura para processos fermentativos conduzidos com células imobilizadas somente com o alginato com os dados obtidos no presente estudo. O Teste t de Hipóteses Bilateral com nível de significância de 5% indicou que a média dos rendimentos da reação obtida neste estudo não é estatisticamente diferente da média do rendimento relatado na literatura, sendo estes sem a presença da magnetita no suporte.

Como as análises quantitativa e qualitativa são complementares, ambas foram consideradas para a determinação das condições de imobilização promissoras para futuros trabalhos. Sendo assim, as condições são 1% de alginato de sódio e 100 g L^{-1} de levedura, que manteve a integridade das esferas por 2 ciclos, ambos com rendimento acima de 70%, e 2% de alginato de sódio e 50 g L^{-1} de levedura, que manteve a integridade das esferas por 4 ciclos, porém apenas 2 ciclos resultaram em rendimento superior a 70%.

Com base no objetivo geral e nos objetivos específicos definidos neste trabalho, conclui-se que o mesmo foi realizado e finalizado com sucesso, pois cumpriu todos os objetivos propostos e apresenta resultados e conclusões de importância científica para contribuir positivamente com a comunidade acadêmica. Os dados obtidos neste trabalho são promissores, incentivando a continuidade desta pesquisa e servindo de base para trabalhos conseguintes.

Sugestões para trabalhos futuros:

- Estudar a cinética da fermentação das melhores condições definidas neste trabalho visando a redução do tempo de cada ciclo;
- Avaliar se, operando em modo batelada alimentada, é possível manter a integridade das esferas por mais ciclos de reutilização;
- Avaliar a produtividade da fermentação e a integridade das esferas operando em modo contínuo;
- Propor um modelo de reator de leito fluidizado estabilizado magneticamente para as melhores condições avaliadas neste trabalho;
- Avaliar outras condições de operação que possam incrementar as taxas de conversão obtidas neste trabalho.

REFERÊNCIAS

ADITIYA, H. B.; CHONG, W. T.; MAHLIA, T. M. I.; SEBAYANG, A. H.; BERAWI, M. A.; NUR, H. **Second-generation bioethanol potential from selected Malaysia's biodiversity biomasses: A review.** *Waste Management*, v. 47, p. 46-61, 2016.

ALAM, F.; MOBIN, S.; CHOWDHURY, H. **Third generation biofuel from Algae.** *Procedia Engineering*, v. 105, p. 763-768, 2015.

ALASWAD, A.; DASSISTI, M.; PRESCOTT, T.; OLABI, A. G. **Technologies and developments of third generation biofuel production.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 51, p. 1446-1460, 2015.

AL-HASSAN, Z.; IVANOVA, V.; DOBREVA, E.; PENCHEV, I.; HRISTOV, J.; RACHEV, R.; PETROV, R. **Non-Porous Magnetic Supports for Cell Immobilization.** *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 71, n. 2, p. 114-117, 1991.

AL-QODAH, Z.; AL-SHANNAG, M.; ASSIREY, E.; ORFALI, W.; BANI-MELHEM, K.; ALANANBEH, K.; BOUQELLAH, N. **Characteristics of a novel low-density cell-immobilized magnetic supports in liquid magnetically stabilized beds.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 97, p. 40-49, 2015.

BAEYENS, J.; KANG, Q.; APPELS, L. DEWIL, R.; LV, Y.; TAN, T. **Challenges and opportunities in improving the production of bioethanol.** *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 47 p. 60-88, 2015.

BAHAR, T.; ÇLEBI, S. S. **Performance of immobilized glucoamylase in a magnetically stabilized fluidized bed reactor (MSFBR).** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 28-33, 2000.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals.** 2^ª ed. *New York: McGraw-Hill*, 984 p., MacGraw-Hill chemical engineering series, 1986.

BAYRAKCI, M.; GEZICI, O.; BAS, S. Z.; OZMEN, M.; MALTAS, E. **Novel humic acid-bonded magnetite nanoparticles for protein**

immobilization. *Materials Science and Engineering C*, v. 42, p. 546-552, 2014.

BAYRAMOGLU, G.; OZALP, V. C.; ALTINTAS, B.; ARICA, M. Y. **Preparation and characterization of mixed-mode magnetic adsorbent with p-amino-benzamidine ligand: Operated in a magnetically stabilized fluidized bed reactor for purification of trypsin from bovine pancreas.** *Process Biochemistry*, v. 49, p. 520-528, 2014.

BEDÊ, P. M. **Produção e Caracterização de Nanopartículas Polimérico-magnéticas para Aplicações Biomédicas.** Dissertação de Mestrado em Ciências dos Materiais, 73 f., Instituto Militar de Engenharia. Rio de Janeiro - RJ, 2010.

BRUCE, P. Y. **Química orgânica.** 4ª Ed. São Paulo: Pearson/Prentice Hall, v. 2, 641 p., 2006.

CĂLINESCU, I.; CHIPURICI, P.; TRIFAN, A.; BĂDOIU, C. **Immobilisation of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of bioethanol.** *Buletin Stiintific - Universitatea Politehnica din Bucuresti*, Series B, v. 74, p. 33-40, Iss. 1, 2012.

CARGILL. **Alginatos.** Disponível em: <http://www.cargillfoods.com/lat/pt/produtos/hidrocoloides/alginatos/index.jsp>. Acesso em: 04/09/2014.

CHA, H.-G.; KIM, Y.-O.; CHOI, W. Y.; KANG, .D.-H.; LEE, H.-Y.; JUNG, K.-H. **Evaluating Carriers for Immobilizing *Saccharomyces cerevisiae* for Ethanol Production in a Continuous Column Reactor.** *Mycobiology*, v. 42, n. 3, p. 249-255, 2014.

CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. **The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses.** Second, Completely Revised and Extended Edition. WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA, Germany, ISBN 3-527-30274-3, 664 p., 2003.

DEMAIN, A. L.; SOLOMON, N. A. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.** Washington, D.C: Amer. Soc. for Microbiology, 466 p., 1986.

DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A. R.; TORRES-MUÑOZ, J. A.; LÓPEZ, R. A. **Production of Bioethanol from agro-industrial wastes.** *Fuel*, v. 149, p. 85-89, 2014.

DONG, Y.; ZHANG, Y.; TU, B.; MIAO, J. **Immobilization of ammonia-oxidizing bacteria by calcium alginate.** *Ecological Engineering*, v. 73, p. 809-814, 2014.

DREAMSTIME. **Ilustração Stock: Estrutura molecular do álcool etílico isolada no branco.** Disponível em: <https://pt.dreamstime.com/ilustrao-stock-estrutura-molecular-do-lcool-etlico-isolada-no-branco-image42105991>. Acesso em: 14/07/2015.

DUARTE, J. J.; RODRIGUES, A. R.; MORAN, P. J. S.; VALENÇA, G. P.; NUNHEZ, J. R. **Effect of immobilized cells in calcium alginate beads in alcoholic fermentation.** *AMB Express*, v. 3, n. 31, 2013.

FARIA, R. N.; LIMA, L. F. C. P. **Introdução ao Magnetismo dos Materiais.** Editora Livraria da Física, 1ª ed., 198 p., 2005.

FERNANDES, M. **Avaliação do desempenho fermentativo de leveduras geneticamente modificadas na metabolização de sacarose.** 93 p., Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2013.

FONTANIVE, V. C. P.; KHALIL, N. M.; COTICA, L. F.; MAINARDES, R. M. **Aspectos físicos e biológicos de nanopartículas de ferritas magnéticas.** *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 35, n. 4, p. 549-558, 2014.

FIDALGO, W. R. R.; CERON, A.; FREITAS, L.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. de. **A fluidized bed reactor as an approach to enzymatic biodiesel production in a process with simultaneous glycerol removal.** *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 38, p. 217-223, 2016.

FINOTELLI, P. V.; SAMPAIO, D. A.; ROSSI, A. M.; ROCHA-LEAO, M.H.M. **Ca Alginate as Scaffold for Iron Oxide Nanoparticles Synthesis.** *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, Brasil, v. 25, p. 759-764, 2008.

FONSECA, M. M. da; TEIXEIRA, J. A. **Reactores biológicos: Fundamentos e Aplicações.** Lisboa: Lidel, xxxii, 483 p., Coleção biotec, 2007.

GALANAKIS, C. M.; KORDULIS, C.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A. A.; BEKATOROU, A.; LYCOURGHOTIS, A. **Effect of pressure and temperature on alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on γ -alumina pellets.** *Bioresource Technology*, v. 114, p. 492-498, 2012.

GANATSIOS, V.; KOUTINAS, A. A.; BEKATOROU, A.; KANELLAKI, M.; NIGAM, P. **Promotion of maltose fermentation at extremely low temperatures using a cryotolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain immobilized on porous cellulosic material.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 66, p. 56-59, 2014.

GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U.; SILVA, A. N. da. **Alginato bacteriano: Aspectos tecnológicos, características e produção.** *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1800-1806, 2008.

GENISHEVA, Z.; MOTA, A.; MUSSATTO, S.I., OLIVEIRA, J.M.; TEIXEIRA, J.A. **Integrated continuous winemaking process involving sequential alcoholic and malolactic fermentations with immobilized cells.** *Process Biochemistry*, v. 49, n. 1, p. 1-9, 2014.

GHORBANI, F.; YOUNESI, H.; SARI, A. E.; NAJAFPOUR, G. **Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*.** *Renewable Energy*, v. 36, p. 503-509, 2011.

GONÇALVES, C.; RODRIGUEZ-JASSO, R. M.; GOMES, N.; TEIXEIRA, J. A.; BELO, I. **Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates.** *Analytical Methods*, v. 2, p. 2046-2048, 2010.

HAAVIK, C.; STOLEN, S.; FJELLVÅG, H.; HANFLAND, M.; HÄUSERMANN, D. **Equation of state of magnetite and its high-pressure modification: Thermodynamics of the Fe-O system at high pressure.** *American Mineralogist*, v. 85, p. 514-523, 2000.

HAJAR, M.; VAHABZADEH, F. **Biolubricant production from castor oil in a magnetically stabilized fluidized bed reactor using**

lipase immobilized on Fe₃O₄ nanoparticles. *Industrial Crops and Products*, v. 94, p. 544-556, 2016.

HENRIQUES, R. **Desenvolvimento de metodologias para Imobilização e Coimobilização de Enzimas em Nanopartículas Magnéticas.** 175 f., Tese de Doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2016.

HICKERT, L. R.; CRUZ, M. M.; DILLON, A. J. P.; FONTANA, R. C.; ROSA, C. A.; AYUB, M. A. Z. **Fermentation kinetics of acid-enzymatic soybean hull hydrolysate in immobilized-cell bioreactors of *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida shehatae*, *Spathaspora arborariae*, and their co-cultivations.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 88, p. 61-67, 2014.

HORSZCZARUK, E.; SIKORA, P.; ZAPOROWSKI, P. **Mechanical properties of shielding concrete with magnetite aggregate subjected to high temperature.** *Procedia Engineering*, v. 108, p. 39-46, 2015.

ISHOLA, M. M.; ISROI; TAHERZADEH, M.J. **Effect of fungal and phosphoric acid pretreatment on ethanol production from oil palm empty fruit bunches (OPEFB).** *Bioresource Technology*, v. 165, p. 9-12, 2014.

JILES, D. **Introduction to Magnetism and Magnetic Materials,** CRC Press, 588 p., 3^a Ed., 2015.

JIN, H.; LIU, R.; HE, Y. **Kinetics of Batch Fermentations for Ethanol Production with Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* growing on Sweet Sorghum Stalk Juice.** *Procedia Environmental Sciences*, v. 12, p. 137-145, 2012.

JOVANOVIĆ, G. N.; ATWATER, J. E.; ŽNIDARŠIĆ-PLAZL, P.; PLAZL, I. **Dechlorination of polychlorinated phenols on bimetallic Pd/Fe catalyst in a magnetically stabilized fluidized bed.** *Chemical Engineering Journal*, v. 274, p. 50-60, 2015.

KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. **Isomaltulose production, a new sucrose substitute, using microbial glucosyl transferase.** *Química Nova*, v. 31, n. 1 (Print version ISSN 0100-4042), 2009.

KLEIN, J.; VORLOP, K. D. **Immobilized Cells: Catalyst Preparation and Reaction Performance.** In: BLANCH, H. W.; PAPOUTSAKIS, E. T.; STEPHANOPOULOS, G. (Editores) **Foundations of biochemical engineering: kinetics and thermodynamics in biological systems.** Washington, D.C.: ACS Symposium series, 207, cap. 17, p. 377-392, 1983.

KOPSAHELIS, N.; KANELLAKI, M.; BEKATOROU; A. **Low temperature brewing using cells immobilized on brewer's spent grains.** *Food Chemistry*, v. 104, p. 480-488, 2007.

KOSSEVA, M. R. **Immobilization of microbial cells in food fermentation processes.** *Food Bioprocess Technology*. v. 4, n. 6, p. 1089-1118, 2011.

KOSSEVA, M. R.; PANESAR, P. S.; KAUR, G.; KENNEDY, J. F. **Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 45, p. 437-447, 2009.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A. A. **Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review.** *Food Microbiology*, v. 21, p. 377-397, 2004.

LENNARTSSON, P. R.; ERLANDSSON, P.; TAHERZADEH, M. J. **Integration of the first and second-generation bioethanol processes and the importance of by-products.** *Bioresource Technology*, v. 165, p. 3-8, 2014.

LI, Y.; GAO, H.; LI, W.; XING, J.; LIU, H. **In situ magnetic separation and immobilization of dibenzothiophene-desulfurizing bacteria.** *Bioresource Technology*, v. 100, p. 5092-5096, 2009.

LIU, C.; WANG, F.; OU-YANG, F. **Ethanol fermentation in a magnetically fluidized bed reactor with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in magnetic particles.** *Bioresource Technology*, v. 100, p. 878-882, 2009.

MACKIE, A. R.; MACIERZANKA, A.; AARAK, K.; RIGBY, N. M.; PARKER, R.; CHANNEL, G. A.; HARDING, S. E.; BAJKA, B. H.

Sodium alginate decreases the permeability of intestinal mucus.

Food Hydrocolloids, v. 52, p. 749-755, 2016.

MAGNETITE MINERAL DATA. General Magnetite Information.

Disponível em: <http://webmineral.com/jpowd/JPX>

[/jpowd.php?target_file=Magnetite_11.jp#U9BJRLG1czg](http://webmineral.com/jpowd.php?target_file=Magnetite_11.jp#U9BJRLG1czg). Acesso em: 23/07/2014.

MALLOUCHOS, A.; KOMAITIS, M.; KOUTINAS, A.; KANELLAKI, M. **Wine fermentations by immobilized and free cells at different temperatures. Effect of immobilization and temperature on volatile by-products.** *Food Chemistry*, v. 80, p. 109-113, 2003.

MARTINS, M. L. **Síntese e Caracterização de Ferritas de Manganês e Zinco visando Aplicação Como Agente de Contraste em Diagnóstico Médico.** Trabalho de Conclusão de Curso, Instituto de Biociências, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Botucatu – SP, 77 f., 2008.

MATHEW, A. K.; CROOK, M.; CHANEY, K.; HUMPHRIES, A. C. **Comparison of entrapment and biofilm mode of immobilisation for bioethanol production from oilseed rapeseed straw using *Saccharomyces cerevisiae* cells.** *Biomass and Bioenergy*, v. 52 p. 1-7, 2013.

MATHEW, A. K.; CROOK, M.; CHANEY, K.; HUMPHRIES, A. C. **Continuous bioethanol production from oilseed rape straw hydrosylate using immobilised *Saccharomyces cerevisiae* cells.** *Bioresource Technology*, v. 154, p. 248-253, 2014.

MCGHEE, J. E.; JULIAN, G. ST.; DETROY, R. W. **Continuous and Static Fermentation of Glucose to Ethanol by Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Cells of Different Ages.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 44, n. 1, p. 19-22, 1982.

MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426, 1959.

MÜLLER, J. M.; SANTOS, R. L. dos; BRIGIDO, R. V. **Produção de alginato por microrganismos.** *Polímeros*, v. 21, n. 4, p. 305-310, ISSN 0104-1428, 2011.

NAJAFPOUR, G. D.; LIM, J. K. **Evaluation and Isolation of Ethanol Producer Strain SMP-6.** *Regional Symposium on Chemical Engineering*, p. 229-236, Malásia, 2002.

NAJAFPOUR, G.; YOUNESI, H.; ISMAIL, K. S. K. **Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*.** *Bioresource Technology*, v. 92, p. 251-260, 2004.

NORTON, S.; D'AMORE, T. **Physiological effects of yeast cell immobilization: Applications for brewing.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 16, n. 5, p. 365-375, 1994.

OBEROI, H.S.; VADLANI, P.V.; SAIDA, L.; BANSAL, S.; HUGHES; J.D. **Ethanol production from banana peels using statistically optimized simultaneous saccharification and fermentation process.** *Waste Manage*, v. 31, p. 1576-1584, 2011.

ORTIZ, S. **Produção de Bioetanol a partir de Resíduos Agroindustriais.** Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, 74 f. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Regional de Blumenau. Blumenau - SC, 2010.

PERLOFF, L. **Photo Atlas of Minerals: Magnetite.** Disponível em: <http://webmineral.com/specimens/picshow.php?id=708&target=Magnetite#.WIOdFMrLIV>. Acesso em: 23/07/2014.

PILKINGTON, P. H., MARGARITIS, A., MENSOUR, N. A., RUSSELL, I., **Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: a review.** *Journal of the Institute of Brewing*, v. 104, p. 19-31, 1998.

RAEI, M.; RAJABZADEH, G.; ZIBAEI, S.; JAFARI, S. M.; SANI, A. M. **Nano-encapsulation of isolated lactoferrin from camel milk by calcium alginate and evaluation of its release.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 79, p. 669-673, 2015.

RIBEIRO, G. A. P. **As Propriedades Magnéticas da Matéria: um Primeiro Contato.** *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 22, n. 3, p. 299-305, 2000.

ROSSI, L. M.; COSTA, N. J. S.; SILVA, F. P.; WOJCIESZAK, R. **Magnetic nanomaterials in catalysis: advanced catalysts for magnetic separation and beyond.** *Green Chemistry*, v. 16, p. 2906-2933, 2014.

SALSAC, A. V.; ZHANG, L.; GHERBEZZA, J. M. **Measurement of mechanical properties of alginate beads using ultrasound.** *19^{ème} Congres Français de Mécanique*. Marseille, 2009.

SILVA, A. R. da; SOUZA JR., I. G. de; COSTA, A. C. S. da. **Suscetibilidade Magnética do Horizonte B de Solos do Estado do Paraná.** Seção II – Química e Mineralogia do Solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 34, p. 329-337, 2010.

SINGH, A.; SHARMA, P.; SARAN, A. K.; SINGH, N.; BISHNOI, N. R. **Comparative study on ethanol production from pretreated sugarcane bagasse using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on various matrices.** *Renewable Energy*, v. 50, p. 488-493, 2013.

SINGH, A.; BAJAR, S.; BISHNOI, N. R. **Enzymatic hydrolysis of microwave alkali pretreated rice husk for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*, *Scheffersomyces stipitis* and their co-culture.** *Fuel*, v. 116, n. 15, p. 699-702, 2014.

SINNECKER, J. P. **Materiais Magnéticos Doces e Materiais Ferromagnéticos Amorfos.** *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 22, n. 3, p. 396-405, 2000.

SMITH, W. F.; HASHEMI, J. **Fundamentos de Engenharia e Ciência dos Materiais.** Editora McGraw-Hill, 5^a Ed., 734 p., 2012.

SOUZA, K. V. de; PERALTA-ZAMORA, P.; ZAWADZKI, S. F. **Immobilization of iron (II) in alginate matrix and its use in textile dye degradation by Fenton processes.** *Química Nova*, v. 31, n. 5, Print version ISSN 0100-4042, 2008.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology.** 2nd Ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, xviii, 357 p., il. 1995.

SWAIN, M. R.; KAR, S.; SAHOO, A. K.; RAY, R. C. **Ethanol fermentation of mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers using free and immobilized yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** *Microbiological Research*, v. 162, p. 93-98, 2007.

TAFURT-CARDONA, M.; EISMANN, C. E.; SUÁREZ, C. A.; MENEGÁRIO, A. A.; LUKO, K. S.; SARGENTINI JR., E. **In situ selective determination of methylmercury in river water by diffusive gradient in thin films technique (DGT) using baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) immobilized in agarose gel as binding phase.** *Analytica Chimica Acta*, v. 887, p. 38-44, 2015.

TEIXEIRA, V. F. T. **Estudo da Obtenção de Biocatalisadores com Matrizes de Alginato de Cálcio visando a Produção de Biodiesel.** Dissertação de Mestrado em Produção Vegetal. 88 f. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes - RJ, 2011.

TIAN, G-L HUANG, J-Q; LI, J.; ZHANG, Q.; FEIWEI. **Enhanced growth of carbon nanotube bundles in a magnetically assisted fluidized bed chemical vapor deposition.** *Carbon*, v. 108, p. 404-411, 2016.

TIE, S.; LIN, Y.; LEE, H.; BAE, Y.; LEE, C. **Amino acid-coated nano-sized magnetite particles prepared by two-step transformation.** *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, v. 273, p. 75-83, 2006.

VILELA, A.; SCHULLER, D.; MENDES-FAIA, A.; CÔRTE-REAL, M. **Redução da acidez volátil de vinhos por células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em esferas de alginato-chitosano.** *Revista Enologia*, p. 38-42, São Paulo, 2012.

WOO, E.; KWON, H.; LEE, C. **Preparation of nano-magnetite impregnated mesocellular foam composite with a Cu ligand for His-tagged enzyme immobilization.** *Chemical Engineering Journal*, v. 274, p. 1-8, 2015.

WU, F.; WU, J.; LIAO, Y.; WANG, M.; SHIH, I. **Cofermentation of glucose and galactose by a newly isolated *Saccharomyces cerevisiae***

strain in free and immobilized forms. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 45, p. 2387-2394, 2014.

XIN, Y.; BLIGH, M. W.; KINSELA, A. S.; WAITE, T. D. **Effect of iron on membrane fouling by alginate in the absence and presence of calcium.** *Journal of Membrane Science*, v. 497, p. 289-299, 2016.

YANG, K.; MUN, J.; SHIM, H. **Shrinkage of heavyweight magnetite concrete with and without fly ash.** *Construction and Building Materials*, v. 47, p. 56-65, 2013.

YANG, W, C. **Handbook of Fluidization and Fluid-Particle Systems.** Ed: Marcel Dekker, New York, 2003.

YU, J.; ZHANG, X.; TAN, T. **An novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production.** *Journal of Biotechnology*, v. 129, p. 415-420, 2007.

YUSDY; PATEL, S. R.; YAP, M. G. S.; WANG, D. I. C. **Immobilization of l-lactate dehydrogenase on magnetic nanoclusters for chiral synthesis of pharmaceutical compounds.** *Biochemical Engineering Journal*, v. 48, p.13-21, 2009.

ZAIN, M. M.; KOFLI, N. T.; YAHYA, S. R. S. **Bioethanol Production by Calcium Alginate-Immobilised ST1 Yeast System: Effects of Size of Beads, Ratio and Concentration.** *IJUM Engineering Journal*, v. 12, n. 4 (Special Issue on Biotechnology), 2011.

ZIMMERMANN, A. L. S. **Desenvolvimento e avaliação de micropartículas contendo microrganismos viáveis utilizados como bioinseticida.** Tese de Doutorado, 165 f., Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo - SC, 2001.

ZONG, B.; MENG, X.; UM, X.; ZHANG, X. **Magnetically stabilized bed reactors.** *Chinese Journal of Catalysis*, v. 34, p. 61-68, 2013.