

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**AERAÇÃO INTERMITENTE EM BIORREATORES COLUNA DE BOLHAS:
UMA ALTERNATIVA EFICIENTE PARA REDUÇÃO DO CONSUMO DE AR**

Giancarlo Liceu Caporrino

**São Carlos - SP
2025**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

GIANCARLO LICEU CAPORRINO

**AERAÇÃO INTERMITENTE EM BIORREATORES COLUNA DE BOLHAS:
UMA ALTERNATIVA EFICIENTE PARA REDUÇÃO DO CONSUMO DE AR**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento de
Engenharia Química da Universidade
Federal de São Carlos como requisito
parcial para obtenção do título de Bacharel
em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior
Coorientadora: MSc. Letícia Pereira Almeida

**São Carlos - SP
2025**

RESUMO

Este trabalho de conclusão de curso teve como objetivo estudar a transferência de oxigênio intermitente em biorreatores químicos pneumáticos, por meio de uma análise comparativa com o método convencionalmente utilizado para aeração de processos bioquímicos: o regime contínuo. Buscou-se verificar a viabilidade de substituição desse método pelo regime pulsado, como alternativa eficiente para a redução do consumo de gás. Para isso, foram realizados ensaios preliminares em diferentes condições de abertura e fechamento da válvula reguladora da vazão de ar (definidas por meio de um planejamento experimental fatorial com ponto central), no sistema água/ar, a fim de determinar parâmetros relevantes para a eficiência do processo, como o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio e a eficiência de transferência de oxigênio. Esses ensaios embasaram a análise estatística de significância, que fundamentou a decisão de escolha das condições utilizadas (3vvm contínua e 3 vvm 1F/3A) para condução dos cultivos com organismos biológicos. Em seguida, foram realizados experimentos em duplicata com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* sob as duas condições mais promissoras. Os resultados demonstraram um rendimento do crescimento celular, em relação ao consumo de substrato, 2% superior na condição de aeração intermitente. Além disso, observou-se uma redução de 25% no consumo de gás, representando uma economia significativa nos cultivos e contribuindo para a viabilidade do processo.

Palavras chave: coeficiente de transferência de oxigênio, eficiência de transferência de oxigênio, intermitência, aeração, SimulaFerm, reatores pneumáticos, coluna de bolhas, economia, oxigênio.

ABSTRACT

This course completion work aimed to study intermittent oxygen transfer in pneumatic chemical bioreactors, through a comparative analysis with the method conventionally used for aeration of biochemical processes: the continuous regime. The aim was to verify the feasibility of replacing this method with the pulsed regime, as an efficient alternative for reducing gas consumption. For this purpose, preliminary tests were carried out under different conditions of opening and closing of the air flow control valve (decided through a central point factorial experimental design), in the water/air system, in order to determine important parameters in the efficiency of the process, such as the volumetric coefficient of oxygen transfer and oxygen transfer efficiency. These tests served as the basis for a statistical analysis of significance, which supported the decision to choose the conditions used (3vvm continuous and 3vvm 1F/3A) to conduct the cultures with biological beings. Then, experiments were carried out, in duplicate, with *Saccharomyces cerevisiae* yeasts with the two most promising conditions. The results demonstrated a 2% higher yield of cell growth in relation to substrate consumption under intermittent aeration conditions. In addition, a 25% reduction in gas consumption was observed, representing significant savings in crops and contributing to the viability of the process.

Keywords: oxygen transfer coefficient, oxygen transfer efficiency, intermittency, aeration, SimulaFerm, pneumatic reactors, bubble column, economy, oxygen.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. Bioprocessos	8
1.2. Reatores pneumáticos	8
1.3. Aeração intermitente	9
1.4. Objetivos e estrutura do trabalho	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1. Transferência de massa gás-líquido.....	10
2.2. Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
2.3. Parâmetros de eficiência.....	13
2.3.1. Eficiência de transferência de oxigênio (ETO ₂)	13
2.3.2. Constante de atraso do eletrodo de oxigênio.....	14
2.4. Reator coluna de bolhas	14
2.5. Crescimento celular.....	16
2.5.1. Cinética do crescimento celular de Monod.....	18
3. METODOLOGIA	19
3.1. Materiais	19
3.2. Métodos	20
3.2.1. Determinação da tensão de oxigênio deissolvido para o regime de alimentação contínuo - Método de degaseificação e reoxigenação	20
3.2.2. Avaliação da vazão de alimentação e dos intervalos de abertura/fechamento da válvula solenoide no kLa e na ETO ₂	21
3.2.3. Determinação da constante de atraso do eletrodo (ke)	22
3.2.4. Cálculos para obtenção do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (kLa).....	24
3.2.4.1. Regime de aeração contínua	24
3.2.5. Cálculos de ETO ₂	27
3.2.5.1. Regime de aeração contínuo	27
3.2.5.2. No regime de aeração intermitente	29
3.2.6. Avaliação das condições de aeração contínua e intermitente no crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
3.2.6.1. Determinação da concentração celular	32
3.2.6.2. Cultivo aeróbio de leveduras	32
3.2.6.3. Preparação da curva de calibração de glicose.....	33
3.2.6.4. Análise da concentração de glicose	34
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1. Constante de atraso do eletrodo (ke)	35
4.2. Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (kLa)	36
4.3. Eficiência de transferência de oxigênio (ETO ₂)	37
4.4. Análise estatística para verificação de significatividade.....	38
4.5. Cultivo teste	39
4.5.1. Modelagem e simulação do crescimento e da respiração celular	42

4.6. Crescimento da levedura <i>S. cerevisiae</i> sob condições de aeração contínua e intermitente	46
5. CONCLUSÕES	52
6. REFERÊNCIAS.....	53

1. INTRODUÇÃO

1.1. Bioprocessos

O cerne dos bioprocessos está nas reações metabólicas destinadas à obtenção de um produto de interesse, utilizando estruturas biológicas como enzimas, células ou organelas, entre outras. Em processos envolvendo microrganismos, é necessário que haja no meio uma matéria prima (substrato) que sustente o desenvolvimento celular e biossíntese dos produtos desejados.

Os bioprocessos podem ser classificados como anaeróbios ou aeróbios. Os anaeróbios ocorrem na ausência de oxigênio, enquanto os aeróbios requerem oxigênio dissolvido no meio para que as reações metabólicas ocorram adequadamente. Para isso, é essencial promover a aeração e agitação da cultura, em vias de garantir a transferência de massa entre as fases gasosa e líquida, mantendo uma concentração de oxigênio dissolvido suficiente para que as células desempenhem suas atividades metabólicas (CRUEGER & CRUEGER, 2005)

A condução dos bioprocessos exige o uso de equipamentos denominados biorreatores. Esses dispositivos são responsáveis por assegurar a aeração e a agitação do meio reacional, proporcionando oxigenação contínua. Neles são introduzidos o meio de cultura e as células microbianas ou de tecidos vegetais ou animais, que protagonizam a conversão de interesse. Os biorreatores podem ser classificados de acordo com o volume, geometria e tipo de aeração e agitação, características que influenciam diretamente parâmetros como hidrodinâmica, cisalhamento, transferência de calor e massa, geração de espuma, entre outros aspectos discutidos ao longo deste trabalho (CONCEIÇÃO & GONÇALVES, 2009).

1.2. Reatores pneumáticos

O estudo da transferência de massa em biorreatores químicos é assunto amplamente difundido no meio acadêmico. No entanto, a partir da publicação do livro “Airlift biorreactors” em 1989, por Yusuf Chisti, a comunidade científica passou a voltar sua atenção para os reatores pneumáticos e suas vantagens em relação aos tradicionais reatores tanque agitado e aerado (Cerri et al., 2010). A possibilidade de unir agitação e aeração, de maneira a reduzir consideravelmente o consumo energético, e a ausência de impelidores, o que proporciona condições de cisalhamento menos intensas e mais uniformes dentro do dispositivo, tornou os reatores pneumáticos bastante atrativos para aplicação em bioprocessos envolvendo enzimas, células e microrganismos filamentosos em geral (bactérias e fungos) menos resistentes a deformações físicas.

Dentre os modelos pneumáticos, o reator coluna de bolhas se destaca pela simplicidade construtiva e pela eficiência operacional, em que a aeração desempenha um papel central na mistura e na transferência de massa. Nesse sistema, o gás é introduzido na base do reator por um aspersor, formando bolhas que, devido a sua menor densidade, ascendem pelo meio líquido. Esse movimento ascendente promove a circulação do líquido, sendo o principal responsável pela agitação do sistema.

1.3. Aeração intermitente

Na maioria dos bioprocessos, a aeração é conduzida de maneira contínua. Entretanto, quando a aeração é cessada, existe um intervalo de tempo em que ainda existe transferência de massa no sistema, devido às bolhas remanescentes no volume de controle. A aeração intermitente parte do princípio de utilizar-se do intervalo entre pulsos para obter um ganho em transferência de massa em detrimento da quantidade de gás utilizada. Portanto, antes do oxigênio ser injetado no reator, este deve passar um mecanismo responsável por limitar seu trânsito por um período de tempo estipulado, proporcionando o pulso, o qual vai depender dos tempos de abertura e fechamento do mecanismo.

1.4. Objetivos e estrutura do trabalho

O estudo em questão buscou explorar o regime de alimentação de oxigênio por vazão intermitente de ar e avaliar como sua utilização afetaria a transferência de oxigênio num cultivo aeróbio. Para isso, foi necessário analisar a influência das vazões contínua e intermitente, com diferentes tempos de abertura e fechamento da válvula solenoide. A meta foi entender a possibilidade de substituir a aeração contínua pela intermitente num dado bioprocessos analisando parâmetros como o coeficiente de transferência de oxigênio, eficiência de transferência de oxigênio, além do crescimento celular sob essas diferentes condições de transferência de oxigênio.

A relevância deste trabalho está na possibilidade de redução do consumo de gás em bioprocessos aeróbios. Considerando que muitos cultivos requerem oxigênio puro — um insumo de elevado custo —, uma alternativa que permita reduzir seu uso, sem comprometer o desempenho do processo, representa um ganho significativo. Portanto, a partir da aplicação da alimentação intermitente, espera-se mensurar uma possível economia no uso de gás, mantendo a viabilidade e eficiência do bioprocessos.

Para facilitar a compreensão das etapas desenvolvidas neste estudo, o trabalho foi

dividido em tópicos:

- Revisão bibliográfica: Abordagem dos principais conceitos teóricos envolvendo transferência de massa gás-líquido, reatores coluna de bolhas, cultivos aeróbios, cinética de crescimento celular,
- Metodologia: Detalhamento dos procedimentos experimentais utilizados para obtenção dos parâmetros de eficiência de processo, modelagem matemática empregada nos cálculos, além da lista de materiais utilizados.
- Resultados e discussão: Apresentação e discussão dos resultados obtidos e análises correlacionando-os com a literatura.
- Conclusão: Resumo dos resultados explicitando se a aeração contínua pode ou não ser substituída pela intermitente abordando a contribuição do trabalho, limitações e sugestões para estudos futuros envolvendo o tema.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção serão apresentados os principais conceitos e fundamentos teóricos que sustentam o desenvolvimento do trabalho.

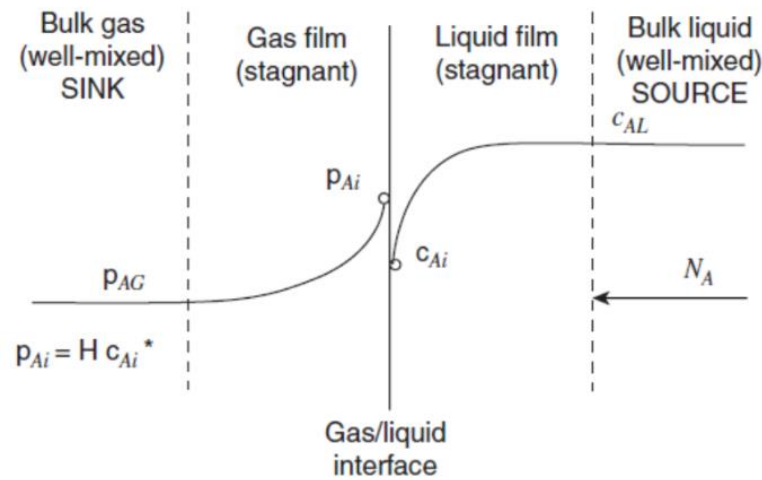
2.1. Transferência de massa gás-líquido

A transferência de massa gás-líquido é indispensável em processos bioquímicos, em especial os processos aeróbios. Este fenômeno consiste no movimento de espécies químicas entre duas fases e o entendimento deste mecanismo é essencial para equacionar e otimizar a eficiência dos processos que o envolvem.

A transferência de massa do gás para o líquido ocorre devido a um gradiente de concentração entre as duas fases. Em processos em que há a alimentação de oxigênio, por exemplo, este se desloca da fase gasosa, onde possui uma concentração mais elevada, para o líquido, onde sua concentração é mais baixa. Este transporte pode ser explicado pela *Teoria das duas películas estagnadas* (WHITMAN 1923), que considera a existência de resistências à transferência de massa de uma fase a outra. A Figura 1 ilustra o trajeto de uma espécie química da fase gasosa até a líquida, a qual passa por duas camadas de resistência, a gasosa e a líquida, onde prevalece o transporte por difusão molecular. Essas camadas representam uma película estagnada, que controla o processo de transferência. No caso da transferência de oxigênio da bolha de ar para a fase líquida, a película estagnada da fase líquida impõe a maior resistência

devido à baixa difusividade de oxigênio, sendo, portanto, a etapa controladora do processo de transferência.

Figura 1 - Representação esquemática da transferência de massa gás-líquido seguindo a teoria das duas películas estagnadas



Fonte: Welty & Wicks (2007).

De acordo com os princípios citados anteriormente, tem-se que a taxa com que a transferência de massa ocorre é controlada por um coeficiente global, que depende dos coeficientes convectivos de transferência de cada fase (k_L e k_G) e da constante de Henry (H), como expressado na Equação (1). Dessa maneira, é possível chegar em uma equação que rege a taxa de transferência de massa gás-líquido, dada pela Equação (2):

$$\frac{1}{K_L} = \frac{1}{k_L} + \frac{H}{k_G} \quad (1)$$

$$N = K_L * a * (C^* - C) \quad (2)$$

Sendo:

N : Taxa de transferência do composto químico ($mol/(m^3 \cdot s)$).

a : Área interfacial de transferência do composto, ou seja, área de contato entre as fases gasosa e líquida, dividida pelo volume (m^{-1}).

C^* : Concentração de saturação do composto dissolvido na fase líquida (mol/m^3).

C : Concentração do composto dissolvido na fase líquida (mol/m^3)

K_L : Coeficiente global de transferência de massa (m/s).

Como $k_G \gg k_L$, logo a resistência à transferência da fase líquida é muito maior que a da fase gasosa. Portanto, a partir da Equação (1) a equação (2) pode ser reescrita na forma que segue:

$$N = k_L a * (C^* - C) \quad (3)$$

Onde $k_L a$ (em s^{-1}) é o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, produto entre o coeficiente convectivo de transferência de massa da fase líquida (k_L) e a área interfacial de transferência de massa (a).

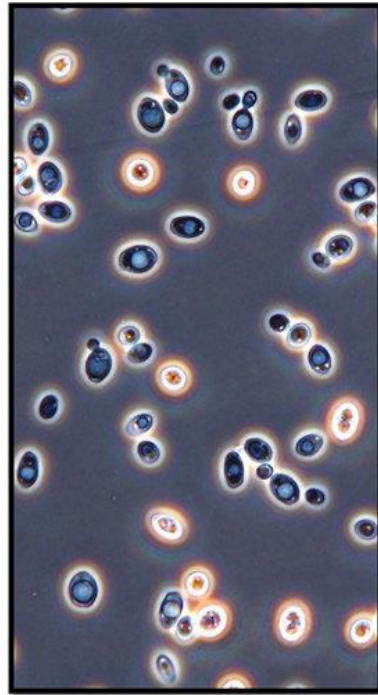
Além dos parâmetros que constituem a equação da taxa de transferência de massa, que influenciam no seu resultado, é importante salientar que a agitação também tem papel importante, uma vez que quanto maior a agitação, menor será a espessura da película estagnada da fase líquida, aumentando o coeficiente de transferência e conseqüentemente a taxa de transferência de massa.

2.2. Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras são microrganismos unicelulares pertencentes ao reino Fungi, classificados dentro do filo Ascomycota ou Basidiomycota. Essas células fúngicas possuem diâmetro que varia entre 3 e 10 μm , apresentam parede celular composta majoritariamente por quitina, glicanas e proteínas e podem ser encontradas em ambientes variados, como frutas, solos, vegetação em decomposição e até no trato digestivo de alguns animais (WALKER; STEWART, 2016). As leveduras possuem capacidade de realizar tanto respiração aeróbia quanto fermentação anaeróbia, conferindo a esses micro-organismos alta versatilidade metabólica. Devido a essa característica, são amplamente empregadas na indústria alimentícia, farmacêutica e energética para produção de etanol, bebidas alcoólicas, proteínas recombinantes e compostos bioativos (SOUZA et al., 2019).

Dentre as espécies de leveduras conhecidas, a *Saccharomyces cerevisiae* é uma das mais estudadas e aplicadas em bioprocessos industriais, sendo considerada um organismo modelo em microbiologia e biotecnologia. Sua principal via metabólica utilizada é a glicólise, que converte glicose em piruvato, seguido da regeneração do NAD^+ através da conversão do piruvato em etanol e CO_2 , quando o oxigênio é limitado (DE DIOS; SALAZAR; MORENO, 2020). A figura 2 remete a uma representação microscópica real de uma amostra de *Saccharomyces cerevisiae*.

Figura 2 - Micrografia eletrônica de varredura (MEV) detalhada da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.



Fonte: Carvajal Barriga (2013).

2.3. Parâmetros de eficiência

2.3.1. Eficiência de transferência de oxigênio (E_{TO_2})

A eficiência de transferência de oxigênio (E_{TO_2}) é um parâmetro importante em bioprocessos aeróbios, que utilizam ar ou oxigênio puro na alimentação. A E_{TO_2} , definida pela Equação (4), consiste em uma maneira de medir a quantidade de oxigênio que realmente é utilizada no processo (O_2^{transf}), em relação à quantidade alimentada no reator (O_2^{alim}).

$$E_{TO_2} = \frac{O_2^{transf}}{O_2^{alim}} \quad (4)$$

Vale ressaltar que, muitas vezes, o conceito de E_{TO_2} pode ser confundido com o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$). Enquanto o $k_L a$ está relacionado com a capacidade do sistema transferir de oxigênio do meio gasoso para o líquido, a E_{TO_2} mede a fração de oxigênio fornecido que é transferida, ou seja, a eficiência de uso do gás.

2.3.2. Constante de atraso do eletrodo de oxigênio

A constante de atraso do eletrodo, também chamada de tempo de resposta do eletrodo, é um parâmetro que caracteriza o tempo necessário para que um eletrodo atinja um estado de equilíbrio após uma mudança súbita na tensão de oxigênio dissolvido, obtida por um “ensaio degrau” utilizando atmosferas com N_2/ar ou N_2/O_2 . Esse conceito é especialmente relevante em sensores eletroquímicos, como eletrodos de oxigênio dissolvido, pH e condutividade, utilizados em biorreatores e processos industriais (Oliveira, 2025).

2.4. Reator coluna de bolhas

Outro aspecto importante que influencia a transferência de oxigênio e sua eficiência é o modelo do biorreator utilizado no bioprocesso.

O reator coluna de bolhas é considerado o modelo mais simples dentre os reatores pneumáticos, tanto pelo seu design, quanto pela maneira como opera. Este tipo de reator não possui mecanismos mecânicos de agitação (motor, eixo e impelidores). Nesse dispositivo, a agitação ocorre exclusivamente pela passagem do gás através do equipamento. Apesar de sua simplicidade, este modelo tende a ter um ótimo custo benefício, dependendo do tipo de processo que será conduzido no seu interior. No entanto, apresentam limitações quando operam com sistemas altamente viscosos ou com microrganismos muito sensíveis à tensão de cisalhamento. Em cultivos envolvendo microrganismos unicelulares com paredes celulares mais rígidas e com baixa viscosidade no meio, como bactérias e leveduras, eles são uma escolha adequada.

Outro ponto relevante quando a discussão está relacionada uso de biorreatores em processos bioquímicos, é a questão da geometria do equipamento e como ela influencia nos parâmetros de eficiência, já que o design do biorreator afeta diretamente a distribuição das bolhas, área interfacial gás-líquido, k_{LA} e gradientes de concentração e temperatura.

Um biorreator coluna de bolhas apresenta-se comumente com geometria cilíndrica vertical. A relação altura/diâmetro (H/D) é crucial para seu desempenho (Shuler & Kargi, 2017).

A relação H/D superior a 10 aumenta o tempo de residência das bolhas, o que favorece a transferência de massa, mas alturas elevadas podem vir a gerar problemas de gradientes de temperatura e de concentração ao longo do reator (Garcia-Ochoa & Gomez, 2009). Já, quando a razão H/D é menor que 5, observa-se uma melhora na recirculação do líquido, mas, em contrapartida, menor será o tempo de residência das bolhas no reator. Portanto, o cuidado com

essa razão é imprescindível para otimizar a mistura e melhorar o desempenho do processo.

Por mais que o reator coluna de bolhas apresente uma geometria simples, nele também existem algumas regiões específicas que valem ser destacadas:

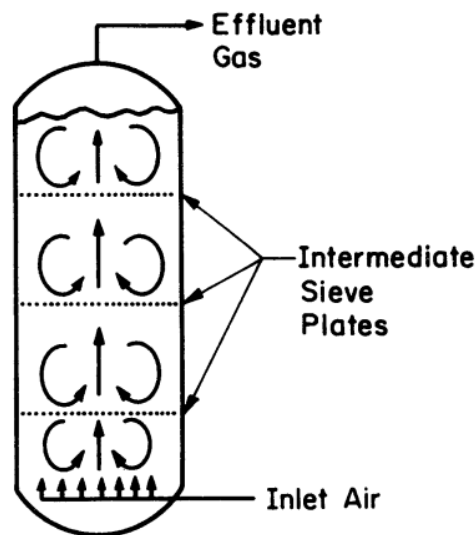
1. Zona de dispersão: Parte inferior do reator, onde as bolhas são aspergidas para dentro do meio por intermédio de um aspersor.

2. Zona de mistura: Região em que as bolhas se distribuem aleatoriamente no líquido e onde ocorre a maior parte da transferência de massa. Nessa região também ocorrem os fenômenos de quebra, quando a bolha se fragmenta em partes menores devido a forças mecânicas, diferenças de pressão ou interações interfaciais e a coalescência, quando duas ou mais bolhas se fundem para formar uma estrutura maior (LEAL, 2007).

3. Zona de separação: Parte superior, onde as bolhas se desprendem da dispersão gás-líquido e deixam o volume de controle.

A Figura 3 ilustra as diferentes regiões de um biorreator coluna de bolhas.

Figura 3 - Representação das zonas internas de um reator coluna de bolhas.



Fonte: Adnan (2015).

2.5. Crescimento celular

Este tópico engloba conceitos importantes relacionados a cultivos submersos de microrganismos e parâmetros importantes relacionados a sua eficiência de processo.

O crescimento celular é descrito em termos de diferentes fases, que representam a dinâmica populacional ao longo do tempo em cultivos (DORAN, 2012), esquematizado pela figura 4.

A fase lag (fase 1) corresponde ao período inicial do cultivo, momento em que os microrganismos (leveduras, no caso deste estudo) estão se adaptando ao ambiente. Normalmente, este período possui pouco ou nulo crescimento celular.

É comum fazer a ativação das leveduras. Este processo consiste em expor o microrganismo ao meio de cultura antes mesmo da sua inoculação e é interessante para diminuir a duração da fase lag quando o cultivo começar.

A ativação confere ao microrganismo o ajuste seu metabolismo às novas condições ambientais e este começa a sintetizar enzimas, que serão necessárias para metabolizar os nutrientes presentes no meio. Além disso, ocorre a hidratação da levedura tornando sua membrana funcional novamente para absorção de água.

Na fase exponencial (fase 3) ocorre a maior velocidade de crescimento celular, portanto, sendo de grande relevância para o desempenho do processo. Durante esse período, a variação celular é descrita pela Equação (5):

$$X = X_0 * e^{\mu_{max} * t} \quad (5)$$

Em que:

X : Concentração de biomassa (g/L);

X_0 : Concentração inicial de biomassa (g/L);

t : tempo (h);

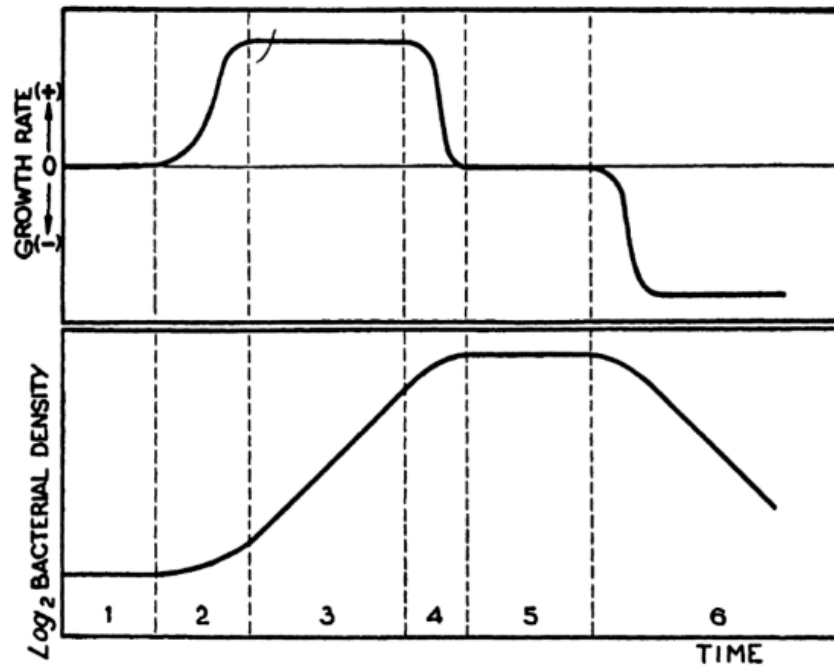
μ_{max} : velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}).

Posteriormente ao ápice do crescimento celular, ocorre uma diminuição na velocidade, devido principalmente ao início da escassez de nutrientes no caldo de cultivo.. Na fase estacionária (fase 5), a velocidade de crescimento passa a ser igual à de morte celular, e a produção de metabólitos secundários passa a predominar.

Na fase de declínio (fase 6), a morte celular passa a ser predominante e a viabilidade celular é afetada tanto pela falta de nutrientes quanto por outros aspectos inibitórios.

Monod (1949) explicita mais duas fases, que seriam a de aceleração (fase 2), logo após a fase lag, que é um curto período de tempo antes da estabilização da velocidade de crescimento e a fase de retardação (fase 4), que antecede a fase estacionária, com curta duração, até que as velocidades de crescimento e morte se tornem iguais, não havendo mais aumento na densidade populacional do cultivo.

Figura 4 - Exemplificação das 6 fases de um cultivo pela visão de velocidade de crescimento e densidade populacional, ambas em relação ao tempo.



Fonte: Monod (1949).

2.5.1. Cinética do crescimento celular de Monod

Ao longo dos anos, muitos modelos matemáticos foram desenvolvidos para estudar a cinética do crescimento microbiano e os parâmetros relacionados à eficiência desse processo.

Em 1949, Jacques Monod apresentou seu modelo cinético para prever o comportamento microbiano relacionando com a velocidade específica de crescimento com a concentração de substrato limitante disponível no meio, de acordo com a equação:

$$\mu = \mu_{max} * \frac{C_s}{K_s + C_s} \quad (6)$$

Onde:

μ : Velocidade específica de crescimento (h^{-1});

μ_{max} : Velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1});

C_s : Concentração de substrato limitante (g/L);

K_s : Constante de saturação (g/L).

É importante salientar que uma quantidade de substrato (S) muito maior que K_s infere que o crescimento celular independe da concentração de substrato. Portanto, $\mu \approx \mu_{max}$.

Se S for substancialmente menor que K_s , é possível aproximar o termo $K_s + C_s$ para K_s tornando a velocidade de crescimento linearmente dependente da quantidade de substrato no meio.

$$\mu \approx \mu_{m\acute{a}x} * \frac{C_s}{K_s}$$

Para estabelecer seu modelo, Monod (1942) adotou algumas suposições e limitações. Dentre elas, que o crescimento é limitado por apenas um único substrato e não há inibição por este ou por produtos. Além disso, valores de temperatura, pH e de concentração de oxigênio são considerados constantes e ótimos.

Outro parâmetro importante na análise de cultivos é o rendimento. Com os valores de concentração de células e de substrato, pode-se calcular o coeficiente de rendimento celular, ou fator de conversão de substrato em células (Y_{C_X/C_S}).

$$Y_{C_X/C_S} = \frac{C_{Xf} - C_{Xi}}{C_{Si} - C_{Sf}} \quad (7)$$

3. METODOLOGIA

3.1. Materiais

Para garantir a realização do estudo, foram utilizados os seguintes materiais:

1. Reator coluna de bolhas cilíndrico simples de vidro de 2 L de capacidade útil;
2. Sensor polarográfico de oxigênio dissolvido InPro 6800 (METTLER-TOLEDO);
3. Fluxômetro AALBORG para ar, modelo GFC37 (0-50 L/min);
4. Sistema arduino UNO com válvulas solenoides;
5. Transmissor de oxigênio M4500 (METTLER-TOLEDO);
6. Banho termostático TC-500 (BROOKFIELD);
7. Pipetas de 1, 5 e 0,1 mL (EPPENDORF RESEARCH);
8. Espectrofotômetro (AMERSHAM BIOSCIENCES);
9. Balança AE 200 DeltaRange (METTLER-TOLEDO);
10. Incubadora com agitação orbital refrigerada de piso modelo SL-221 (SOLAB);
11. pHmetro;
12. Centrífuga refrigerada (EPPENDORF);

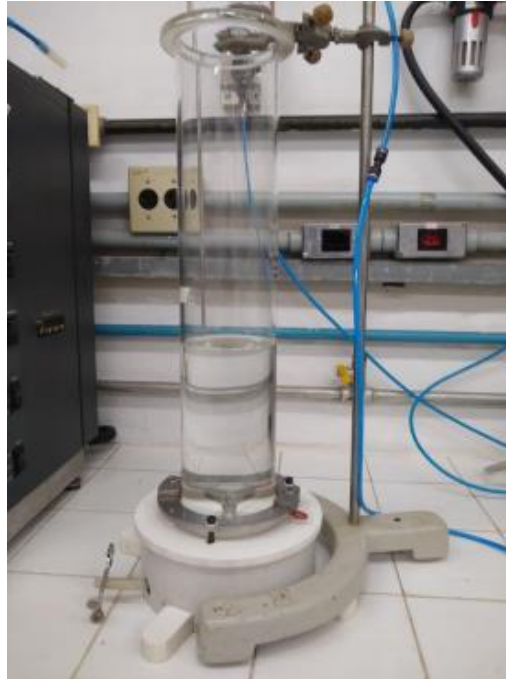
13. Shaker homogeneizador (EPPENDORF);
14. Kit glucose GOD/PAP;
15. Levedura *Saccharomyces cerevisiae*;
16. Extrato de levedura;
17. Glicose;
18. Ureia;
19. Sulfato de Magnésio hepta-hidratado (EXODO CIENTÍFICA);
20. Fosfato de potássio (EXODO CIENTÍFICA).

3.2. Métodos

3.2.1. Determinação da tensão de oxigênio dissolvido para o regime de alimentação contínuo - Método de degaseificação e reoxigenação

Os primeiros experimentos realizados em triplicata para cada condição tiveram como objetivo obter valores de oxigênio dissolvido ao longo do tempo, para posteriormente serem calculados os valores de k_{LA} e de E_{TO_2} nas vazões de 1, 2 e 3 vvm com regime alimentação contínua. O procedimento foi realizado no sistema bifásico ar/água e consistiu em adicionar 2 L de água destilada no reator coluna de bolhas equipado com um aspersor do tipo placa perfurada. Uma figura do equipamento pode ser visualizada na Figura 5 e as dimensões são apresentadas na Tabela 1. Em seguida, conectou-se o fluxômetro de ar e o sensor de oxigênio foi inserido até aproximadamente a metade da altura de líquido dentro do reator. Realizou-se a calibração do transmissor de oxigênio dissolvido (DOT) ajustando os valores mínimo e máximo de tensão de oxigênio dissolvido (DOT). Para isso, alimentou-se ar até a saturação da água com oxigênio, sendo a DOT fixando em 100%. Posteriormente, a alimentação de ar foi substituída por gás N_2 até que todo o oxigênio fosse removido, ajustando a DOT para 0%. Concluída a etapa de calibração, o transmissor foi conectado a uma placa de aquisição de dados (NATIONAL), a qual converte a medida analógica de DOT em digital, sendo os dados transferidos para o ultrabook SANSUMG e tratados com software dedicado que adquire os valores de DOT ao longo do tempo. A determinação de k_{LA} foi realizada a partir de um ensaio degrau. Após a calibração e alimentação com N_2 para atingir DOT = 0% a alimentação de N_2 foi interrompida e substituída por ar comprimido. Os valores de DOT foram adquiridos ao longo do tempo até alcançar um valor de DOT_f em que seja obtida a estabilização em torno de 100%.

Figura 5 - Reator Coluna de bolhas de 2 L de capacidade útil.



Fonte: acervo do autor.

Tabela 1 - Dimensões reator

Altura do reator (mm)	Diâmetro (mm)	Tipo de aspersor	Diâmetro do orifício (mm)
500	98	Placa perfurada com 161 orifícios	0,5

Fonte: acervo do autor

3.2.2. Avaliação da vazão de alimentação e dos intervalos de abertura (A)/fechamento (F) da válvula solenoide no k_{LA} e na E_{TO_2}

A etapa seguinte teve como objetivo avaliar a influência de diferentes condições de abertura e fechamento da válvula solenoide sobre o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}) e a eficiência de transferência de oxigênio (E_{TO_2}). A análise foi realizada com base em um planejamento fatorial 2^2 com ponto central, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Planejamento fatorial

Valores codificados		Valores reais Q_{ar} (vvm)	Intervalos de abertura/fechamento das válvulas solenoides (tempo fechado/tempo aberto em s)
-1	-1	1,0	3F/1A
-1	+1	1,0	1F/3A
+1	-1	3,0	3F/1A
+1	+1	3,0	1F/3A
0	0	2,0	2F/2A

Fonte: acervo do autor

A partir deste planejamento foram conduzidos ensaios em triplicata para a determinação de k_{LA} para o sistema com alimentação intermitente de ar. Para tal, o fluxômetro foi acoplado ao sistema arduino UNO com as válvulas solenoides para cessar a alimentação de ar periodicamente. Em seguida, foram realizados os cálculos de k_{LA} e E_{TO_2} para todas as condições avaliadas.

3.2.3. Determinação da constante de atraso do eletrodo (k_e)

Para a obtenção de valores do coeficiente de transferência de oxigênio (k_{LA}), faz-se necessário determinar a constante de atraso do eletrodo (k_e) para todas as condições de operação estudadas. O método para a determinação de k_e baseia-se numa mudança abrupta na concentração de oxigênio dissolvido, monitorando a resposta do eletrodo ao longo do tempo. O procedimento consiste em encher o reator com 2 L de água destilada e ligar a aeração na vazão estudada. Em seguida o sensor poligráfico é inserido no reator e realizada sua calibração expondo a valores de DOT=0% (N_2) e DOT=100% (ar). Com o sistema calibrado, o eletrodo é retirado do reator e exposto a uma atmosfera de N_2 (DOT=0%). Quando essa porcentagem de oxigênio dissolvido é atingida, o software de aquisição é acionado, inicia-se a gravação e o eletrodo é inserido novamente no reator com água saturada de O_2 do ar (DOT=100%). O ensaio perdura até que a leitura acuse DOT=95% de saturação de água com O_2 do ar.

O cálculo de k_e envolve um equacionamento prévio referente ao tempo característico de resposta do sistema do eletrodo (τ), parâmetro fundamental para modelagem de processos dinâmicos e representa o tempo necessário para que uma variável do sistema atinja 63,2% do seu valor final, após um ensaio degrau ($0 < DOT (\%) < 100$). Especificamente, para sistemas envolvendo transferência de oxigênio, sistemas de primeira ordem, τ está relacionado à

constante de decaimento exponencial e define a rapidez com que o sistema responde a uma perturbação (Ogata, 2010).

A equação diferencial de primeira ordem que descreve a variação da tensão de oxigênio dissolvido (DOT) em um sistema aerado pode ser descrita como:

$$\frac{dDOT}{dt} = k_e * (DOT^* - DOT) \quad (8)$$

Sendo:

DOT^* : Tensão de oxigênio dissolvido na condição de saturação de água com O_2 do ar (100%).

DOT : Tensão de oxigênio dissolvido no tempo t (%);

k_e : Constante de atraso do eletrodo (s^{-1})

t : tempo (s)

Resolvendo a equação diferencial pelo método de integração simples e considerando $DOT_0 = 0$ no instante inicial ($t_0 = 0$), tem-se:

$$DOT(t) = DOT^* * (1 - e^{-k_e * t}) \quad (9)$$

Sabendo que o tempo de característico de resposta do sistema τ é definido como:

$$\tau = \frac{1}{k_e} \quad (10)$$

Substituindo (9) em (8) e considerando $t = \tau$ tem-se:

$$DOT(\tau) = DOT^* * (1 - e^{-1}) = DOT^* * (1 - 1/e)$$

Portanto:

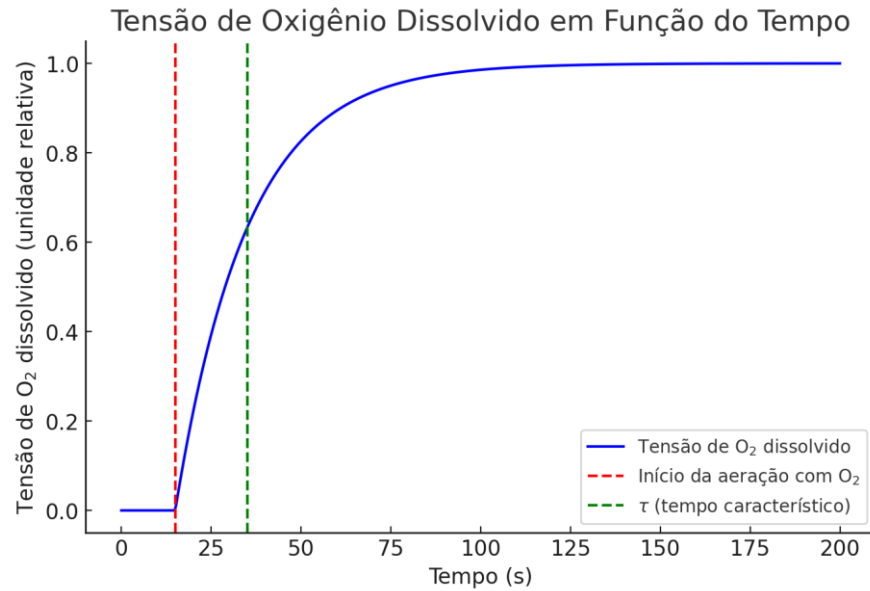
$$DOT(\tau) = DOT^* * 0,632$$

Considerando que a concentração máxima de saturação é 100%, tem-se que:

$$DOT(\tau) = 63,2\%$$

A Figura 6 ilustra a variação da DOT com o tempo no ensaio degrau para a determinação do tempo de resposta do eletrodo (τ).

Figura 6 - Representação gráfica da curva da tensão de oxigênio dissolvida no tempo



Fonte: acervo do autor

3.2.4. Cálculos para obtenção do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$)

3.2.4.1. Regime de aeração contínua

Ao final de cada ensaio é gerado um documento com os valores de DOT em função do tempo, como ilustra a Figura 7.

Figura 7: Planilha gerada pelo sistema de aquisição de dados durante um ensaio para a determinação de k_{La} .

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V
1	od_l mA	OD%	Ph	T_1 °C	T_2 °C	P_N/m²	flux_02	vazao_tot	UGS	vvm	flu ar	degrau od	Pparcial	coman_ba	coman aci	dp_descid	dp_subida	coman_an	comand te	iteracoes	miliseg	time
2	4,09	1,222	2,12	25,054	26,345	-5239,34	1,395	6,991	0,023	1,313	5,596	0	0,209	12	2	0	0	1	40	20	13115000	15:15:38
3	4,1	1,284	2,12	24,618	25,932	-5234,29	1,395	7,011	0,023	1,317	5,616	0	0,209	0	0	0	0	0	0	22	13116000	15:15:39
4	4,09	1,222	2,12	25,491	25,519	-5239,34	1,397	6,993	0,023	1,313	5,596	0	0,209	0	0	0	0	0	0	25	13117500	15:15:41
5	4,1	1,284	2,12	25,928	25,932	-5239,34	1,394	6,974	0,023	1,31	5,58	0	0,209	0	0	0	0	0	0	28	13119000	15:15:42
6	4,09	1,222	2,12	24,181	25,932	-5239,34	1,395	6,967	0,023	1,308	5,572	0	0,209	0	0	0	0	0	0	30	13120001	15:15:43
7	4,09	1,222	2,116	24,618	25,519	-5239,34	1,397	6,985	0,023	1,312	5,588	0	0,209	0	0	0	0	0	0	33	13121500	15:15:45
8	4,09	1,222	2,12	25,054	25,519	-5234,29	1,397	6,969	0,023	1,309	5,572	0	0,209	0	0	0	0	0	0	35	13122501	15:15:46
9	4,09	1,222	2,12	25,054	25,932	-5244,39	1,394	6,926	0,023	1,301	5,532	0	0,209	0	0	0	0	0	0	38	13124001	15:15:47
10	4,1	1,284	2,12	25,491	25,519	-5239,34	1,39	6,95	0,023	1,305	5,56	0	0,209	0	0	0	0	0	0	41	13125500	15:15:49
11	4,14	1,534	2,123	23,744	26,758	-5234,29	1,395	6,899	0,023	1,296	5,504	0	0,209	0	0	0	0	0	0	43	13126501	15:15:50
12	4,2	1,908	2,116	25,054	25,106	-5239,34	1,392	6,972	0,023	1,309	5,58	0	0,209	0	0	0	0	0	0	46	13128000	15:15:51
13	4,21	1,97	2,116	25,928	24,693	-5234,29	1,392	6,96	0,023	1,307	5,568	0	0,209	0	0	0	0	0	0	49	13129500	15:15:53
14	4,81	5,714	2,123	24,618	26,345	-5234,29	1,392	6,964	0,023	1,308	5,572	0	0,209	0	0	0	0	0	0	52	13131000	15:15:54
15	4,82	5,777	2,116	23,744	26,345	-5239,34	1,39	6,962	0,023	1,307	5,572	0	0,209	0	0	0	0	0	0	54	13132000	15:15:55
16	4,82	5,777	2,116	25,054	26,758	-5239,34	1,39	6,938	0,023	1,303	5,548	0	0,209	0	0	0	0	0	0	57	13133500	15:15:57
17	5,65	10,956	2,116	23,744	25,932	-5239,34	1,392	6,952	0,023	1,306	5,56	0	0,209	0	0	0	0	0	0	60	13135000	15:15:58
18	5,81	11,954	2,116	24,181	26,758	-5234,29	1,392	7	0,023	1,315	5,608	0	0,209	0	0	0	0	0	0	62	13136000	15:15:59
19	5,81	11,954	2,12	25,491	26,758	-5234,29	1,387	6,955	0,023	1,306	5,568	0	0,209	0	0	0	0	0	0	64	13137000	15:16:00
20	6,6	16,884	2,12	24,618	25,932	-5234,29	1,39	6,962	0,023	1,307	5,572	0	0,209	0	0	0	0	0	0	67	13138500	15:16:02
21	6,87	18,569	2,12	22,896	25,932	-5239,34	1,392	6,94	0,023	1,303	5,548	0	0,209	0	0	0	0	0	0	70	13140000	15:16:03
22	6,87	18,569	2,12	24,181	25,932	-5239,34	1,392	6,972	0,023	1,309	5,58	0	0,209	0	0	0	0	0	0	73	13141500	15:16:05
23	7,67	23,561	2,116	25,491	25,932	-5239,34	1,392	6,972	0,023	1,309	5,58	0	0,209	0	0	0	0	0	0	76	13143000	15:16:06
24	7,95	25,308	2,123	25,491	25,932	-5244,39	1,39	6,958	0,023	1,307	5,568	0	0,209	0	0	0	0	0	0	78	13144000	15:16:07
25	7,95	25,308	2,12	24,181	26,345	-5239,34	1,392	6,944	0,023	1,304	5,552	0	0,209	0	0	0	0	0	0	81	13145500	15:16:09
26	7,95	25,308	2,12	24,618	25,519	-5234,29	1,387	6,955	0,023	1,306	5,568	0	0,209	0	0	0	0	0	0	83	13146500	15:16:10
27	8,8	30,612	2,123	25,491	25,932	-5239,34	1,392	6,944	0,023	1,304	5,552	0	0,209	0	0	0	0	0	0	85	13147501	15:16:11
28	9,03	32,047	2,116	25,928	25,106	-5244,39	1,39	6,97	0,023	1,309	5,58	0	0,209	0	0	0	0	0	0	88	13149000	15:16:12
29	9,03	32,047	2,12	24,181	25,932	-5239,34	1,389	7,005	0,023	1,315	5,616	0	0,209	0	0	0	0	0	0	91	13150500	15:16:14

Fonte: acervo do próprio autor

O cálculo para obtenção dos valores de k_{La} é realizado por um processo iterativo utilizando o método dos mínimos quadrados (MMQ), que é facilitado se realizado em planilha Excel ou utilizando qualquer outro software de iteração. Para isso, é necessário transformar os horários em que os pontos foram coletados pelos seus respectivos tempos de ensaio, gerando colunas com valores de tempo (s) e de DOT (%) (identificados como “OD%” na planilha). O método tem como objetivo minimizar a soma dos quadrados dos resíduos (SQR) entre os valores de OD% experimentais e calculados pela equação:

$$DOT_{cal}(\%) = DOT_{e_0} * e^{(-k_e*(t-t_0))} + DOT^* * (1 - e^{(-k_e*(t-t_0))}) + \frac{k_e}{(k_e - k_{La})} * (DOT_0 - DOT^*) * (e^{(-k_{La}*(t-t_0))} - e^{(-k_e*(t-t_0))}) \quad (11)$$

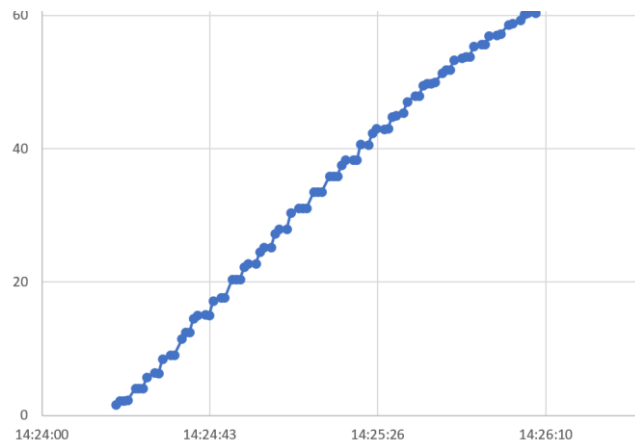
É possível criar uma coluna para calcular os quadrados dos resíduos (QR), uma célula para calcular a soma dos quadrados dos resíduos (SQR) e utilizar a função Solver do software Excel para minimizar essa soma estimando o valor de k_{La} .

3.2.4.2. Regime de aeração intermitente

A metodologia adotada para obter os valores de k_{La} com vazão de alimentação de ar intermitente segue o mesmo memorial de cálculo utilizado para o regime contínuo, entretanto, uma característica de ensaios de k_{La} com alimentação de ar no regime intermitente é que o gráfico OD% x t possui degraus, como reflexo dos pulsos de alimentação, como ilustrado na

Figura 8. Dessa forma, como o método dos mínimos quadrados utiliza a variação da função erro para ajustar os dados ao modelo, um gráfico com degraus pode conter pontos em que a derivada da função erro seja negativa. Nesse caso, ao invés de minimizar a soma dos quadrados dos resíduos, os pontos em questão não estariam corroborando para a minimização dessa soma e portanto, o cálculo com os dados originais de OD% em função do tempo, não seriam precisos.

Figura 8 - Trecho de uma curva OD% x t no regime intermitente de aeração evidenciando os degraus.

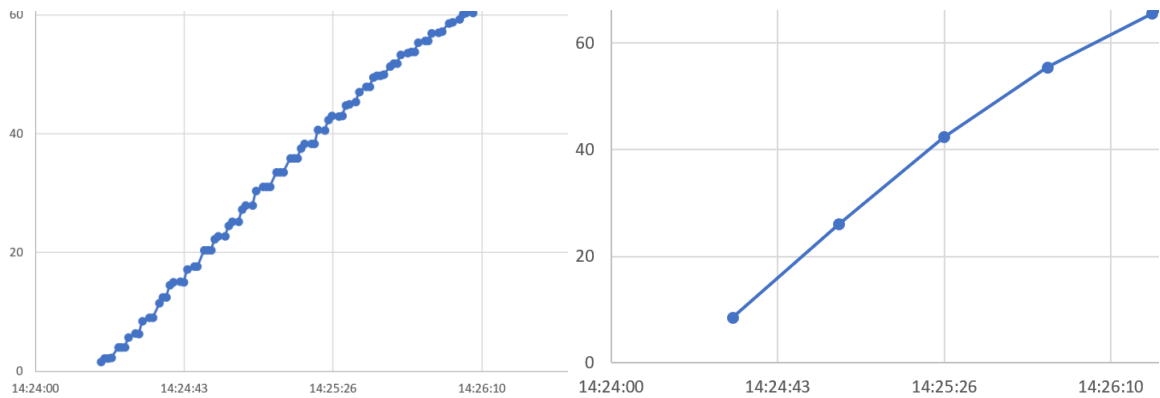


Fonte: acervo do autor

Assim, para que fosse possível obter valores de $k_L a$ válidos e consistentes, foi necessário filtrar os dados experimentais dos ensaios intermitentes, de maneira a se obter um gráfico suavizado e mais próximo do que seria o gráfico correspondente a um ensaio com aeração contínua. Os valores calculados pelo gráfico suavizado e pelos dados originais apresentaram uma variação na faixa de 45%, o que configura uma diferença expressiva para ser relevada.

O processo de suavização consistiu em realizar a média dos valores, a cada intervalo de 10 em pontos, tanto para o tempo quanto para os valores de OD%. Cada média corresponde a um novo ponto, que em conjunto dão origem a uma nova curva de OD% x t suavizada (Figura 9).

Figura 9 - Comparação entre os gráficos de OD% x t com valores originais e suavizados.



Fonte: acervo do autor

Em seguida, o procedimento para obtenção do $k_L a$ segue exatamente o mesmo procedimento explicado na seção 3.2.5.

3.2.5. Cálculos de E_{TO_2}

3.2.5.1. Regime de aeração contínuo

Para obter a quantidade de moles de oxigênio transferida para a fase líquida durante sob uma dada uma condição aeração, é necessário fazer algumas considerações preliminares. Primeiramente deve-se explicitar as condições experimentais, visto que elas vão influenciar na quantidade de oxigênio transferida.

Dentre elas, a concentração de saturação de oxigênio dissolvido, expressa pela Lei de Henry (Equação (12)):

$$C_{O_2}^{Sat} = K_H * p_{O_2} = y_{O_2} * P \quad (12)$$

Sendo:

$C_{O_2}^{Sat}$: Concentração de saturação de oxigênio na água (mol/L);

K_H : Constante de Henry ($mol.L^{-1}.atm^{-1}$);

p_{O_2} : Pressão parcial de oxigênio no ar de alimentação (atm);

y_{O_2} : fração molar de oxigênio no ar de alimentação (-);

P : pressão total (atm).

A Equação (12) define que $C_{O_2}^{Sat}$ depende da constante de Henry, que varia com a

temperatura, e da pressão (P). No caso, considera-se a temperatura de 25°C e a pressão barométrica $P = 0,9088 \text{ atm}$ (pressão atmosférica na cidade de São Carlos). Nessas condições, tem-se:

$$K_H = 0,00129 \text{ mol. L}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$$

Além disso, a pressão parcial de oxigênio é determinada pela fração de oxigênio presente no ar atmosférico, que é igual a 0,20946 (The Engineering ToolBox, 2020).

Outra consideração necessária envolve o fato de que o gás oxigênio na corrente de ar se comporta como gás ideal. Dessa forma, seu volume molar é calculado pela Equação 13:

$$V_{molar} = \frac{R \cdot T}{P} \quad (13)$$

Sendo:

V_{molar} : Volume molar do ar (L/mol);

R: Constante universal dos gases ($0,082057 \text{ L. atm. mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$);

P: Pressão do ar na entrada do reator (atm);

T: Temperatura do ar (K).

Com as considerações acima, é possível prosseguir para o cálculo efetivo da eficiência de transferência de oxigênio. Sabe-se que a E_{TO_2} é a dada pela relação entre a quantidade de moles de O_2 transferida para a fase líquida e a quantidade total de moles de O_2 alimentada. Os termos da equação (4) podem ser expressos pelas Equações (14) e (15) que seguem:

$$O_2^{transf} = \frac{(DOT_e^f - DOT_e^i) \cdot C_{O_2}^{Sat} \cdot V_{reator}}{100} \quad (14)$$

$$O_2^{alim} = \frac{Q^{ar} \cdot y_{O_2}^{ar} \cdot t_{alimentação}}{V_{molar}} \quad (15)$$

Sendo:

DOT_e^f : Tensão de oxigênio dissolvido final (%);

DOT_e^i : Tensão de oxigênio inicial dissolvido (%);

Q^{ar} : Vazão de alimentação de ar (L/s);

y_{O_2} : Fração molar de oxigênio na corrente de alimentação de ar;

$t_{alimentação}$: tempo de aeração efetiva (s);

V_{reator} : Volume do reator (L).

Por fim, E_{TO_2} é calculada pela Equação (4), retomada abaixo:

$$E_{TO_2} = \frac{O_2^{transf}}{O_2^{alim}} \quad (4)$$

3.2.5.2. No regime de aeração intermitente

O cálculo de E_{TO_2} no regime intermitente de aeração é da mesma forma que para o regime de aeração contínua, sendo a diferença devido ao tempo de aeração efetiva, uma fração do tempo total do ensaio e vai depender da condição de abertura e de fechamento das válvulas, que está em vigor. No caso de uma condição em que o oxigênio é aspergido por 3 segundos e cessa por 1 segundo, por exemplo, tem-se um tempo de aeração efetivo no final do ensaio de 75% do tempo total.

3.2.6. Avaliação das condições de aeração contínua e intermitente no crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Com os valores calculados de k_{LA} e de E_{TO_2} para condições contínuas e intermitentes de aeração, foi realizada uma análise prévia para entender quais condições seriam testadas em cultivos envolvendo o crescimento de microrganismos aeróbios. A princípio a condição com aeração contínua a 3 vvm e intermitente a 3 vvm com 1 segundo fechado e 3 segundos aberto (1F/3A) apontaram dados promissores, ou seja, valores elevados de k_{LA} no espaço amostral estudado e uma diferença considerável na E_{TO_2} sendo o maior valor apontado pela condição intermitente. Estes, serão demonstrados e discutidos na seção de resultados.

Os dados foram analisados por um teste ANOVA de uma via para avaliar diferenças significativas entre os tratamentos, utilizando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As análises foram realizadas no software Excel, considerando como variáveis independentes a vazão e a configuração da aeração (contínua ou intermitente 1F/3A) compondo 2 grupos, com 3 tratamentos cada, e como variável dependente a E_{TO_2} .

O primeiro cultivo conduzido foi um cultivo aeróbio teste para avaliar o crescimento da

levedura e, a partir dos resultados experimentais, obter parâmetros cinéticos e encontrar as melhores condições iniciais dos cultivos sob condições de aeração contínua e intermitente para evitar que os ensaios fossem limitados pela falta de oxigênio.

No cultivo teste, o meio de cultura teve a seguinte condição inicial, 20 g/L de glicose e 2 g/L de inóculo (*S. cerevisiae* liofilizada), sendo a levedura ativada previamente com 10 g de glicose adicionada em 200 mL de meio de cultura. Ao final do cultivo, os resultados foram analisados e calculou-se a velocidade máxima de crescimento celular (μ_{max}) a partir dos dados experimentais de concentração celular (C_X) em função do tempo, calculada pela Equação 16.

$$C_X(g/L) = 0,451 * Abs_{505} * diluição \quad (16)$$

Sendo:

Abs_{505} : Valor de absorvância medido pelo espectrofotômetro calibrado na frequência de 505nm;

diluição: fator que explicita em quantas vezes a amostra analisada foi diluída.

Conhecendo os valores de C_X , calculou-se os valores de $\ln(C_X)$ e plotou-se o gráfico de $\ln(C_X)$ x t , que explicita a função da equação (17), a qual corresponde a equação (5) linearizada. Por meio do coeficiente angular da função, obteve-se o valor de μ_{max} .

$$\ln C_X = \ln C_{X_0} - \mu_{max} * t \quad (17)$$

Com o valor de μ_{max} , o software SimulaFerm do pacote computacional AnaBioPlus para análise de bioprocessos e a partir do modelo cinético de Monod, foi possível estimar a constante de saturação (K_S), que foi utilizada posteriormente em uma segunda simulação buscando identificar as condições iniciais dos experimentos para avaliar o crescimento celular de *S. cerevisiae* sob diferentes condições contínua e intermitente de aeração.

Além das simulações da cinética de crescimento, para encontrar os valores de concentrações iniciais de substrato (C_{S_0}) e de células (C_{X_0}) adequados para evitar limitação por oxigênio, utilizou-se de um equacionamento para prever qual seria a porcentagem de oxigênio dissolvido aos finais dos cultivos, com o intuito de certificar-se que não iria ocorrer um cenário de limitação por oxigênio.

Sabe-se que a concentração de oxigênio dissolvido em um determinado tempo depende

da concentração de saturação de oxigênio no meio (C^*), expressa por:

$$C_{O_2} = \frac{C_{O_2}^*}{100} * DOT(\%) \quad (18)$$

Sendo:

$C_{O_2}^*$: Concentração de saturação do oxigênio dissolvido no meio na temperatura do processo (mol/L);

C_{O_2} : Concentração de oxigênio dissolvido em um determinado tempo t (mol/L);

DOT : Porcentagem de oxigênio dissolvido no meio (%).

Assim, utilizou-se os tempos de 0,5; 1,0 e 2,0 h para a análise. A partir dos valores de C_X em cada um dos pontos, calculou-se a velocidade específica de respiração celular (Q_{O_2}) pela Equação (19) para cada tempo de cultivo e o valor médio.

$$Q_{O_2} = \frac{k_L a * (C_{O_2}^* - C_{O_2})}{C_X} \quad (19)$$

Com o valor da taxa metabólica média (Q_{O_2}) para o cultivo teste, calculou-se os valores de C_{O_2} utilizando o mesmo equacionamento, dessa vez, partindo da equação (19). Vários inputs de C_{X_0} e de C_{S_0} foram testados e utilizados para entender como se comportaria o crescimento celular e obter um valor de C_X visando utilizá-lo na equação (19). Enfim, com o valor de C_{O_2} foi possível utilizar a equação (18) e prever a tensão de oxigênio dissolvido no fim do cultivo para entender se haveria limitação por oxigênio ou não. Com as condições iniciais do processo simuladas e otimizadas, foram realizados os cultivos.

3.2.6.1. Determinação da concentração celular

A concentração celular (C_X) das amostras foi obtida pelo método gravimétrico da massa seca, por fornecer valores mais precisos e proporcionais à quantidade de biomassa (Carvalho, 2001).

Antes dos inícios dos cultivos, uma série de etapas foram concluídas para certificar que todos os resultados seriam possíveis de serem alcançados. Primeiramente, foram separados 21 tubos Eppendorfs de 2 mL, sendo 14 (dois por amostra) pesados vazios, os quais foram utilizados para análise de massa seca pela diferença entre as massas inicial (tubo vazio) e final

(tubo com o corpo de fundo seco em estufa à 60°C por 48 h contendo a massa seca do material biológico no seu interior após centrifugação, lavagem e centrifugação da amostra). A concentração celular (C_X) foi obtida dividindo a diferença das massas pelo volume da amostra retirada, como demonstrado na Equação (20). Os outros sete recipientes foram reservados para armazenar os sobrenadantes de cada ponto.

$$C_X = \frac{m_f - m_i}{V_a} \quad (20)$$

Sendo:

m_f : Massa final do Eppendorf após a secagem (g);

m_i : Massa inicial do Eppendorf vazio;

V_a : Volume da amostra.

3.2.6.2. Cultivo aeróbio de leveduras

O meio de cultura utilizado no cultivo de leveduras teve a seguinte composição: 20,0 g/L de glicose; 5,6 g/L de KH_2PO_4 ; 1,4 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 6,8 g/L de extrato de levedura e 5,32 g/L de ureia e pH ajustado em 4,6 ajustado com solução de HCl 5 M. O cultivo foi realizado em biorreator de 2 L a 30 °C com concentração inicial de células C_{X0} 1,5 g/L.

Após a inoculação, deu-se o início do cultivo e retiradas amostras em duplicata, de 30 em 30 minutos, até o tempo de 3 horas de cultivo, anotando-se a tensão de oxigênio dissolvido (DOT em %) no caldo. As amostras eram retiradas e distribuídas em 2 Eppendorf de 2 mL que eram colocados por 10 minutos em centrífuga a 4°C numa rotação de 10000 rpm. Depois da centrifugação foi utilizada uma pipeta automática de 1 mL para retirar o sobrenadante das amostras, que foram armazenados em geladeira para posterior análise de glicose. O corpo de fundo da centrifugação era ressuspendido, lavado, novamente centrifugado e levado para a secagem. Esse procedimento foi repetido até o final do experimento.

3.2.6.3. Preparação da curva de calibração de glicose

Este método, também conhecido como espectroscopia de absorção, relaciona a quantidade de luz emitida com a quantidade de luz não absorvida pela amostra em função do comprimento de onda. Esse fenômeno é conhecido como transmitância. A absorbância, também chamada de densidade óptica, é matematicamente definida como o logaritmo do inverso da transmitância. De acordo com a Lei de Beer, expressa pela Equação (21), a concentração de partículas sólidas em suspensão (C) apresenta uma relação diretamente proporcional com a

absorbância (A).

$$A = a * b * C \quad (21)$$

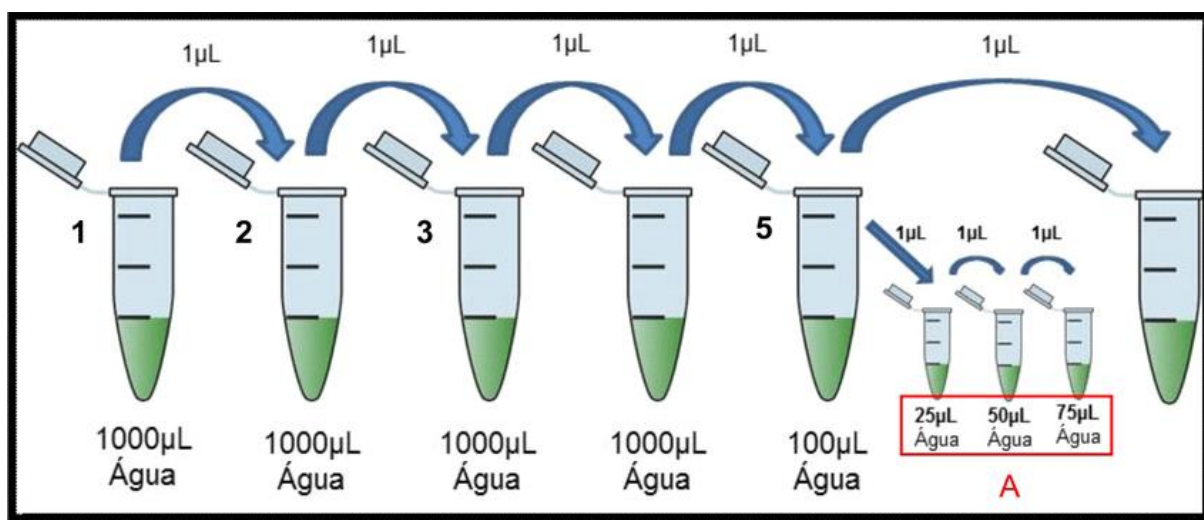
Entende-se “a” como a constante de proporcionalidade e “b” é o caminho óptico do meio absorvente.

Entretanto, para soluções muito concentradas, a lei de Lambert Beer não é válida. Devido à proximidade das partículas, ocorrem desvios da linearidade entre absorbância e concentração (SKOOG et al., 2006).

Portanto, deve-se construir uma curva de calibração para se obter uma equação que relacione a concentração de glicose com a absorbância.

Para isso, utiliza-se uma solução “mãe” de glicose de 2 g/L em um balão volumétrico de 100 mL. A partir dela, são criadas soluções de 1,5; 1,0; 0,5; 0,25 e 0,125 g/L, ou seja, são feitas diluições de 1,33; 2; 4; 8 e 16x. na figura 10, está representado um esquema representativo de uma diluição sequencial.

Figura 10 - Representação da diluição seriada



Fonte: Manso (2014) (Adaptado de Cruz et al., 2011)

Nesse trabalho, a primeira diluição foi a única que utilizou a solução inicial. Em seguida foi utilizado 1 mL da solução anterior e a esta, adicionou-se 1 mL de água destilada. Em caso de necessidade de descobrir o volume da solução mais concentrada que deve ser adicionada para obter determinada diluição, basta utilizar a Equação (22):

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2 \quad (22)$$

Sendo:

C_1 : Concentração da solução anterior.

V_1 : Volume da solução anterior que deve ser adicionado para obter a diluição em questão;

C_2 : Concentração da solução que se deseja obter;

V_2 : Volume total da solução que se deseja obter.

Com as soluções prontas, foram preparados 7 tubos Eppendorf com 1 mL do reagente do kit glucose GOD/PAP e adicionava-se 10 μL de uma das soluções diluídas, em cada um deles. Com os valores de absorbância obtidos, obteve-se o gráfico de " C_S vs. Abs" para obter a curva de calibração para a análise da concentração de glicose.

3.2.6.4. Análise da concentração de glicose

Ao final de cada cultivo tem-se as amostras de sobrenadantes refrigeradas. Deve-se retirá-las da geladeira e separar 15 tubos Eppendorfs. Sete destes são destinados à diluição da solução de sobrenadante, nos outros sete é adicionado 1 mL do reagente do Kit glucose GOD/PAP para possibilitar a leitura no espectrofotômetro e o último será direcionado para o "branco" (referência zero de absorbância).

Foi definida uma diluição de 10x (200 μL de sobrenadante para 1800 μL de água) para os pontos de 0 e 2,0 h e uma diluição de 5x (400 μL de sobrenadante para 1600 μL de água) para os pontos de 2,5 a 3,0 h. Foram feitas diluições distintas para as amostras, de forma que os valores de absorbância lidos estivessem dentro da faixa em que foi obtida para a curva de calibração. Após as diluições, utilizou-se a pipeta de 100 μL para adição de 10 μL da amostra diluída para tubo Eppendorf com 1 mL do reagente. Para preparação do branco foram adicionados 10 μL de água ao tubo Eppendorf com 1 mL de reagente.

Com todas as soluções prontas, ajustou-se a temperatura do banho maria em 37°C e as amostras são deixadas submersas por 10 minutos. Após este tempo, os tubos foram retirados, secos e realizadas as leituras das absorbâncias a 505 nm, ajustando inicialmente o zero utilizando como referência a solução branco. Para tal as amostras reagidas eram transferidas para uma cubeta de quartzo que era posicionada no espectrofotômetro, fechava-se o

compartimento de medida e o botão de leitura era acionado, obtendo na tela o valor da absorvância, que é diretamente proporcional à concentração de glicose.

Com os valores de absorvância das amostras retiradas ao longo do cultivo, os valores de concentração de glicose (substrato: C_S) foram obtidos pela equação de calibração que segue:

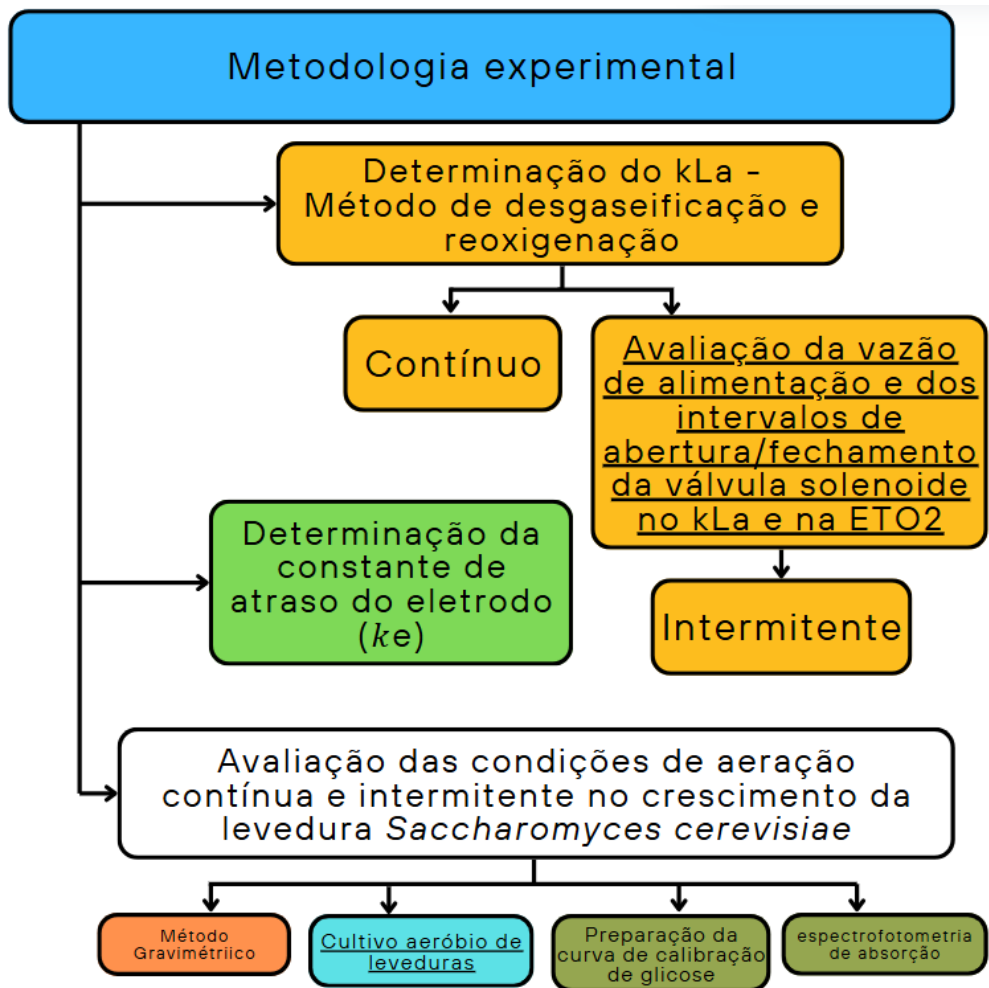
$$C_S = (a' * Abs - b') * diluição \quad (23)$$

Sendo:

a' : Coeficiente angular da curva de calibração;

b' : Coeficiente linear da curva de calibração;

Figura 11 - Fluxograma consolidado de toda metodologia experimental do estudo



Fonte: Acervo do autor.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Constante de atraso do eletrodo (k_e)

Na Tabela 3, pode-se consultar os valores das constantes de atraso do eletrodo (k_e) obtidas experimentalmente para as condições de aeração nos regimes contínuo e intermitente, que foram utilizadas nos cálculos dos coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio ($k_L a$).

Tabela 3 - Valores de k_e obtidos para as condições estudadas.

Vazão	k_e (s^{-1})
1,0 vvm contínuo	0,102
2,0 vvm contínuo	0,101
3,0 vvm contínuo	0,101
1,0 vvm intermitente (3F/1A)	0,094
1,0 vvm intermitente (1F/3A)	0,094
2,0 vvm intermitente (2F/2A)	0,090
3,0 vvm intermitente (3F/1A)	0,083
3,0 vvm intermitente (1F/3A)	0,085

fonte: acervo do autor.

Pela tabela 3 verifica-se que os valores de k_e obtidos apresentaram baixa variabilidade. Como este parâmetro depende do material da membrana do sensor de oxigênio dissolvido, é de se esperar que para um mesmo eletrodo sejam encontrados valores semelhantes. Entretanto, a flutuação dos resultados, por mais que pequena, pode ser explicada pelo regime de escoamento, que varia de condição para condição e afeta o número de Reynolds (Re) em cada situação. Esta variação de Re e constatação de um regime mais ou menos turbulento implica em um tempo de resposta associado à mistura e renovação da camada difusiva. (BARD & FAULKNER, 2001).

4.2. Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$)

Na sequência encontram-se os valores de $k_L a$ calculados para as condições de aeração contínuas e intermitentes premissadas no planejamento experimental (item 3.2.2).

Tabela 4 - Valores obtidos para $k_L a$ de todas as condições estudadas

Vazão	$k_L a$ (h^{-1})	Desvio padrão
1,0 vvm contínuo	52,75	0,790
2,0 vvm contínuo	67,73	0,920
3,0 vvm contínuo	114,5	1,480
1,0 vvm intermitente (3F/1A)	14,60	0,230
1,0 vvm intermitente (1F/3A)	41,44	5,230
2,0 vvm intermitente (2F/2A)	52,04	0,290
3,0 vvm intermitente (3F/1A)	32,57	0,200
3,0 vvm intermitente (1F/3A)	117,40	3,090

Fonte: acervo do autor.

Pelos resultados da Tabela 4, é possível observar que os maiores valores de $k_L a$ foram obtidos nas condições de maior vazão, exceto para condição de 3 vvm - 3F/1A, em que se obteve um valor muito abaixo das outras duas condições com a mesma vazão. Fato que pode estar relacionado ao tempo de fechamento da válvula solenoide, indicando que um intervalo com 75% do tempo sem aeração acarreta em decréscimos significativos na transferência de oxigênio, o que pode comprometer o cultivo. O aumento de $k_L a$ devido ao aumento da vazão está atrelado à diminuição da espessura da película estagnada da fase líquida, devido à agitação mais intensa do meio, com o maior fluxo de ar no volume de controle, facilitando a transferência de oxigênio e contribuindo para os maiores valores de $k_L a$.

4.3. Eficiência de transferência de oxigênio (E_{TO_2})

Na Tabela 5 encontram-se os valores de eficiência de transferência de oxigênio (E_{TO_2}) calculados para as condições de aeração contínuas e intermitentes propostas no planejamento experimental (item 3.2.2).

Tabela 5 - Valores obtidos para E_{TO_2} de todas as condições estudadas

Condição	E_{TO_2} (%)	Desvio padrão
1,0 vvm contínuo	0,740	0,004
2,0 vvm contínuo	0,500	0,005
3,0 vvm contínuo	0,490	0,021
1,0 vvm intermitente (3F/1A)	0,796	0,005
1,0 vvm intermitente (1F/3A)	0,698	0,085
2,0 vvm intermitente (2F/2A)	0,641	0,014
3,0 vvm intermitente (3F/1A)	0,553	0,002
3,0 vvm intermitente (1F/3A)	0,529	0,004

Fonte: acervo do autor.

Analisando os resultados da Tabela 5, observa-se um comportamento de diminuição na eficiência de transferência de oxigênio (E_{TO_2}), conforme a vazão de alimentação é aumentada. Isso pode ser explicado pelo fato, que conforme aumenta-se a vazão, a quantidade alimentada (denominador) supera a quantidade transferida (numerador), influenciando negativamente na eficiência de uso do gás.

Com base na análise dos dados das tabelas 4 e 5 uma combinação comparativa chamou a atenção em relação aos valores de k_La e E_{TO_2} . Observando as condições 3,0 vvm com aeração contínua e 3,0 vvm com aeração intermitente 1F/3A, verifica-se, que elas possuem os maiores valores de k_La entre as condições estudadas. Mesmo que o desvio padrão tenha sido alto, a condição mais próxima apresentou um valor de k_La cerca de 50% menor. Além disso, a condição intermitente demonstrou uma eficiência de transferência de oxigênio maior que a condição com aeração contínua, ou seja, maior capacidade de transferência de oxigênio junto de uma maior eficiência no uso do gás, o que é relevante pensando em um cultivo real. Entretanto, para certificar de que essa diferença na eficiência era realmente significativa, foi necessário fazer um teste ANOVA para garantir que esses pontos seriam estatisticamente distintos, antes de prosseguir com as análises.

4.4. Análise estatística para verificação de significatividade

As tabelas que seguem apresentam os resultados do teste realizado para garantir que as condições escolhidas e seus parâmetros calculados apresentavam diferenças significativas em nível estatístico, em vias de obter uma garantia prévia de escolha destas como condições para os cultivos com seres vivos.

Tabela 6 - Divisão de grupos e tratamentos.

Tratamentos	Grupos	
	A	B
1	0,52502	0,48804
2	0,53031	0,47024
3	0,53279	0,51115

Fonte: Acervo do autor.

Tabela 7 - Valores obtidos de soma, média e variância entre os tratamentos do mesmo grupo.

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
A	3	1,58812	0,529373	1,58E-05
B	3	1,46943	0,48981	0,000421

Fonte: Acervo do autor.

Tabela 8 - Teste ANOVA.

Fonte da variação	SQ	Gl	MQ	F calc	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,002348	1	0,002348	10,75759	0,030504	7,708647
Dentro dos grupos	0,000873	4	0,000218			
Total	0,003221	5				

Fonte: Acervo do autor.

Com base nos resultados da Tabela 6, pode-se inferir o número de grupos e o número de tratamentos em cada grupo. Na Tabela 7 estão apresentados os resultados dos cálculos de soma de quadrados, graus de liberdade e médias quadráticas, que são utilizados para inferir se as diferenças são significativas ou não. No caso, o que importa é entender apenas se há diferenças significativas entre os grupos. Logo, F_{calc} foi calculado apenas para essa análise. Como $F_{calc} > F_{crítico}$, a hipótese H_0 foi rejeitada e, portanto, existe diferença significativa entre as duas condições analisadas.

Com a validação estatística, as condições de aeração para 3,0 vvm com aeração contínua e 3,0 vvm com aeração intermitente 1F/3A foram escolhidas para a realização dos cultivos.

4.5. Cultivo teste

Como apresentado na metodologia, o cultivo teste serviu como base de estudo do comportamento da levedura *S. cerevisiae* e teve papel importante na decisão das condições iniciais do processo.

No experimento teste, os valores de C_x foram obtidos a partir da densidade ótica, visto que é uma maneira mais rápida de obter estes valores, uma vez que depende apenas da diluição das amostras e leitura das absorvâncias, não sendo necessário aguardar a secagem das amostras. A análise para determinação das condições iniciais se baseou nos resultados apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores de concentração de levedura ao longo do cultivo teste.

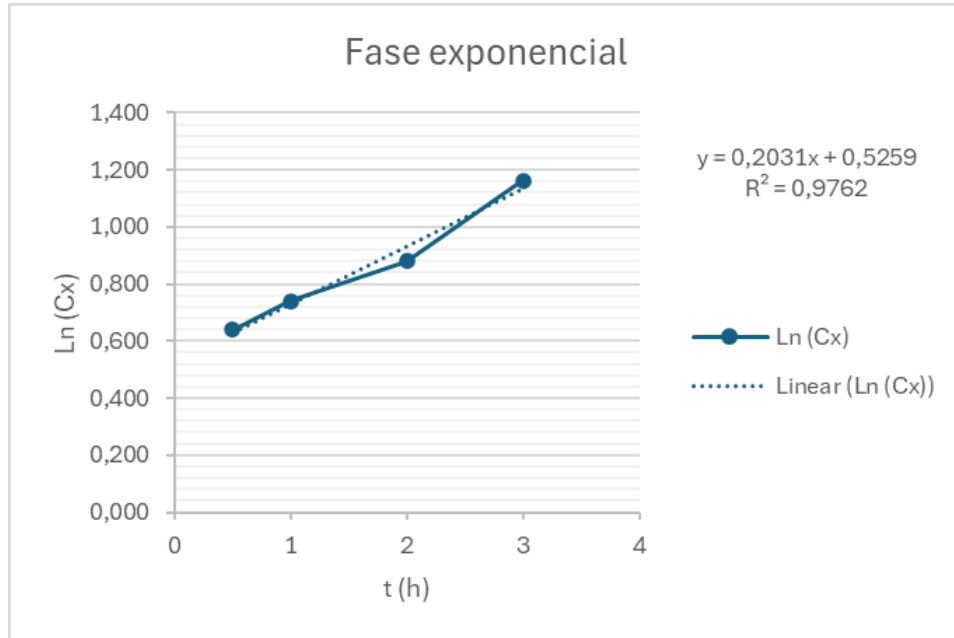
Tempo (h)	Absorbância	C_x (g/L)	$\ln(C_x)$
0	0,082	1,849	0,615
0,5	0,084	1,894	0,639
1,0	0,093	2,097	0,741
2,0	0,107	2,413	0,881
3,0	0,142	3,202	1,164

Fonte: Acervo do autor.

Com base nos resultados foi possível obter o gráfico do logaritmo neperiano da concentração de levedura em função do tempo (Figura 12) e o coeficiente angular da curva da fase exponencial (representada pela parte linear do gráfico), que corresponde à velocidade

específica máxima de crescimento celular (μ_{max}).

Figura 12 - Logaritmo neperiano de C_X em função do tempo do cultivo teste, com ênfase na fase exponencial de crescimento.



Fonte: Acervo do autor.

Com base em um ajuste linear nos pontos do gráfico da Figura 10, obteve-se o valor de $\mu_{max} = 0,203 \text{ h}^{-1}$, o qual é importante para realizar simulações e obter os demais parâmetros cinéticos envolvidos.

Antes das simulações, também foi necessário calcular o decaimento da concentração de substrato (C_S) utilizando a curva de calibração de glicose construída previamente. Os valores utilizados para a preparação da curva de calibração são apresentados na Tabela 10.

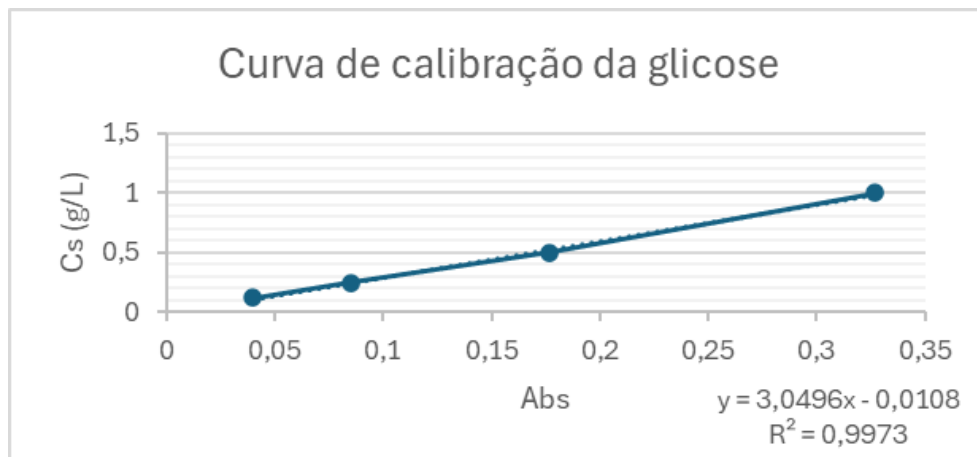
Tabela 10 - Valores de absorvância utilizados para a construção da curva de calibração de glicose.

C_S (g/L)	Absorvância
0,125	0,040
0,250	0,085
0,500	0,177
1,000	0,327

Fonte: Acervo do autor.

Foram utilizadas soluções com concentração de 0,125 g/L até 1,0 g/L. Os valores de C_s em função de absorvância estão ilustrados no gráfico da Figura 13, onde se observa uma linearidade entre essas variáveis.

Figura 13 – Gráfico de C_s em função de absorvância para a obtenção da equação de calibração.



Fonte: Acervo do autor.

A partir da equação de calibração, foram calculados os valores de concentração de glicose (C_s) ao longo do tempo pela Equação (24).

$$C_s = (3,0496 * Abs - 0,0108) * diluição \quad (R^2=0,997) \quad (24)$$

A Tabela 11 apresenta os valores de C_s em função do tempo de cultivo.

Tabela 11 - Variação da concentração de substrato (C_s) ao longo do tempo.

Tempo (h)	Absorbância	C_s (g/L)
0	0,275	20,696
0,5	0,261	19,629
1,0	0,243	18,256
2,0	0,185	13,834
3,0	0,087	6,363

Fonte: Acervo do autor.

Conhecendo-se os valores de C_X e de C_S ao longo do cultivo, foi possível o valor do coeficiente global de rendimento celular ($Y_{X/S}$) como sendo:

$$Y_{X/S} = 0,094 \text{ g}_X \cdot \text{g}_S^{-1}$$

4.5.1. Modelagem e simulação do crescimento e da respiração celular

Com os valores iniciais de concentrações de substrato (C_{S_0}), de células (C_{X_0}), do valor de $Y_{X/S}$ e de velocidade máxima de crescimento celular (μ_{max}), pode-se estimar o valor da constante de saturação (K_S) do modelo cinético de Monod (1942) de crescimento celular (equação (5)), utilizando o software SimulaFerm do pacote computacional AnaBioPlus. Este software integra numericamente C_X e C_S em função do tempo, portanto resolve duas EDO's para obtenção dos parâmetros de processo.

A Figura 14 ilustra a tela inicial do software SimulaFerm onde são inseridas as informações para realizar a simulação do crescimento celular.

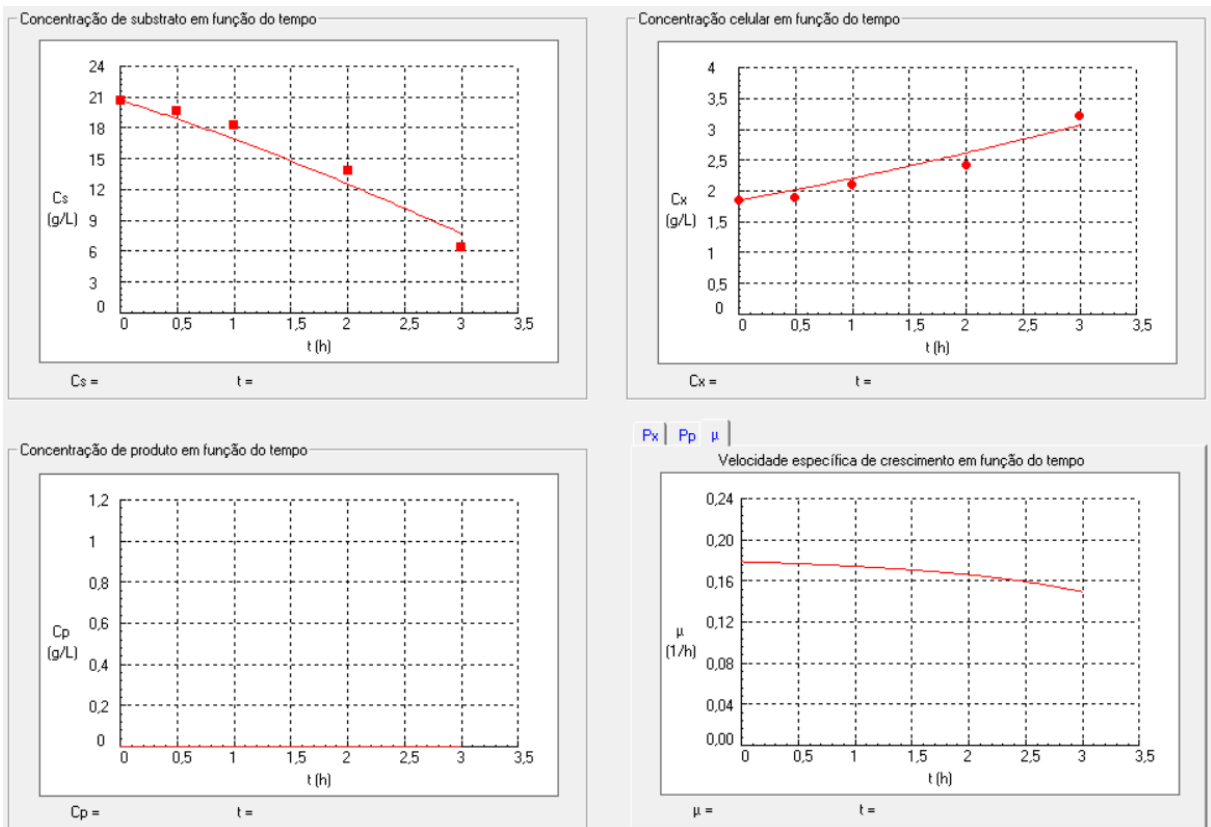
Figura 14 - Condições iniciais e parâmetros utilizados como inputs nas simulações no software SimulaFerm para encontrar o valor da constante de saturação (K_S) do modelo cinético de Monod (1942).

Condições iniciais	
$C_{X_0} = 1.849$ (g/L)	$C_{P_0} = 0$ (g/L)
$C_{S_0} = 20.696$ (g/L)	
Tempo de cultivo	
$t = 3$ (h)	
Coeficientes de rendimento <input type="radio"/> Estequiométrico <input checked="" type="radio"/> Global	
$Y_{X/S} = 0.094$ (-)	$Y_{P/S} =$ (-)
Condições de cultivo	
$m_s = 0$ (1/h)	$k_d =$ (1/h)
$k_{dp} =$ (1/h)	$C_{s1^*} =$ (g/L)
Modelo de crescimento celular: Monod	
$\mu_{max} = 0.203$ (1/h)	$C_{x^*} =$ (g/L)

Fonte: Acervo do autor.

Após algumas simulações o valor de $K_S = 2,8 \text{ g/L}$ promoveu, visualmente, o melhor ajuste do modelo aos resultados experimentais. A Figura 15 ilustra o ajuste do modelo aos dados experimentais.

Figura 15 - Tela do software SimulaFerm que ilustra o ajuste do modelo cinético de Monod (1942) aos dados experimentais de C_X e C_S em função do tempo.



Fonte: Acervo do autor.

Em seguida, utilizou-se o equacionamento apresentado no item 3.2.6, para encontrar as condições iniciais mais adequadas para o processo de crescimento celular sob condições de aeração contínua e intermitente a 3,0 vvm. Na Tabela 12 são apresentados, os valores de DOT (%) e na Tabela 13, os valores de concentração de oxigênio dissolvido e de Q_{O_2} calculados em cada instante de tempo, sendo estes últimos utilizados para o cálculo do valor de Q_{O_2} médio ao longo do cultivo teste.

Tabela 12 - Valores de tensão de oxigênio dissolvido (DOT) ao longo do cultivo teste.

Tempo (h)	DOT (%)
0,0	100,0
0,5	44,0
1,0	28,2
1,5	18,3
2,0	9,6
2,5	5,4
3,0	4,4

Fonte: Acervo do autor.

Para os cálculos cujos os valores encontram-se na Tabela 13, foi considerado o $k_L a$ obtido na condição de aeração contínua a 3,0 vvm, a qual o cultivo teste foi conduzido e como concentração de saturação do oxigênio a 30°C, utilizou-se o valor $C_{O_2}^* = 0,00754 \text{ g/L}$ (Garcia & Gordon, 1992).

Tabela 13 - Valores de velocidade específica de consumo de oxigênio (Q_{O_2}) ao longo do cultivo teste.

Tempo (h)	C_{O_2} (g/L)	Q_{O_2} ($g_{O_2} \cdot g_X^{-1} \cdot h^{-1}$)
0,5	0,00332	0,26
1,0	0,00213	0,30
2,0	0,00072	0,32

Fonte: Acervo do autor.

Pela média aritmética dos valores de Q_{O_2} encontrados, obteve-se o valor:

$$Q_{O_2} \text{ médio} = 0,29 \frac{g_{O_2}}{g_X \cdot h}$$

Observa-se que o valor obtido de Q_{O_2} médio encontra-se próximo ao valor de literatura para a levedura *S. cerevisiae* de $0,30 \frac{g_{O_2}}{g_X \cdot h}$ (BAILEY & OLLIS, 1986).

Seguindo o protocolo proposto na metodologia, foi possível obter as condições iniciais a serem utilizadas nos experimentos seguintes: $C_{X0} = 1,5 \text{ g/L}$ e $C_{S0} = 10 \text{ g/L}$.

4.6. Crescimento da levedura *S. cerevisiae* sob condições de aeração contínua e intermitente

Na sequência são apresentados todos os resultados de tensão de oxigênio dissolvido (DOT em %) nos experimentos conduzidos em duplicata a 3,0 vvm com aerações contínua e intermitente (1F/3A), de acordo com as condições iniciais escolhidas no item anterior.

Tabela 14 - Tensão de oxigênio dissolvido (DOT em %) ao longo dos cultivos de crescimento da levedura *S. cerevisiae* sob aerações contínua e intermitente a 3,0 vvm.

Tempo (h)	Aeração contínua		Aeração intermitente	
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 1	experimento 2
	DOT (%)	DOT (%)	DOT (%)	DOT (%)
0,0	100,0	100,0	100,0	100,0
0,5	67,0	65,6	52,5	52,9
1,0	58,0	58,3	43,1	44,0
1,5	51,1	50,3	31,8	35,0
2,0	43,4	43,6	22,4	25,5
2,5	36,4	36,1	15,9	18,4
3,0	30,7	29,2	11,9	10,9

Fonte: Acervo do autor.

Observando-se os valores de DOT (%) ao longo do tempo obtidos nos cultivos, é possível atestar que os experimentos conduzidos sob condições de aeração contínua e intermitente a 3,0 vvm apresentaram comportamentos bem semelhantes. Ao comparar o cultivo de aeração contínua com o de aeração intermitente, observa-se que o cultivo intermitente

apresentou um decaimento de DOT (%) um pouco mais rápido. A partir dessa informação pode se inferir algumas hipóteses. A primeira, é que no cultivo com aeração intermitente, o k_{LA} foi relativamente menor que na condição sob aeração contínua, o que não tinha sido observado na análise com o sistema água/ar. Nesse caso, a transferência de oxigênio para o meio líquido no cultivo intermitente não atendeu à demanda celular de forma tão eficiente quanto na condição de aeração contínua. Portanto, em caso de cultivos mais longos com as mesmas condições iniciais, pode ser que aerando intermitentemente, o processo viesse a ser limitado pela quantidade de oxigênio disponível no meio, que segundo a literatura seria abaixo de 10% da saturação com ar. Nesse caso, avaliando viabilizar a condição de aeração intermitente, outra análise a respeito das condições iniciais do processo deveria ser feita. Isso não significa afirmar que os cultivos conduzidos nesse estudo chegaram a essa situação, o que é comprovado pela análise de concentração celular ao longo do tempo apresentada na sequência.

A Tabela 15 apresenta os resultados obtidos das médias das duplicatas das concentrações de levedura (C_X) ao longo do tempo obtidas nos cultivos conduzidos sob condições de aeração contínua e intermitente a 3,0 vvm.

Tabela 15 - Valores de concentração celular (C_X) ao longo do tempo obtidas nos cultivos conduzidos sob condições de aeração contínua e intermitente a 3,0 vvm.

Tempo (h)	Aeração contínua		Aeração intermitente	
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 1	experimento 2
	C_X (g/L)	C_X (g/L)	C_X (g/L)	C_X (g/L)
0,0	1,23	1,15	1,03	1,25
0,5	1,23	1,25	1,17	1,35
1,0	1,57	1,50	1,48	1,48
1,5	1,52	1,72	1,75	1,80
2,0	2,07	2,10	2,05	2,20
2,5	2,45	2,63	2,35	2,65
3,0	3,10	3,12	3,17	3,35

Fonte: Acervo do autor.

Com base nos valores da Tabela 15, obtém-se valores médios para cada condição de

aeração empregada, apresentados na Tabela 16.

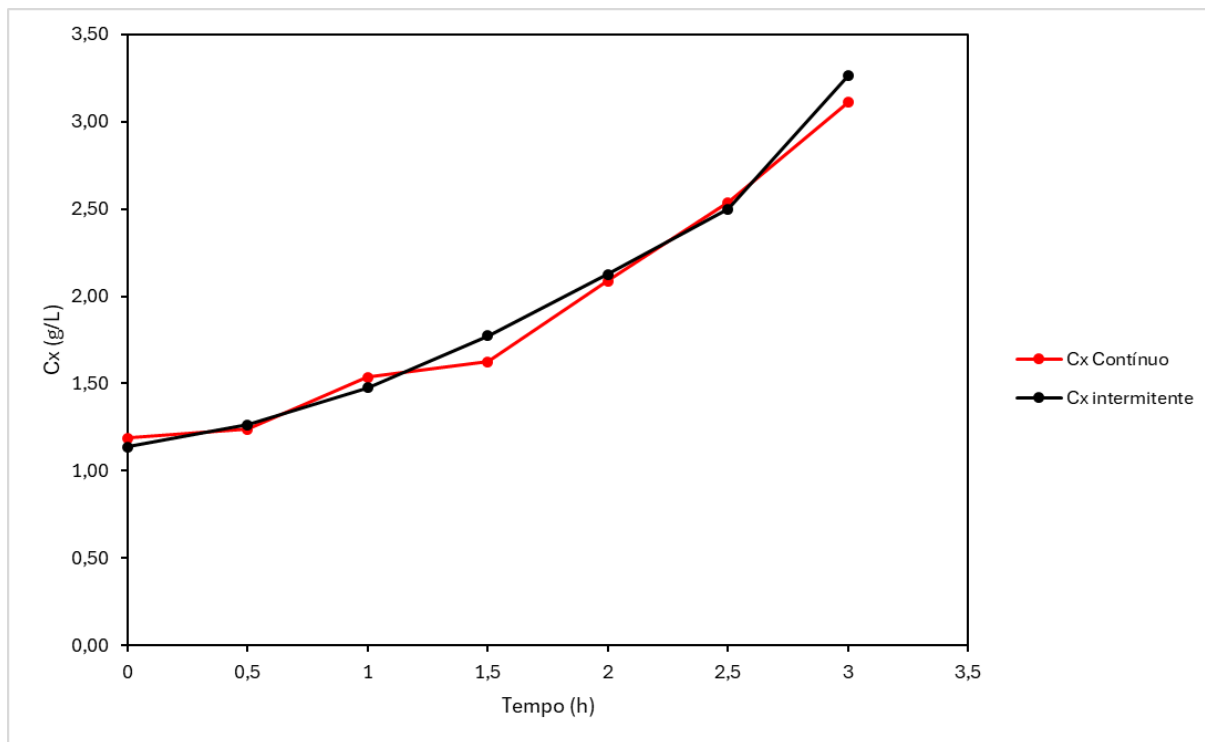
Tabela 16 - Médias das concentrações celulares (C_X) ao longo dos cultivos conduzidos sob condições de aeração contínua e intermitente a 3,0 vvm.

Tempo (h)	Aeração contínua	Aeração intermitente
	C_X (g/L)	C_X (g/L)
0,0	1,19	1,14
0,5	1,24	1,26
1,0	1,54	1,48
1,5	1,62	1,78
2,0	2,09	2,12
2,5	2,54	2,50
3,0	3,11	3,26

Fonte: Acervo do autor.

Plotando os valores de C_X (g/L) em função do tempo para as duas condições de aeração avaliadas, obtém-se a Figura 16:

Figura 16 - Perfil do crescimento celular médio para as duas condições de aeração avaliadas.



Fonte: Acervo do autor.

A partir da análise do gráfico da Figura 16 é possível observar que os crescimentos celulares foram similares para as duas condições de aeração estudadas. A aeração intermitente teve um crescimento até relativamente maior que a condição de aeração contínua. Portanto, mesmo que a condição intermitente tenha imposto uma menor condição de transferência de oxigênio e, por consequência, uma menor tensão de oxigênio dissolvido (DOT em %), essa situação não foi o suficiente para que o ensaio fosse limitado por oxigênio. Dessa forma, entende-se que é possível conduzir ensaios com aeração intermitente e obter crescimentos celulares páreos ou até maiores, que em condições de aeração contínua, com menor consumo de ar.

Além disso, o ponto mais importante dessa análise é em relação à economia na quantidade de oxigênio utilizado no cultivo. Para um cenário em que os ensaios conduzidos fossem conduzidos a 3,0 vvm, ou seja 6 L/min, por um período de 3 horas (180 minutos) e sabendo-se que a fração parcial de $O_2(g)$ no ar é de 0,20946, pode-se inferir que ao longo de cada ensaio foram gastos 226,5 L de oxigênio. Assim, os dois ensaios contínuos gastaram um total de 453 L de oxigênio. Considerando, que um cilindro de oxigênio de 50 L custa R\$ 1.200,00, pela cotação de 2018 da empresa Oxilumen, seriam necessários 9 cilindros de 50 L para realização dos cultivos, ou seja, um custo em torno de R\$10800,00.

Pela configuração de abertura e fechamento de válvula nos ensaios intermitentes, com 3 segundos aberta e 1 segundo fechada, o volume de ar gasto nestes ensaios é 25% menor que na condição contínua, visto que durante $\frac{1}{4}$ do tempo o ar não estava sendo aspergido. Portanto, nos ensaios intermitentes seriam gastos 339,75 L de oxigênio, o que infere num custo de R\$ 8.154,00. Portanto, R\$ 2.646,00 a menos no orçamento total e R\$ 1.323,00 a menos por ensaio realizado.

Para avaliar se há algum ganho de rendimento celular utilizando aeração intermitente, foram medidas as concentrações de glicose ao longo do cultivo. As tabelas 17 e 18 apresentam os valores das médias de absorvância das amostras utilizadas para o cálculo dos valores de C_S (g/L) no tempo, para as duas condições de aeração:

Tabela 17 - Valores de absorvância coletados para análise de concentração de glicose no tempo

Tempo (h)	Aeração Contínua	Aeração Intermitente
	Absorvância	Absorvância
0	0,354	0,392
0,5	0,341	0,375
1,0	0,294	0,360
1,5	0,248	0,310
2,0	0,224	0,397
2,5	0,283	0,314
3,0	0,076	0,140

Fonte: autor

Tabela 18 - Variação da concentração de glicose ao longo do tempo

Tempo (h)	Regime contínuo	Regime Intermitente
	C_S (g/L)	C_S (g/L)
0,0	10,67	11,85
0,5	10,28	11,31
1,0	8,84	10,87
1,5	7,46	9,35
2,0	6,72	7,63
2,5	4,26	4,73
3,0	1,10	2,07

fonte: autor

Quanto ao coeficiente de rendimento celular, a Tabela 19 apresenta os valores de $Y_{X/S}$ obtidos nos cultivos conduzidos sob aerações contínua e intermitente a 3,0 vvm.

Tabela 19 - Valores de coeficiente de rendimento celular obtidos nos cultivos conduzidos sob condições de aeração contínua e intermitente a 3,0 vvm.

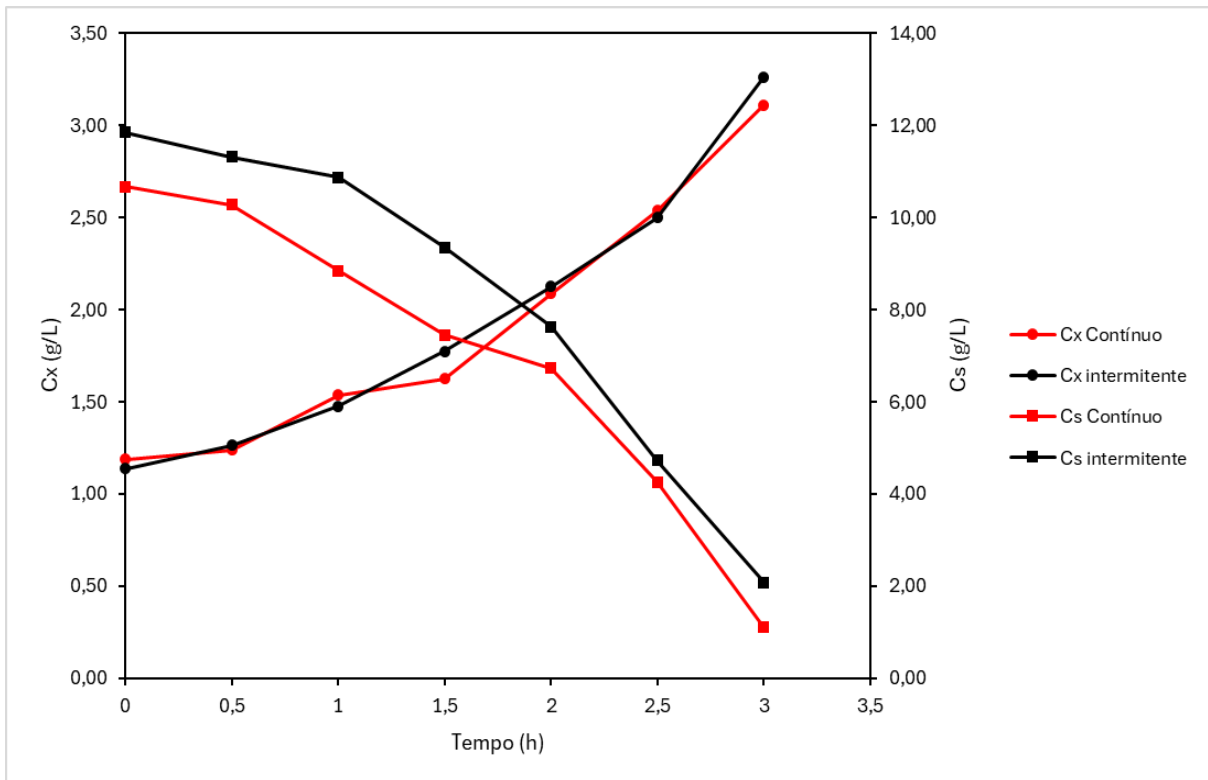
Regime Contínuo	Regime Intermitente
$Y_{X/S}$ ($g_X \cdot g_S^{-1}$)	$Y_{X/S}$ ($g_X \cdot g_S^{-1}$)
0,201	0,217

Fonte: Acervo do autor.

Observa-se que, além de uma redução de volume de gás gasto de 25%, o cultivo no regime intermitente também possibilitou um rendimento de substrato a células 2% maior, ou seja, esse resultado é uma evidência de que a aeração intermitente permite obter um rendimento celular similar ao de uma aeração contínua, porém com uma economia de 25% de gás utilizado. Assim, podendo ser ponto de partida para nortear e guiar outras análises de redução de custo de processo.

Na Figura 17 é possível verificar o perfil das curvas de concentração de células e de substrato ao longo do tempo.

Figura 17 – Perfil da concentração celular e da concentração de substrato para os ensaios com aeração contínua e intermitente



Fonte: Acervo do autor.

5. CONCLUSÕES

O estudo realizado expôs e desenvolveu uma nova abordagem para a aeração de cultivos microbianos em biorreator pneumático. Embora o trabalho tenha sido desenvolvido em escala laboratorial, é possível atestar sua relevância. Atingir uma redução de gasto com o uso do oxigênio na faixa de 25%, com um rendimento equivalente ao de um cultivo convencional, torna a aeração intermitente uma grande aliada na redução de custos de cultivos aeróbios, principalmente daqueles em que a biomassa em estudo tem um grande valor agregado, ou necessita da alimentação de oxigênio puro para que seu desenvolvimento não seja afetado. Além disso, outros bioprocessos que dependam de aeração podem adotar a aeração intermitente como forma de diminuição em seus custos e viabilização do processo. Portanto, a aeração intermitente pode vir a ser uma alternativa para aplicação em bioprocessos aeróbios.

Um possível desafio para a aeração intermitente em biorreatores pneumáticos é o aumento de escala. Mesmo com a aeração contínua operar um reator pneumático em larga escala já é uma tarefa difícil, visto que em reatores de grande escala a mistura não é uniforme, portanto são criados gradientes de oxigênio e de temperatura, uma vez que metabolismo celular

gera calor. Além disso, em reatores maiores existe maior probabilidade da criação do curto circuito gasoso (ESPERANÇA, 2018), onde as bolhas de ar praticamente não participam da transferência de massa antes de deixar o volume de controle, devido à ascensão rápida do gás. Aumentos de escala causam mudanças na hidrodinâmica do reator e, com um regime de aeração intermitente, contornar estes obstáculos parece um desafio ainda maior, em relação à aeração contínua. Dessa forma, uma possível sugestão para estudos futuros seria tentar prever o comportamento fluidodinâmico em reatores pneumáticos alimentados pelo regime intermitente por meio de simulações por fluidodinâmica computacional (CFD). Além disso, outra sugestão relevante seria estudar como outras organelas e microrganismos se comportam em meio à aeração intermitente, ou se existe alguma condição de abertura e fechamento de válvula ótima para este tipo de alimentação gasosa.

6. REFERÊNCIAS

- WHITMAN, W. G. *The two-film theory of gas absorption. Chemical & Metallurgical Engineering*, v. 29, n. 4, p. 146-148, **1923**.
- CHISTI, Y. *Airlift Bioreactors*. London: Elsevier Applied Science, **1989**.
- SHULER, M. L.; KARGI, F. *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*. Upper Saddle River: Prentice Hall, **2017**.
- LINEK, V.; VACEK, V. Mass transfer characteristics of gas-liquid contactors. *Chemical Engineering Science*, v. 36, n. 11, p. 1747-1755, **1981**.
- MONOD, J. The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, v. 3, n. 1, p. 371-394, **1949**.
- BIRD, R. B.; STEWART, W. E.; LIGHTFOOT, E. N. *Transport Phenomena*. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, **2002**.
- OGATA, K. *Modern Control Engineering*. 5. ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, **2010**.
- GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnology Advances*, v. 27, n. 2, p. 153-176, **2009**. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.10.006.
- DE DIOS, F.; SALAZAR, F.; MORENO, J. *Saccharomyces cerevisiae* metabolic regulation in aerobic fermentation for bioethanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, n. 17, p. 7367-7385, **2020**.
- WALKER, G. M.; STEWART, G. G. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented

beverages. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 80, n. 2, p. 395-411, **2016**.

OLIVEIRA, A. L. de. *Estudo da Transferência de Oxigênio em Biorreatores de Coluna de Bolhas*. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, **2005**. Disponível em: <http://repositorio.ufscar.br>. Acesso em: [inserir data de acesso].

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2nd ed. New York: McGraw-Hill, **1986**.

HEWITT, C. J.; NIENOW, A. W. The scale-up of microbial batch and fed-batch fermentation processes. In: LASKIN, A. I.; SUTHERLAND, I. W.; CHAKRABARTI, A. (Ed.). *Advances in Applied Microbiology*. v. 62. San Diego: Academic Press, p. 105-135, **2007**.

CHISTI, Y. Shear sensitivity. In: FLICKINGER, M. C.; DREW, S. W. (Ed.). *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*. v. 5. New York: Wiley, p. 2379-2406, **1999**.

SCHMIDELL, W.; QUEIROZ, J. A.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher, **2001**.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. *Biotecnologia: Manual de Microbiologia Industrial*. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher, **2005**.

CONCEIÇÃO, D. A.; GONÇALVES, G. F.; MORI, M. Montagem experimental de um reator tipo coluna de bolhas. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICAMP, 17., Campinas. *Anais...* Campinas: UNICAMP, **2009**.

LEAL, L. G. *Advanced Transport Phenomena: Fluid Mechanics and Convective Transport Processes*. Cambridge: Cambridge University Press, **2007**.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, **2001**.

SILVA, L. A. et al. Sensibilidade da PCR de amplificação de DNA bovino diluído. *ResearchGate*, **2017**.

CARVAJAL BARRIGA, Enrique. *Innovation in science: A toast for history*. **2013**.

WELTY, J. R. Convective mass transfer between phases. In: WELTY, J. R.; WICKS, C. E.; RORER, G. S. *Transport phenomena*. 4. ed. p. 487-522. New York: Wiley, **2007**.