



Universidade Estadual Paulista

Câmpus de São José do Rio Preto

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

DESENVOLVIMENTO DE UM BIORREATOR ROTATIVO PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

LINA MARÍA GRAJALES AGUDELO
Engenheira Química

Prof. JOÃO CLÁUDIO THOMÉO
Orientador

São José do Rio Preto,

Fevereiro 2014

LINA MARÍA GRAJALES AGUDELO

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIORREATOR ROTATIVO
PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas da Universidade
Estadual Paulista, Campus São José do Rio
Preto, como parte dos requisitos para a
obtenção do Título de Doutor em Engenharia
e Ciência de Alimentos na Área de
concentração em Engenharia de Alimentos.

Orientador: **Prof. JOÃO CLÁUDIO THOMÉO**

São José do Rio Preto,

Fevereiro 2014

Grajaes Agudelo, Lina María.

Desenvolvimento de um biorreator rotativo para produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido / Lina María Grajaes Agudelo -- São José do Rio Preto, 2014

148 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: João Cláudio Thoméo

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia industrial. 2. Biorreatores. 3. Fermentação em estado sólido. 4. Análise térmica. 5. Partículas. 6. Celulase.

I. Thoméo, João Cláudio. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 574.6

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

LINA MARÍA GRAJALES AGUDELO

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIORREATOR ROTATIVO
PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS POR
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas da Universidade
Estadual Paulista, Campus São José do Rio
Preto, como parte dos requisitos para a
obtenção do Título de Doutor em Engenharia
e Ciência de Alimentos na Área de
concentração em Engenharia de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Cláudio Thoméo
Professor Titular
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. José Teixeira Freire
Professor Titular
UFSCAR – São Carlos, SP

Profa. Marcos Antônio de Souza Barrozo
Professor Associado
UFU –Uberlândia, MG

Profa. Dra. Beatriz Vahan Kilikian
Professora Associada
USP – São Paulo, SP

Prof. Dr. Roberto da Silva
Professor Titular
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, Fevereiro 2014

“Não confunda jamais conhecimento com sabedoria. Um o ajuda a ganhar a vida; o outro a construir uma vida”,

Sandra Carey

*Aos meus adorados pais,
Hermes e Cristina,
e ao meu querido irmãozinho,
Leonardo.
Dedico.*



Agradecimentos

A Deus por permitir o início da minha carreira como pesquisadora.

A mis gordos y a mi muguer porque sin su apoyo no tendría las fuerzas necesarias para llevar a cabo mis proyectos de vida, los quiero mucho !!!!.

Ao meu querido eorado orientador, João Cláudio, pela formação, paciência e momentos compartilhados durante os últimos seis anos da minha vida. Você além de transmitir conhecimentos me transmitiu sabedoria e experiência, estarei eternamente agradecida por aquilo, “Gracias”. E.....continuarei aprendendo de você.

Aos professores Freire, Beatriz, Vanildo, Marquinhos e Robertinho, membros da banca, por contribuir na qualidade do trabalho mediante suas valiosas recomendações, conselhos e sugestões.

Ao meu grande Maestro e Amigo, Carlos Eduardo, porque a pesar da distância continua me ensinando e aconselhando quando necessário. Você foi, é e continuará sendo parte importante na minha formação pessoal e profissional; não tenho palavras para expressar minha gratidão e admiração por você.

À professora Cida pelos anos de amizade e pela ajuda recebida desde minha chegada ao Brasil até hoje.

A mi profesora Gloria por estar pendiente de mí, apoyarme y aconsejarme cada vez que lo necesito.

À Rosemar e à Silvinha pelo apoio em todas as circunstâncias difíceis ao longo destes seis anos.

Lina María Grajales Agudelo

Agradecimentos

A Cinthya por mantener intacta nuestra amistad a pesar de la distancia, te extraño amiga.

À Angélica, Guillermo, Franz, Marília, Milena e Esther.... meus “super” amigos, por me oferecerem sua amizade quando mais precisava dela.

Ao João Paulo, Yuri, Paty e Vicky por colaborar no desenvolvimento experimental da minha tese.

Ao Eduardito por me ajudar a montar o reator e por compartilhar tantos momentos incríveis no laboratório.

À Teresa, por ser como uma mãe e cuidar de todos nós no laboratório.

À Leandra, Fabrício, Isabela, Viviane, Fernanda e demais colegas do laboratório pela companhia durante a nossa travessia pelo caminho do conhecimento.

À Carol por se tornar uma grande amiga em muito pouco tempo e pelos longos períodos de companhia no laboratório.

Ao Ginaldo, nosso técnico preferido.

À Gislaine, pelas correções nas referências bibliográficas.

À CAPES e ao programa de pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos (IBILCE/UNESP) pelo financiamento dos quatro anos de doutorado.

A lista não termina!!!!. Peço desculpas para quem não está aqui e que de alguma maneira têm contribuído no desenvolvimento da minha tese.



Resumo

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver um biorreator de tambor rotativo para produzir enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido, utilizando o fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* I1D3b e empregando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substratos. O desenvolvimento do projeto foi realizado em cinco etapas. A primeira consistiu em visualizar a movimentação e mistura, radial e axial, de fibras de bagaço de cana-de-açúcar misturadas com farelo de trigo, na proporção de 70 e 30% (peso), respectivamente, com a finalidade de avaliar as melhores condições de mistura fornecidas pelos componentes internos do reator. Esta avaliação foi realizada em dois equipamentos: um tambor rotativo de parede móvel de acrílico, de 30cm de diâmetro e 60cm de comprimento, com defletores longitudinais retos e um tambor de aço com agitação interna através de pás e dimensões similares ao anterior. No primeiro equipamento havia a possibilidade de trabalhar-se com ou sem um tubo interno simulador de aeração no biorreator. As variáveis adotadas nos ensaios foram frequência de rotação do tambor e grau de enchimento, e a resposta foi o número de rotações necessárias à homogeneidade radial e à dispersão axial. Os resultados mostraram que a mistura radial das partículas de bagaço de cana e farelo de trigo depende diretamente da quantidade de material carregado dentro do tambor e é independente da frequência de rotação. A análise da movimentação de partículas mostrou que, independentemente da velocidade de rotação, os experimentos realizados em presença do tubo simulador de aeração evidenciaram pontos de baixa movimentação em torno do tubo imerso. O regime de movimentação das partículas detectado não se encontra dentro dos regimes estabelecidos na literatura. A dispersão axial no tambor com agitação interna através de pás foi maior do que a do tambor rotativo com defletores, porém no fundo do equipamento foi observada heterogeneidade entre as partículas, enquanto que no tambor rotativo foi observada mistura homogênea em todo o comprimento do tambor. A segunda etapa objetivou avaliar a capacidade de retenção de água pelas partículas sólidas, de modo a determinar, dentre as condições operacionais vazão de líquido, volume de líquido, intermitência de aspersão e número de aspersores, a que proporcionasse umidades homogêneas ao final dos ensaios. A maior homogeneidade

Resumo

na umidade das partículas foi obtida para a maior vazão de aspersão, 2500mL/min, sendo que as demais variáveis não afetaram significativamente a umidade final. A terceira etapa consistiu em determinar se a atividade das endoglucanases produzidas pelo fungo *Myceliophthora thermophila* I1D3b, cultivado na mistura bagaço-farelo, é afetada pela agitação mecânica do meio de cultivo, realizando-se a fermentação em um protótipo de biorreator de parede rotativa de 10cm de diâmetro por 20cm de comprimento, constatando-se que o fungo foi tolerante à rotação do tambor. Na quarta etapa, o biorreator de aço-inoxidável de parede rotativa de 30cm de diâmetro e 60cm de comprimento foi analisado termicamente frente a variações da aspersão de água e da rotação do tambor, tendo a variação temporal e espacial de temperatura como variável de resposta. Estes ensaios mostraram que a ação sinérgica da aspersão de água e a rotação do tambor contribuíram para a homogeneidade térmica, uma vez que ensaios realizados com o tambor estacionário e sem aspersão de água apresentaram gradientes radiais de temperatura expressivos, que foram praticamente eliminados em experimentos com rotação do tambor. As quatro etapas supramencionadas forneceram as condições de operação necessárias à realização das fermentações no biorreator rotativo de bancada, que foi capaz de reunir várias etapas do processo fermentativo no mesmo equipamento. Na quinta etapa, foram produzidas enzimas celulolíticas e suas atividades foram superiores às obtidas em sacos plásticos, podendo-se concluir que o equipamento desenvolvido e as condições operacionais estabelecidas são adequados à produção destas enzimas e potencialmente aplicáveis a equipamentos de maior porte.



Abstract

The main target of this thesis was to develop a rotating drum bioreactor to produce cellulolytic enzymes by solid-state fermentation, with the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* I-1D3b cultivated in sugar cane bagasse and wheat bran. The project was developed in five steps. The first step consisted in the movement visualization of the mixture bagasse-bran, weight proportion 7:3, respectively, to assess the best operational conditions to the particle movement in face of the internal elements of the drum. This evaluation was performed in two equipments: a rotating-wall drum made of Plexiglas, 30cm diameter and 60cm length, with straight baffles, and a stainless-steel drum with internal agitation promoted by paddles, with similar dimensions to the previously described drum. In the former equipment an inner tube, immersed into the bed of particles, could be used, in order to simulate the insertion of air in the real bioreactor to be used in the fermentation process. In these experiments, the controlled variables were the rotation frequency and the filling degree, and the response variable was the number of rotations required to obtain radial and axial homogeneity of the particle concentrations. The results showed that the radial mixture was directly related the load of particles in the drum, and no dependence was observed on the rotation frequency. A quicker homogeneity was obtained using the paddle drum, although some agglomeration of the material was observed in the frontal region. The experiments carried out using the inner tube showed quite low particle velocities around the tube. The particle flow regime was distinct of any other reported in literature. The axial dispersion in the paddle drum was higher, although some concentration heterogeneity was observed, while for the wall-rotating drum the concentration was evenly uniform. The second step was to assess the water retention capacity by the particles, targeting homogeneous moisture content at the end of the experiments. The tested variables were the water flow rate, water volume, sprinkling periods, and number of sprinklers. The only relevant variable was the water flow rate, and the best results were obtained at its highest value, 2500mL/min. The third step was to verify if the mechanical stress would affect the endoglucanase production by the fungus, in a rotating drum 10cm diameter and 20cm length. The results showed that the microorganism was tolerant to the drum rotation. In the fourth step, a stainless-steel rotating-wall bioreactor, 30cm diameter and 60cm long, was used to assess temporal and

special variations of temperature as a function of sprinkling water and wall rotation. The results showed that both variables acted synergistically to provide thermal homogeneity, since the experiments carried out with the stationary drum without water sprinkling presented significant radial temperature gradients, which were nearly eliminated with the wall rotation. The four steps previously mentioned provided the operational conditions required implementing the fifth step, the fermentation in the rotating-wall drum bioreactor. The equipment was able to group several steps of the process, and the endoglucanases were produced with activities higher than the ones obtained in plastic bags experiments. Hence, one could conclude that the designed bioreactor and the operational conditions here obtained were suitable to the production of such enzymes, indicating that the equipment has potential to be scaled up.



Resumen

El objetivo general de este trabajo fue desarrollar un biorreactor de tambor rotativo para producir enzimas celulolíticas por fermentación en estado sólido, utilizando el hongo *Myceliophthora thermophila* I1D3b y empleando bagazo de caña y salvado de trigo como sustratos. El proyecto fue realizado en cinco grandes etapas. La primera consistió en visualizar el movimiento y mezcla, radial y axial, de fibras de bagazo de caña mezcladas con salvado de trigo en una proporción de 70 a 30%, respectivamente, con la finalidad de evaluar las mejores condiciones de mezclado ofrecidas por los componentes internos del reactor. Esta evaluación fue realizada en dos equipos: un tambor rotativo de pared móvil construido en acrílico con deflectores longitudinales rectos y un tambor de acero inoxidable con agitación interna a través de palas. El primer equipo tenía la posibilidad de trabajar con o sin tubo interno, el cual estaba inmerso en las partículas y su función era simular la inserción de aire en el biorreactor empleado en el proceso fermentativo. Las variables adoptadas en estos ensayos fueron frecuencia de rotación y carga de material dentro del tambor, la variable respuesta fue el número de rotaciones necesarias para obtener homogeneidad radial y axial. Los resultados mostraron que la mezcla radial depende directamente de la cantidad de material cargado en el tambor y es independiente de la frecuencia de rotación del mismo. En el tambor con agitación interna fue alcanzada la homogeneidad de forma más rápida, sin embargo, fue observada aglomeración de material en la parte frontal del equipo. El análisis del movimiento de partículas mostró que, independiente de la velocidad de rotación del tambor, los experimentos realizados en presencia del tubo interno simulador de aeración evidenciaron puntos de movimientos lentos en esta zona. En este trabajo, el régimen de movimiento detectado no se encuentra dentro de los regímenes establecidos para partículas regulares, pues se encontró que las partículas se elevan con ayuda de los deflectores hasta que la capa superficial cae como un bloque o aglomerado, de forma que primero caen dos bloques pequeños y después uno más grande, y este movimiento se repite. El tamaño del bloque formado aumenta conforme aumenta el número de Froude y la cantidad de material cargado. La homogeneidad axial en el tambor con agitación interna, fue extremadamente alto comparado con el tambor rotativo con

deflectores, sin embargo, se observó heterogeneidad entre las partículas del fondo del fondo de tambor con agitación, mientras que en el tambor con deflectores se obtuvo mezcla homogénea en toda su longitud. La segunda etapa objetivó evaluar la capacidad de retención de agua por las partículas sólidas a través de la aspersión de solución de Rodamina B sobre el lecho. Esta etapa fue realizada en el tambor rotativo con deflectores dotado de aspersores agrícolas en la parte superior. El objetivo fue determinar entre las condiciones operacionales: caudal de líquido, volumen de líquido, intermitencia de adición y número de aspersores, la que proporcionase las humedades más homogéneas al final de los experimentos. La humedad con menor desviación estándar fue obtenida para el mayor caudal de aspersión, 2500mL/min. Las variables: volumen por intervalo de aspersión y número de aspersores no mostraron diferencia estadísticamente significativa para las tres cargas evaluadas. La tercera etapa consistió en determinar si la actividad de endoglucanases producidas por el hongo *Myceliophthora thermophila* I1D3b se ve afectada por la agitación mecánica del mismo, realizándose la fermentación en un modelo de biorreactor de tambor rotativo construido en aluminio. Estos experimentos fermentativos mostraron que el hongo es tolerante a la rotación del tambor y las actividades enzimáticas obtenidas fueron en promedio superiores a las muestras de referencia preparadas y fermentadas en bolsas plásticas de polipropileno. En la cuarta etapa, el sistema fue analizado térmicamente frente a los cambios en las temperaturas del medio particulado, de la aspersión de agua y de la rotación del tambor. El equipo utilizado fue un tambor de pared rotativa de acero inoxidable de dimensiones y arquitectura similar al empleado en los ensayos de movimiento de partículas. Estos ensayos mostraron que la acción sinérgica de la aspersión de agua y la rotación del tambor contribuyen para un buen control de la temperatura, tanto para enfriamiento como para calentamiento. Los experimentos realizados con la posición fija del tambor presentaron gradientes radiales de temperatura expresivos, los cuales fueron prácticamente eliminados en experimentos similares con la rotación del tambor. En último lugar, las cuatro etapas previamente mencionadas proporcionaron las condiciones de operación necesarias para la realización de las fermentaciones en escala de bancada y, además, se logró reunir varias etapas del proceso en un solo equipo. En la quinta etapa, enzimas celulolíticas fueron producidas y sus actividades enzimáticas fueron en promedio superiores a las obtenidas en las bolsas plásticas, concluyéndose que el equipo desarrollado y las condiciones operacionales establecidas son adecuadas para la producción de estas enzimas y potencialmente aplicables a equipos de mayor tamaño.

Nomenclatura

A	Área rosa lida pelo <i>software Lenseye</i> (porcentagem)
AE	Atividade enzimática
C	Concentração de traçador (porcentagem)
C_0	Concentração inicial de traçador (porcentagem)
C_R	Concentração de Rodamina B (g/L)
CV	Coeficiente de variação
D	Coeficiente de dispersão axial (cm ² /min)
D_C	Diâmetro do cilindro (m)
DR	Desvio relativo (porcentagem)
d	Diâmetro da partícula (m)
F	Frequência de rotação do tambor (revoluções/s)
$\mathcal{F}$	Fluorescência
f	Grau de enchimento (adimensional)
g	Força da gravidade (9,81 m/s ²)
L	Comprimento do cilindro (cm ou m)
l	Comprimento do cilindro ocupado pelo traçador (m)
m	Massa (g)
N_A	Número de rotações necessárias à homogeneização axial das partículas (rotações)
N_R	Número de rotações necessárias à homogeneização radial das partículas (rotações)
R	Raio do cilindro (m)
r	Raio em qualquer distancia de R (m)
r_o	Distância do eixo de rotação (m)
S	Corda do cilindro e distância percorrida por uma partícula do leito sólido (m)
T	Temperatura de ar em diferentes posições do tambor (°C)
t	Tempo (s ou min)
t_A	Tempo necessário para alcançar a mistura axial das partículas (minutos)

Nomenclatura

UR	Umidade Relativa (porcentagem)
u_z	Velocidade axial média (cm/min)
V	Volume (mL ou cm ³)
v	Velocidade da partícula (m/s)
Z	Coordenada cartesiana
z	Posição axial (cm)

Símbolos gregos

ε	Ângulo de enchimento ou metade do ângulo do segmento circular ocupado pelas partículas sólidas no tambor rotativo (Graus ou radianos)
ρ	Densidade aparente da mistura bagaço-farelo a 75% de umidade (g/cm ³)
ω	Velocidade angular (rad/s)
	Ângulo de repouso dinâmico (Graus)

Adimensionais

Fr	Número de Froude
------	------------------



Sumário

1. CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	12
2. CAPÍTULO 2: OBJETIVOS.....	14
3. CAPÍTULO 3: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 Fermentação em Estado Sólido (FES).....	16
3.2 Biorreatores para FES.....	18
3.2.1 Movimentação de partículas em tambores rotativos.....	20
3.2.2 Transferência de calor e massa em tambores rotativos.....	28
3.3 Celulases.....	28
3.4 Fungo <i>Myceliophthora thermophila</i> I1D3b.....	31
4. CAPÍTULO 4: MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 MATERIAIS.....	33
4.1.1 Partículas.....	33
4.1.2 Microrganismo: <i>Myceliophthora thermophila</i> I1D3b.....	34
4.1.3 Equipamentos.....	35
4.1.3.1 Tambor rotativo com defletores.....	35
4.1.3.2 Tambor com agitação interna através de pás.....	36
4.1.3.3 Protótipo de biorreator em alumínio	37
4.1.3.4 Biorreator rotativo em escala de bancada	39

4.2 MÉTODO EXPERIMENTAL	41
4.2.1 Mistura e movimentação de partículas de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo em tambor rotativo.....	41
4.2.1.1 Experimentos preliminares.....	41
4.2.1.2 Calibração do <i>software Lenseye</i> para aplicação em análise de imagem.....	44
4.2.1.3 Técnica de traçadores coloridos.....	45
4.2.1.3.1 Mistura radial.....	46
4.2.1.3.2 Movimentação radial	49
4.2.1.3.3 Mistura axial	51
4.2.2 Capacidade de retenção de água pelo leito de partículas sólidas.....	53
4.2.2.1 Capacidade máxima de retenção de água	54
4.2.2.2 Experimentos preliminares.....	55
4.2.2.3 Experimentos de retenção de água	55
4.2.3 Análise térmica do sistema.....	57
4.2.4 Avaliação da tolerância à agitação mecânica do fungo <i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b.....	60
4.2.4.1 Preparação do inoculo, da solução nutriente e substrato.....	60
4.2.4.2 Fermentações em sacos de polipropileno.....	61
4.2.4.3 Extração das enzimas e determinação das atividades enzimáticas.....	62
4.2.4.4 Fermentações no protótipo de biorreator de alumínio.....	63
4.2.5 Produção de celulasas por FES em biorreator rotativo.....	65
 5. CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 68
5.1 Mistura e movimentação de partículas de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo em tambor rotativo.....	68
5.1.1 Experimentos preliminares.....	68
5.1.2 Mistura radial.....	75
5.1.3 Movimentação radial	78

Sumário

5.1.3.1 Avaliação qualitativa.....	78
5.1.3.2 Avaliação quantitativa.....	79
5.1.4 Mistura axial.....	88
5.2 Análise da capacidade de retenção de água pelo leito de partículas sólidas.....	95
5.2.1 Capacidade máxima de retenção de água	95
5.2.2 Experimentos preliminares.....	96
5.2.3 Experimentos de retenção de água	97
5.3 Análise térmica do sistema.....	100
5.4 Avaliação da tolerância à agitação mecânica do fungo <i>Myceliophthora thermophila</i> I-1D3b.....	111
5.4.1 Experimentos preliminares.....	111
5.4.2 Fermentações em biorreator de alumínio.....	112
5.5 Produção de celulasas por FES em biorreator rotativo.....	119
5.5.1 Experimentos preliminares.....	119
5.5.2 Produção de celulasas por FES em biorreator rotativo.....	121
CONCLUSÕES	124
SUGESTÕES.....	127
BIBLIOGRAFIA.....	128
APÊNDICE A: Solução analítica da equação do modelo de dispersão axial....	142
APÊNDICE B: Programa para a simulação da mistura axial de partículas em tambor rotativo.....	147



Capítulo 1

Introdução

A indústria sucroalcooleira tem se desenvolvido notavelmente nos últimos quarenta anos devido à necessidade de produzir um combustível alternativo aos combustíveis de origem fóssil (GOES; MARRA, 2008). Atualmente, a plantação de cana de açúcar no Brasil ocupa cerca de 10.000.000 hectares (ÚNICA, 2013), de cujo processamento sobram 12 toneladas de bagaço e 12 toneladas de palha por hectare (SANTOS et al., 2014). O bagaço e a palha de cana, junto com outros resíduos agroindustriais, como palha de milho, farelo de trigo, egramíneas, dentre outros, se constituem uma matéria-prima renovável, abundante e de baixo custo, com grande potencial de aplicação biotecnológica, dentre as quais o etanol de segunda geração. O emprego desses resíduos pode proporcionar algumas vantagens ambientais como a diminuição de problemas relacionados à acumulação de materiais de lenta degradação, produção de etanol sem necessidade de aumentar a área plantada e redução dos custos de produção (RABELO, 2007).

Em termos gerais, a produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica, envolve etapas de pré-tratamento, em que ocorre a deslignificação do material; o processo de hidrólise, em que ocorre a liberação dos açúcares fermentescíveis; a fermentação alcoólica e a destilação. A etapa de hidrólise pode ocorrer de duas maneiras, a hidrólise ácida, uma tecnologia já desenvolvida, mas que possui a desvantagem da geração de resíduos perigosos, e pelo processo de hidrólise enzimática, que usa vários tipos de enzimas como ligninases, celulasas e hemicelulasas, tornando o processo ambientalmente amigável (MISHIMA et al., 2006). No entanto, o alto custo das enzimas é um dos principais obstáculos dessa etapa, de modo que sua produção em grande quantidade e a baixo custo é um desafio a ser vencido.

Introdução

Uma das alternativas para a produção de celulasas a baixo custo é através da fermentação em estado sólido (FES), empregando-se os resíduos lignocelulósicos provenientes do agronegócio, em particular o bagaço de cana (PANDEY, 1992). O Grupo de Pesquisa em Bioenergia e Meio Ambiente do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto, tem se dedicado à produção de enzimas fibrolíticas por FES, envolvendo a seleção de microrganismos produtores e determinação das condições de cultivo mais favoráveis. No entanto, o grande desafio para a FES não está somente em encontrar o binômio substrato-microrganismo capaz de gerar o produto desejado em quantidades de interesse econômico, mas também em projetar e desenvolver biorreatores que viabilizem a produção em larga escala.

Um biorreator de leito fixo para produção de celulasas por FES já foi testado por Zanelato et al. (2012) obtendo boa produção, porém, esta configuração apresenta grandes inconvenientes associados à ampliação de escala: a remoção do calor gerado pelas atividades metabólicas dos microrganismos e migração de umidade no interior do leito. Uma alternativa é uso de reatores de leito móvel, tais como os de tambor rotativo. Estes são mecanicamente mais complexos e operacionalmente mais trabalhosos, porém dão flexibilidade na remoção do calor, pois o ar percola longitudinalmente o tambor, de modo que o contato entre a fase sólida e a fluida é intenso conferindo grande homogeneidade térmica a estes sistemas (DÍAZ et al., 2009; DURAND, 2003). Também, é possível fazer-se a inoculação da cultura fúngica no próprio equipamento e adicionar-se água ao sistema para repor a água perdida para o ar e para os próprios microrganismos.

Assim, este trabalho propôs-se desenvolver um biorreator de tambor rotativo para produção de celulasas por FES, com capacidade de agrupar todas as etapas do processo fermentativo. Por tanto foi necessário conhecer as características de movimentação das partículas sólidas, as propriedades de retenção de água do leito, aspectos básicos de transferência de calor e massa e da adaptação do microrganismo às tensões de cisalhamento provenientes do movimento do sistema.

Capítulo 2

Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desta tese foi desenvolver um fermentador de tambor rotativo visando a produção de enzimas celulolíticas por tecnologia de Fermentação em Estado Sólido, utilizando o fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b e empregando bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo como substratos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a mistura e movimentação de partículas de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo em tambor rotativo, em função da carga de partículas, da rotação do tambor e dos elementos internos do mesmo, de modo a determinar as condições que proporcionem a melhor mistura das partículas;
- ✓ Analisar a retenção de água pelo leito de partículas sólidas em função da carga de partículas, da vazão de água adicionada, da intermitência de adição de água e das características do sistema de aspersão, com a finalidade de determinar a condição operacional que proporcione maior homogeneidade de concentração de água nas partículas;

Objetivos

- ✓ Avaliar a tolerância à agitação mecânica do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, quando cultivado por fermentação em estado sólido em um protótipo de biorreator de tambor rotativo, tendo como variáveis controladas a carga de partículas e a intermitência de rotação do tambor ao longo da fermentação, e tendo como variável de resposta a atividade de endoglucanases;
- ✓ Analisar termicamente um tambor rotativo de escala de bancada, de modo a determinar a forma mais rápida e homogênea de controlar a temperatura no interior do leito, tendo como variáveis a carga de partículas, a temperatura inicial do meio particulado, a rotação do tambor e a temperatura de aspersão de água;
- ✓ Produzir enzimas celulolíticas em um biorreator de tambor rotativo, adotando-se as condições operacionais baseadas nos conhecimentos adquiridos nas etapas anteriores.

Capítulo 3

Revisão bibliográfica

3.1 Fermentação em estado sólido (FES)

A fermentação em estado sólido (FES) pode ser definida como um processo fermentativo realizado sobre um meio sólido que age como suporte físico e/ou como fonte de nutrientes para os microrganismos, com quantidade de água suficiente para garantir o crescimento microbiano e as atividades metabólicas das células, sem exceder a capacidade de retenção de água do substrato sólido (ASAGBRA; SANNI; OYEWOLE, 2005; DURAND et al., 1988; GRAJALES, 2010; PANDEY, 1992; PANDEY et al., 2000; RODRIGUEZ; SANROMAN, 2005; 2006; RANI et al., 2009; SINGHANIA et al., 2009). Quando o meio sólido atua como fonte de nutrientes, as reações podem ocorrer na superfície das partículas ou em seu interior, definindo diversos mecanismos de transferência de massa (LAURENTINO, 2007; RANI et al., 2009).

Os fungos crescem e desenvolvem suas atividades metabólicas favoravelmente em FES porque as condições de cultivo são similares às do seu ambiente natural, tais como resíduos orgânicos e árvores, ou seja, ambientes com baixa atividade de água (HESELTINE, 1972; LONSANE et al., 1992; NAGEL, 2002; RANI et al., 2009). Parte do interesse científico e industrial pela FES é a possibilidade da utilização destes resíduos sólidos como matriz porosa, agregando valor e minimizando problemas ambientais devido a descartes inadequados (LAURENTINO, 2007; RANI et al., 2009). Graças a isto, a partir dos anos 1990 houve grande aumento de pesquisas voltadas à FES, como pode ser observado na Figura 3.1, que apresenta resultados compilados da base de dados “ISI - Web of Knowledge” para o total de artigos publicados ao se empregar a expressão booleana *Bioreactor AND Solid State Fermentation* e a expressão *Solid State Fermentation* isoladamente. Observe-se que, enquanto houve um crescimento expressivo no total de artigos sobre FES, o número de trabalhos específicos sobre biorreatores permaneceu estável e em pequeno

número até 2006, aumentando moderadamente partir de 2007, revelando uma carência de pesquisas com este enfoque.

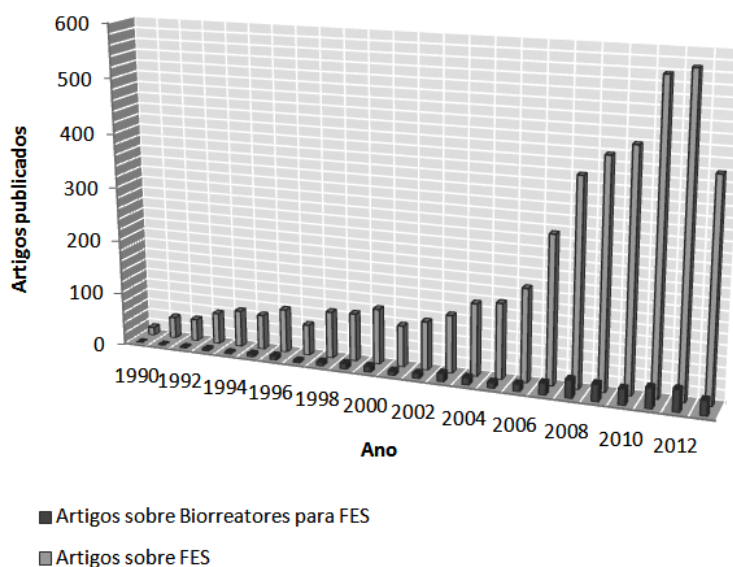


Figura 3.1. Trabalhos publicados sobre FES e indexados pela “ISI - Web of Knowledge”.

A FES é uma técnica milenar no Oriente, particularmente na Ásia, para produção de alimentos fermentados, onde o cultivo dos fungos é feito sobre substratos sólidos, como grãos de feijão, arroz e soja, entre outros. Porém, no Ocidente, a indústria de fermentação dá preferência ao cultivo por fermentação com substratos líquidos, técnica conhecida como fermentação submersa (FSb) (NAGEL, 2002; RODRIGUEZ; SANROMAN, 2005).

Para alguns produtos, a FES apresenta uma série de vantagens sobre a FSb, dentre as quais destacam-se: economia de água durante o processo fermentativo; utilização de fontes de carbono de fácil acesso e baixo custo (resíduos agrícolas); maior concentração de produto, maior rendimento; e menor possibilidade de contaminação devido à menor atividade de água (AIDOO; HENDY; WOOD, 1982; EDUARDO, 2010; FERNANDEZ et al., 1996; HESSELTINE, 1972; LONSANE et al., 1992; MOO-YOUNG; MOREIRA; TENDERDY, 1983; PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000; SATO; SUDO, 1999).

Através da FES é possível produzir-se uma ampla gama de produtos, tais como alcoóis, polissacarídeos, ácidos, enzimas, fungos e bactérias, com aplicações em indústrias de alimentos, farmacêuticas, de cosméticos, de pigmentos, de controle biológico de pragas, entre outras (RODRIGUEZ; SANROMAN, 2006).

Apesar dos aspectos positivos, a FES ainda não está consolidada como processo industrial viável em várias aplicações, devido à dificuldade de ampliação de escala dos biorreatores. Em FES a transferência de calor e massa têm alta resistência devido às características do substrato sólido. Assim, podem-se observar heterogeneidade térmica do sistema, devido à menor capacidade de transferência de calor dos materiais orgânicos e da baixa vazão da fase gasosa; segregação de umidade em virtude do desequilíbrio do potencial químico da água nas fases gasosa e sólida; e instabilidade da matriz porosa devido à sua degradação ao longo do processo fermentativo (AIDOO; HENDY; WOOD, 1982; FERNANDEZ et al., 1996; HESSELTINE, 1972; LONSANE et al., 1992). Devido à particularidade de cada sistema de FES e à escassez de informações experimentais na literatura, compromete-se a validação e aprimoramento de modelos físicos e matemáticos, assim como a possibilidade de utilização industrial de biorreatores. Portanto, faz-se necessário ampliar as pesquisas acerca do desenvolvimento de equipamentos que possam superar estas dificuldades.

3.2 Biorreatores para FES

Geralmente, os estudos dividem-se em duas etapas básicas: a escala de frascos, onde as características de cultivo do fungo e sua adaptação ao substrato e às condições operacionais são exploradas, e a escala de biorreatores, que incorpora os conhecimentos adquiridos na escala de frascos e que propõe soluções tecnológicas para a produção em larga escala (DURAND et al., 1995; PANDEY et al., 2001). As principais vantagens da escala de frascos são a simplicidade, baixo custo, baixo risco de contaminação e flexibilidade de condições operacionais (DURAND et al., 1995; DURAND; DE LA BROISE; BLACHERE, 1988; PANDEY et al., 2001). Nestes ensaios, em geral não há agitação ou aeração forçada, apenas as características do substrato e sua umidade, composição e concentração da solução nutriente e a temperatura podem ser controladas (BABITHA; SOCCOL; PANDEY, 2007).

Os biorreatores são caros e de projeto complexo, têm maior número de variáveis que devem ser controladas, são mais susceptíveis à contaminação, menos homogêneos na distribuição de umidade e de temperatura e, além disso, a quantidade e as características do produto final são mais heterogêneas (DURAND, 2003). A arquitetura interna do biorreator de FES tem que promover aeração eficiente, manter a uniformidade e integridade do substrato e facilitar as etapas do processo, tais como a

Revisão Bibliográfica

preparação do substrato, esterilização, recuperação de biomassa e do produto, e carga e descarga do equipamento (RAGHAVARAO; RANGHANATHAN; KARANTH, 2002; SINGHANIA et al., 2009).

Os reatores para FES podem ser divididos entre os de leito fixo e os de leito móvel como se ilustra nas Figuras 3.2 e 3.3, respectivamente (DURAND, 2003; GRAJALES et al., 2012; RAGHAVARAO; RANGHANATHAN; KARANTH, 2002).

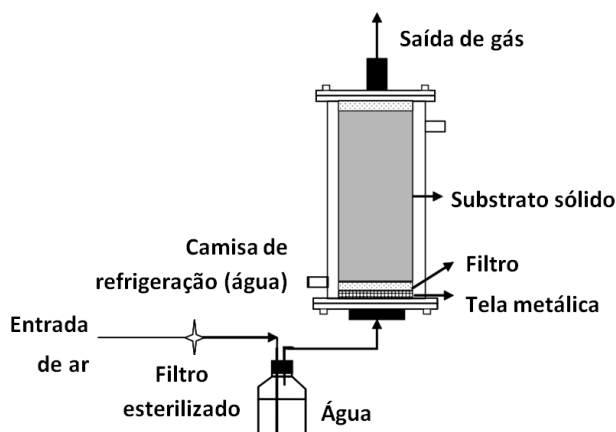


Figura 3.2. Esquema de um biorreator de leito fixo.

Fonte: RODRIGUEZ; SANROMAN, 2006.

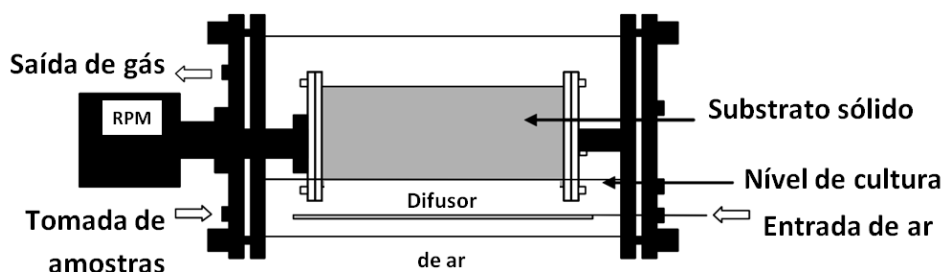


Figura 3.3. Esquema de um biorreator de leito móvel.

Fonte: RODRIGUEZ; SANROMAN, 2006.

Os reatores de leito fixo mais comuns são os tubulares, de fácil construção, operação e manutenção, e se constituem como um dos primeiros passos para a transposição dos estudos em escala de frascos para os de bancada. Em geral, consistem em tubos verticais encamisados, empacotados com os substratos já inoculados e percolados por ar. Os maiores inconvenientes desta configuração são a heterogeneidade térmica e de umidade do meio sólido e a possibilidade de ocorrência de regiões com baixa aeração, afetando a taxa, a velocidade e a seletividade das reações (ASHLEY; MITCHELL; HOWES, 1999; ZANELATO, 2011). A troca de calor

neste sistema é deficiente, devido à baixa condutividade térmica efetiva do meio poroso, de modo que a ampliação de escala desta classe de biorreatores é uma dificuldade adicional, pois o aumento do diâmetro do tubo implica no afastamento da parede do reator das porções mais centrais do leito, agravando a dificuldade de remoção do calor metabólico (ASHLEY; MITCHELL; HOWES, 1999; CHINN; NOKES, 2003; MITCHELL et al., 2002).

O tipo mais comum dentre os biorreatores de leito móvel são os de tambor rotativo, que se assemelham a secadores empregados com frequência na secagem de materiais particulados, como o açúcar, por exemplo. Neste tipo de equipamento, um tambor gira a baixa rotação para revolver o material sólido, muitas vezes com ajuda de chicanas internas ou de um eixo central provido de pás. Ar percola longitudinalmente o tambor, de modo que o contato entre a fase sólida e a fluida é intenso, conferindo grande homogeneidade térmica a estes sistemas (DÍAZ et al., 2009; DURAND, 2003). Também é possível fazer-se a inoculação da cultura fúngica no próprio equipamento e adicionar-se água ao sistema ao longo do processo para repor a água perdida para o ar e para os próprios microrganismos. Esta água aspergida sobre as partículas é um método eficiente de controle de temperatura, já que permite a remoção de calor do sistema através do calor latente de vaporização da água (NAGEL et al., 2001; SCHUTYSER et al., 2003).

3.2.1 Movimentação de partículas em tambores rotativos

a. Regimes de escoamento radial: A forma de movimentação das partículas sólidas no tambor rotativo tem um papel importante na remoção do calor metabólico gerado pelos microrganismos nos biorreatores rotativos (GRAJALES et al., 2012). Esta movimentação de partículas em tambores rotativos tem sido amplamente estudada para partículas regulares, sendo fortemente dependente do número de Froude e do grau de enchimento (BOATENG; BARR, 1996; CRISTO et al., 2006; HENEIN; BRIMACOMBE; WATKINSON, 1983; INGRAM, 2005; MELLMANN, 2001; MELLMANN; SPECHT; LIU, 2004; SANTOMASO; OLIVI; CANU, 2004). O número de Froude (Fr) é calculado como a relação entre a força centrífuga exercida sobre as partículas e a aceleração da gravidade (g),

$$Fr = \frac{\omega^2 R}{g} \quad 3.1$$

onde R é o raio do cilindro e ω é a velocidade angular.

A velocidade angular é calculada por meio da frequência ou velocidade de rotação, F ,

$$\omega = 2\pi F \quad 3.2$$

O grau de enchimento (f) é definido como a razão entre a área da seção transversal do cilindro ocupada pelas partículas e a área total da seção transversal do cilindro, como se ilustra na Figura 3.4.

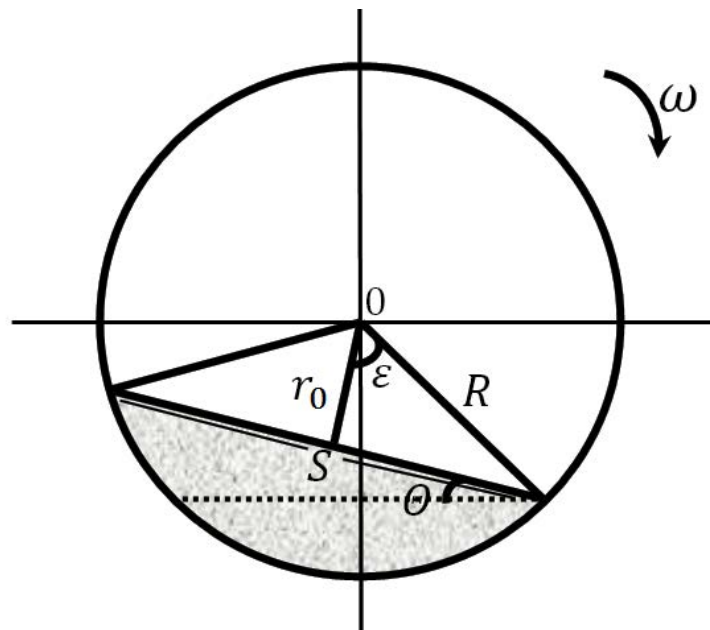


Figura 3.4. Diagrama esquemático da seção transversal do cilindro.

Desta forma,

$$f = \frac{\text{área da seção transversal do cilindro ocupada pelas partículas}}{\text{rea da se o trasnversal do cilindro}} \quad 3.3$$

$$f = \frac{\text{Segmento circular} - \text{rea do tri ngulo}}{\text{rea da se o trasnversal do cilindro}} \quad 3.4$$

$$f = \frac{1/2 R^2 (2\varepsilon) - r_0 S / 2}{\pi R^2} \quad 3.5$$

$$f = \frac{R^2(\varepsilon) - R \cos(\varepsilon) \times 2^{R \sin(\varepsilon)/2}}{\pi R^2} \quad 3.6$$

$$f = \frac{R^2(\varepsilon - \cos(\varepsilon) \times \sin(\varepsilon))}{\pi R^2} \quad 3.7$$

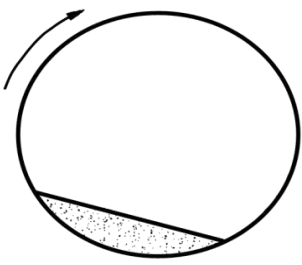
$$f = \frac{(\varepsilon - \cos(\varepsilon) \times \sin(\varepsilon))}{\pi} \quad 3.8$$

A corda do cilindro define a trajetória linear que descreve cada partícula:

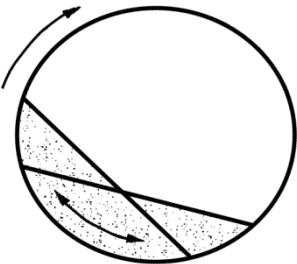
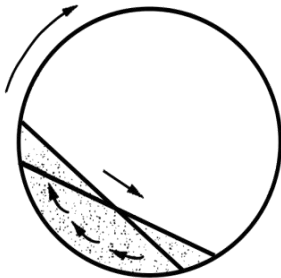
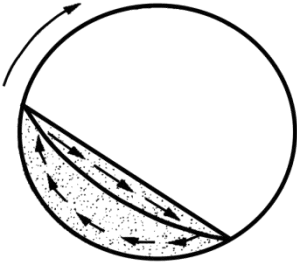
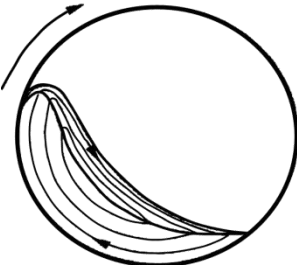
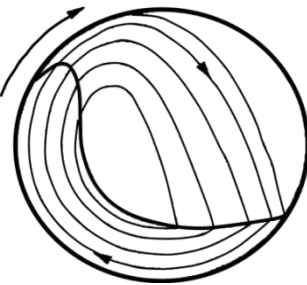
$$S = 2R \times \sin(\varepsilon) \quad 3.9$$

O movimento de alguns materiais particulados em cilindros de tambor rotativo, como esferas de vidro, grãos de areia, esferas de aço, cilindros de aço, carvão ativado, pellets de fertilizante, quartzo, grãos de café e pellets de polietileno, entre outros materiais, (ARRUDA et al., 2009; BOATENG; BARR, 1996; CRISTO et al., 2006; HENEIN; BRIMACOMBE; WATKINSON, 1983; MELLMANN, 2001; MELLMANN; SPECHT; LIU, 2004; SANTOS et al.; 2013), pode ser classificado de acordo com o Quadro 3.1

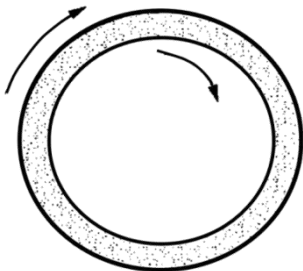
Quadro 3.1. Formas do movimento transversal de partículas sólidas em cilindros rotativos.

CARACTERÍSTICAS	ESQUEMA
Forma básica: Movimento deslizando (slipping motion) Subtipo: Deslizando (sliding) Número de Froude: $0 < Fr < 10^{-4}$ Grau de enchimento: $f < 0,1$	

Quadro 3.1. Continuação.

CARACTERÍSTICAS	ESQUEMA
Forma básica: Movimento deslizante (slipping motion) Subtipo: Oscilatório (surging) Número de Froude: $0 < Fr < 10^{-4}$ Grau de enchimento: $f > 0,1$	
Forma básica: Movimento em cascata (cascading motion) Subtipo: Queda (slumping) Número de Froude: $10^{-5} < Fr < 10^{-3}$ Grau de enchimento: $f < 0,1$	
Forma básica: Movimento em cascata (cascading motion) Subtipo: Rolante (rolling) Número de Froude: $10^{-4} < Fr < 10^{-2}$ Grau de enchimento: $f > 0,1$	
Forma básica: Movimento em cascata (cascading motion) Subtipo: Cascata (Cascading) Número de Froude: $10^{-3} < Fr < 10^{-1}$ Grau de enchimento: $f > 0,1$	
Forma básica: Movimento catarata (catarating) Subtipo: Catarata (Catarating) Número de Froude: $0,1 < Fr < 1$ Grau de enchimento: $f > 0,2$	

Quadro 3.1. Continuação.

CARACTERÍSTICAS	ESQUEMA
Forma básica: Movimento catarata (catarating) Subtipo: Centrífuga (centrifuging) Número de Froude: $Fr \geq 1$ Grau de enchimento: $f > 0,2$	

Fonte: MELLMANN, 2001.

Dentre estes regimes, a forma básica que mais interessa às aplicações industriais é o regime em cascata, pois existe atrito suficiente entre a parede e as partículas para manter a circulação contínua das mesmas no leito (HARDIN; HOWES; MITCHELL, 2001; SANTOS et al., 2013). Dentro deste regime, dependendo da velocidade de rotação e do tamanho das partículas, pode-se observar os movimentos de partículas em queda, rolante e cascata (GRAJALES et al., 2012; MELLMANN, 2001; SANTOS et al., 2013). Neste regime, as partículas se dividem em duas fases bem definidas, a fase ativa e a passiva. A fase ativa corresponde às partículas que se movem na superfície livre do leito, com os movimentos típicos mencionados, enquanto que na fase passiva encontram-se as partículas que estão em contato com a parede do tambor e as partículas adjacentes àquelas, que se movem como se fossem um corpo sólido. As partículas da fase passiva são elevadas até terem energia potencial suficiente para se moverem na fase ativa.

O movimento de partículas em queda ocorre para baixas velocidades de rotação e a camada superficial move-se periodicamente como um bloco em forma de cunha (MELLMANN, 2001; MELLMANN; SPECHT; LIU, 2004). Na medida em que aumenta a frequência de rotação, obtém-se o movimento de partículas rolante, caracterizado por uma camada de partículas com fluxo uniforme e contínuo na superfície livre, graças à agitação, as partículas na fase ativa têm boa mistura, sendo este subregime considerado ideal para aplicações industriais como fornos, reatores rotativos e tambores de mistura (INGRAM et al., 2005; MELLMANN, 2001; MELLMANN; SPECHT; LIU, 2004). Orpe e Khakhar (2001) indicaram que para baixos números de Froude o perfil de velocidade das partículas na camada superficial é simétrico para este tipo de movimento de partículas. A espessura da camada aumenta com o número de Froude e com o incremento da relação d/D_c (diâmetro de partícula/

diâmetro do cilindro). O incremento no tamanho das partículas e da frequência de rotação favorece a formação de um arco com um pequeno espaço de ar no interior, obtendo-se o movimento em cascata. (MELLMANN, 2001).

Além do número de Froude e do grau de enchimento, a forma de movimentação varia geometricamente segundo o valor do ângulo de repouso dinâmico (θ). Sua definição geométrica encontra-se esquematizada na Figura 3.4. Os materiais com superfícies lisas, alta esfericidade e baixa distribuição granulométrica possuem menores ângulos de repouso dinâmico (McCABE; SMITH; HARRIOT, 1991), fazendo com que o fluxo de partículas se comporte de acordo com a região 2 da Figura 3.5. Isto afeta a distribuição radial das partículas sólidas da seguinte forma: a zona alta toma um valor menos elevado do que a mesma zona para partículas com maior ângulo de repouso, consequentemente, a zona baixa apresenta o comportamento inverso (SANTOMASO; OLIVI; CANU, 2004).

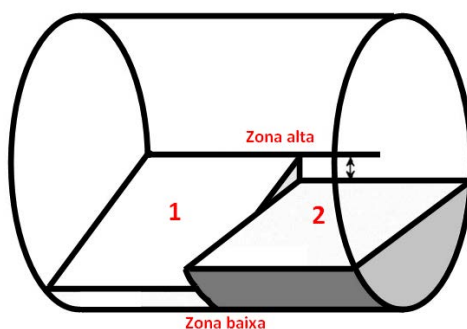


Figura 3.5. Efeito geométrico da diferença no ângulo de repouso dinâmico.

Fonte: SANTOMASO; OLIVI; CANU, 2004.

b. Movimentação axial e dispersão: Segundo estudo realizado por Rogers e Gardner (1979), para um leito de partículas sólidas em regime de movimentação rolante, o mecanismo da mistura axial nos tambores rotativos ocorre da seguinte maneira: (I) a partícula se movimenta em um raio fixo até alcançar a superfície do leito, (II) uma vez na superfície, a partícula cai livremente até entrar novamente no leito em um novo raio, (III) na superfície as partículas colidem umas com outras e devido a essas colisões o ângulo no qual a partícula desce desvia a trajetória original da partícula determinando o movimento axial. Na literatura se encontram vários modelos que descrevem este tipo de mistura de partículas, de forma geral, estes estão classificados em quatro grandes grupos (SHERRITT et al., 2003):

Transporte em etapas finitas (misturadores em série): É um método comum para representar um reator contínuo com mistura interna através de um número de reatores perfeitamente agitados conectados em série. A principal desvantagem deste método é que não consegue prever a mistura axial de equipamentos que operam em forma descontínua (KELBERT, F.; ROYERE, 1991; MARIKH et al., 2006; WES; DRINKENBURG; STEMERDING, 1976b).

Simulação de Monte Carlo: É um experimento matemático, no qual o resultado esperado de um processo estocástico é estimado através da amostragem aleatória da distribuição de probabilidade que governa os eventos que compõem o processo (CAHN; FUERSTENAU, 1967). O sucesso de aplicação do método de Monte Carlo depende diretamente da distribuição de probabilidades e do movimento da partícula escolhida. O método funciona satisfatoriamente para processos contínuos e em batelada, porém a grande limitação está em que o estudo é realizado para cada partícula individualmente (INGRAM et al., 2005).

Modelagem de elementos discretos (DEM nas siglas em inglês): É uma técnica de simulação usada para estudar os materiais particulados inelásticos, especificamente o comportamento das partículas de forma individual e contínua. Entretanto, com o avanço da tecnologia de informática, a DEM pode considerar várias partículas simultaneamente. A mistura axial pode ser calculada como função da frequência de rotação do tambor, do grau de enchimento, do diâmetro do tambor e das propriedades das partículas (BUCHHOLTZ; PÖSCHEL; TILLEMANS, 1995; CLEARY, 2013; MANICKAM et al., 2010).

Modelo de dispersão: É o método mais usado para modelar a mistura axial de partículas em tambores rotativos, funciona tanto para processos contínuos como para processos em batelada. Se o leito de partículas é tratado como um contínuo, o movimento pode ser representado pela equação da difusão (HIROSUE, 1980; MARSH et al., 2000). Em uma dimensão, esse modelo é expresso como:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - u_z \frac{\partial C}{\partial z} \quad 3.10$$

Onde C é a concentração de traçador, t é o tempo, D é o coeficiente de dispersão axial, z é a posição axial e u_z é a velocidade axial média. Uma vantagem do modelo de dispersão axial, em um caso particular, é que apenas um parâmetro é

usado para quantificar a mistura na direção axial e, além disso, o número de partículas é ilimitado.

No caso de experimentos em batelada, a velocidade axial média é zero, portanto a Equação 3.10 se simplifica da seguinte maneira:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \quad 3.11$$

Em experimentos em que a mistura das partículas é avaliada através da concentração de um traçador, sendo a posição inicial do traçador uma das extremidades do tambor, como esquematizado na Figura 3.6, a solução analítica é (HIROSUE, 1980):

$$\frac{C}{C_0} = \frac{l}{L} + \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n} \operatorname{sen}\left(\frac{n\pi l}{L}\right) \cos\left(\frac{n\pi z}{L}\right) \exp\left(-\frac{n^2\pi^2}{L^2} D t\right) \quad 3.12$$

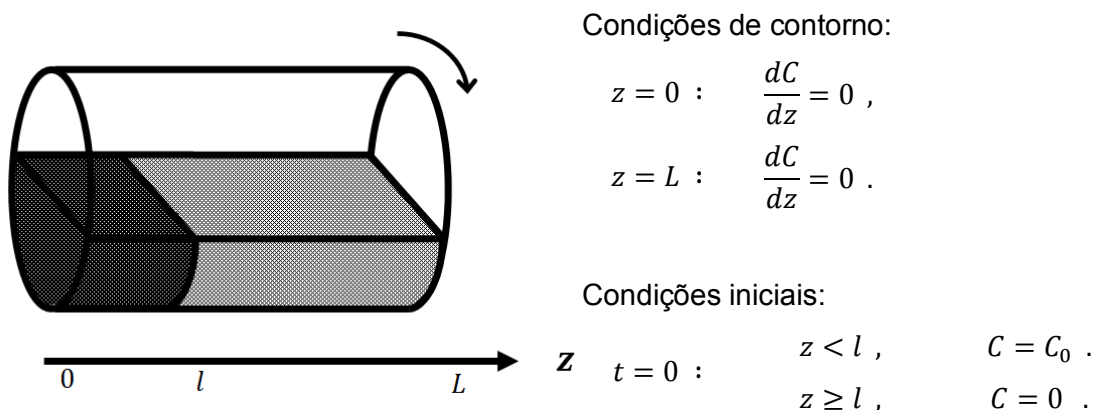


Figura 3.6. Esquema das condições iniciais e de contorno para o traçador localizado na porção inicial do comprimento total do cilindro.

O desenvolvimento matemático da Equação 3.12 encontra-se no Apêndice A.

c. Segregação de partículas: No caso de misturas de partículas com formas e tamanhos distintos, a movimentação em tambores rotativos se dá por três mecanismos: convecção das partículas, difusão das partículas e segregação por tamanho. Os dois primeiros favorecem a mistura e movimentação das partículas, enquanto que a segregação é contrária à mistura (BOATENG; BARR, 1996; PUYVELDE, 2006).

A convecção se refere ao fluxo das partículas na escala macro, ou seja, ao movimento na periferia do tambor (CISAR; OTTINO; LUEPTOW, 2007). A difusão consiste na penetração das partículas de forma individual no leito de partículas (McCARTHY KHAKHAR; OTTINO, 2000). A segregação por tamanho se refere ao fenômeno de separação ou estratificação, no qual as partículas menores percolam gradualmente através dos interstícios das partículas maiores, (HONG; QUINN; LUDING, 2001) até encontrar a parede do tambor (JIANG et al., 2011). O efeito combinado destes três mecanismos de movimentação faz com que as misturas binárias alcancem um estado relativamente estável da mistura e/ou movimentação de partículas (JIANG et al., 2011).

3.2.2 Transferência de calor e massa em tambores rotativos

Uma das principais dificuldades dos processos FES em larga escala é a remoção do calor metabólico gerado pelos microrganismos. Schutyser et al. (2002) afirmaram que o resfriamento por evaporação é a única forma efetiva de controlar a temperatura neste tipo de sistemas, porém, de acordo com Nagel et al. (2001) a evaporação para o ar e a incorporação de água no citoplasma dos microrganismos pode causar ressecamento do substrato, o que terá efeitos adversos no crescimento microbiano. Só a adição de água e a mistura do meio de cultivo podem prevenir os efeitos adversos da evaporação (RANI et al., 2009; SCHUTYSER et al., 2002), de forma que a mistura das partículas também contribui para o aumento da taxa de transferência de calor (MELLMANN, 2001; SANTOMASO; OLIVI; CANU, 2004). Consequentemente, é possível reduzir os gradientes de temperatura e umidade pela mistura intermitente das partículas nos tambores rotativos (MARSH et al., 2000). No entanto, é necessário levar em consideração a tolerância do fungo à agitação, de forma a não inibir as atividades metabólicas das células.

3.3 Celulases

De forma geral, as celulases podem ser classificadas em três tipos de enzimas: as endoglucanases (EG, endo-1,4-D-glicanohidrolase ou EC 3.2.1.4), que atacam ao acaso a parte amorfa da estrutura celulolíticas do material; as exoglucanases ou

celobiohidrolases (CBH, 1,4- β -D-glucana celobiodehidrolases ou EC 3.2.1.91), que degradam a molécula resultante da ação da endoglucanase pela remoção de unidades de celobiose; e as β -glicosidases (EC 3.2.1.21), que hidrolisam a celobiose liberando glicose (BHAT, 2000; GÓMEZ, 1985; RIEDEL; RITTER; BRONNENMEIER, et al., 1997). Desta forma, a atividade enzimática é consequência da ação dos três tipos de enzima, como pode ser visto na Figura 3.7.

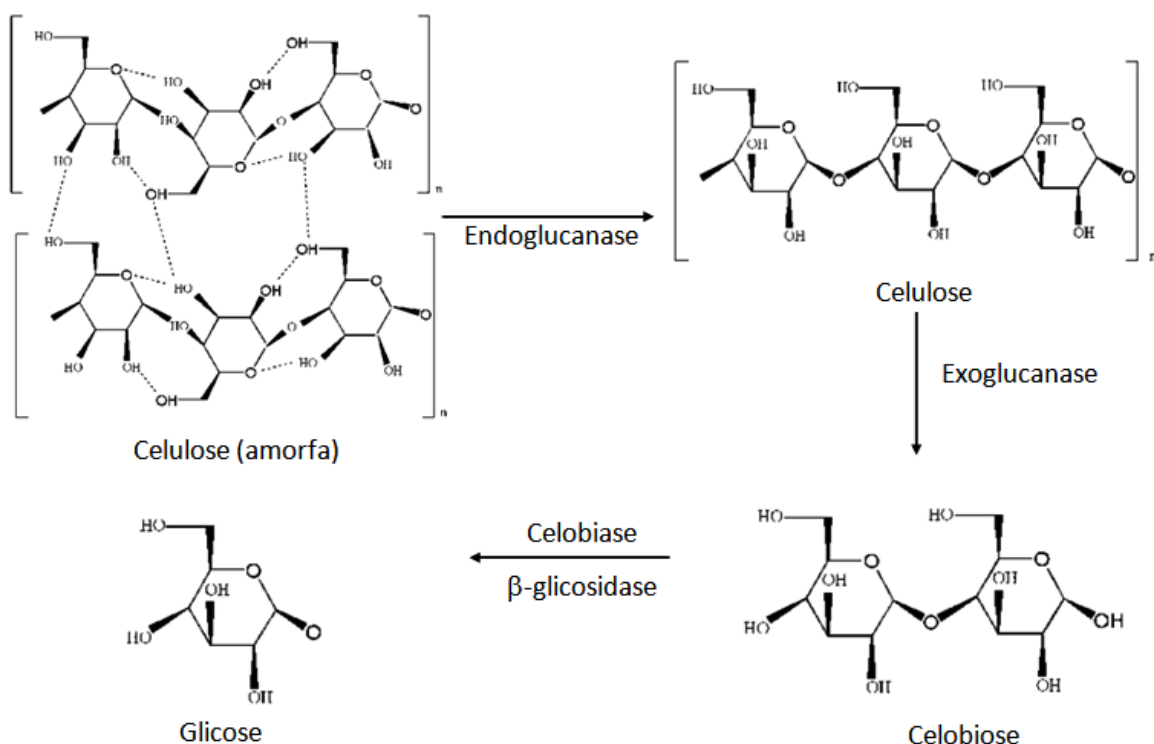


Figura 3.7. Mecânismo de ação dos diferentes tipos de celulasas.

Fonte: NG; CHEUNG, 2011.

As pesquisas acerca das celulasas datam dos anos 1950, devido ao seu enorme potencial para transformar lignocelulose em glicose e açúcares redutores (COUGHLAN, 1985a, 1985b; MANDELS, 1985; REESE, 1976; REESE; MANDELS, 1984). Atualmente, esta classe de enzimas é comumente usada em muitas aplicações industriais e a demanda por enzimas mais estáveis, altamente ativas e específicas está crescendo rapidamente (GOLDBECK et al., 2013; LI et al., 2013). Em conjunto com as hemicelulasas e as pectinases, as celulasas são empregadas para a clarificação e para a intensificação de aromas de sucos de frutas (GALANTE; DE CONTI; MONTEVERDI, 1998b; GRASSIN; FAUQUEMBERGUE, 1996), (HUMPF; SCHRIER, 1991), extração do azeite de oliva (FANTOZZI; PETRUCCIOLI; MONTEDORO, 1977), redução da viscosidade do mosto na fermentação de cerveja (GALANTE; DE CONTI; MONTEVERDI, 1998b), remoção do excesso de tinta na

Revisão Bibliográfica

fabricação de jeans (GALANTE; DE CONTI; MONTEVERDI, 1998a), intensificação do brilho e da cor nas roupas e remoção de sujidades nas mesmas (UHLIG, 1998), melhoramento das propriedades e descoloração das fibras na indústria de papel (BUCHERT et al., 1998), dentre vários outros usos.

A maioria dos estudos realizados para a produção de celulases tem sido desenvolvida empregando-se fungos mesofílicos, com altos níveis de produção, porém em processos mais propensos a contaminação por microrganismos oportunistas (GOLAN, 2011). O cultivo de fungos termófilos, além de minimizar a possibilidade de contaminação, geralmente, resulta em enzimas com maior termoestabilidade intrínseca que sua equivalente mesofílica, além de outras propriedades importantes (FITTER; HEBERLE, 2000; GOMES et al., 2007b; PATHANIA; SHARMA; VERMA, 2012; ZANPHORLIN et al., 2010). A habilidade que as enzimas termoestáveis têm de atuarem sob altas temperaturas permite que os bioprocessos ocorram em temperaturas mais elevadas, conferindo menor viscosidade ao meio reacional, manipulação de produtos em maiores concentrações e diminuição do risco de contaminação por microrganismos oportunistas (FITTER; HEBERLE, 2000; PATHANIA; SHARMA; VERMA, 2012). As termoenzimas são geralmente mais resistentes a agentes detergentes e a enzimas proteolíticas, e são estáveis em amplas faixas de pH, podendo ser usadas em diferentes tipos de materiais e processos (GOMES et al., 2007a; PATHANIA; SHARMA; VERMA, 2012). Estas enzimas também apresentam maior estabilidade para as condições de desnaturação de proteínas quando comparadas com as enzimas de mesófilos semelhantes (ZANPHORLIN et al., 2010).

O Grupo de Pesquisa em Bioenergia e Meio Ambiente do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto, tem se dedicado à produção de enzimas fibrolíticas por FES, sendo que celulases foram produzidas com sucesso a partir do fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* (MORETI, 2013; ZANELATO, 2011). Na Tabela 3.1 são apresentados alguns trabalhos encontrados na literatura onde celulases foram produzidas a partir de diferentes fungos, ressaltando-se que as maiores atividades enzimáticas foram obtidas para *Myceliophthora thermophila* I1D3b.

Tabela 3.1. Atividade de CMCase obtida por diversos tipos de *Myceliophthora*.

Microrganismo	Substrato	Atividade de CMCase (U/g)	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Referência bibliográfica
<i>Myceliophthora</i> sp (V2A2)	Palha de arroz	31,3	7,0	45	Soni et al. (2008)
<i>Myceliophthora fergusii</i> (T41)	Palha de arroz	36,7	7,0	45	Soni et al. (2008)
<i>Myceliophthora</i> sp (MYC)	Palha de arroz	35	7,0	45	Soni et al. (2008)
<i>Myceliophthora</i> sp. (IMI 389099)	Bagaço de cana	6,62	6,0	45	Badhan et al. (2007)
<i>Myceliophthora</i> sp. (IMI 389099)	Farelo de trigo	26,6	6,0	45	Badhan et al. (2007)
<i>Myceliophthora thermophila</i> I1D3b	Bagaço de cana e Farelo de trigo	800	5,0	45	Zanelato et al. (2012)

Fonte: Extraído e adaptado de ZANELATO, 2011.

3.4 Fungo *Myceliophthora thermophila* I1D3b

O fungo *Myceliophthora thermophila* é classificado como ascomiceto (BEESON et al., 2010; BERKA et al., 2011; SALAR; ANEJA, 2007), é frequentemente isolado do solo (BRINK et al., 2013), provoca altas taxas de degradação de celulose e apresenta temperaturas ótimas de crescimento entre 45 e 50°C (BERKA et al., 2011; BRINK et al., 2012).

A cepa *Myceliophthora thermophila* I-1D3b foi isolada pela pesquisadora Daniela Alonso Bocchini Martins, do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara, em pilhas de bagaço de cana de açúcar na Usina Guaraní em Olímpia, SP. Este fungo possui um aspecto de colônia branca e aveludado, como apresentado nas Figuras 3.8a e 3.8b. Foi testado com sucesso por Zanelato et al. (2012) para produção de endoglucanases e xilanases por tecnologia FES, empregando como substratos bagaço de cana e farelo de trigo em um reator de

Revisão Bibliográfica

leito fixo. Como resultado, altas atividades enzimáticas foram obtidas embora os efeitos de migração de umidade e heterogeneidade na distribuição espacial das atividades enzimáticas tenham sido observados. Não foram encontrados registros da tolerância à agitação mecânica deste fungo.

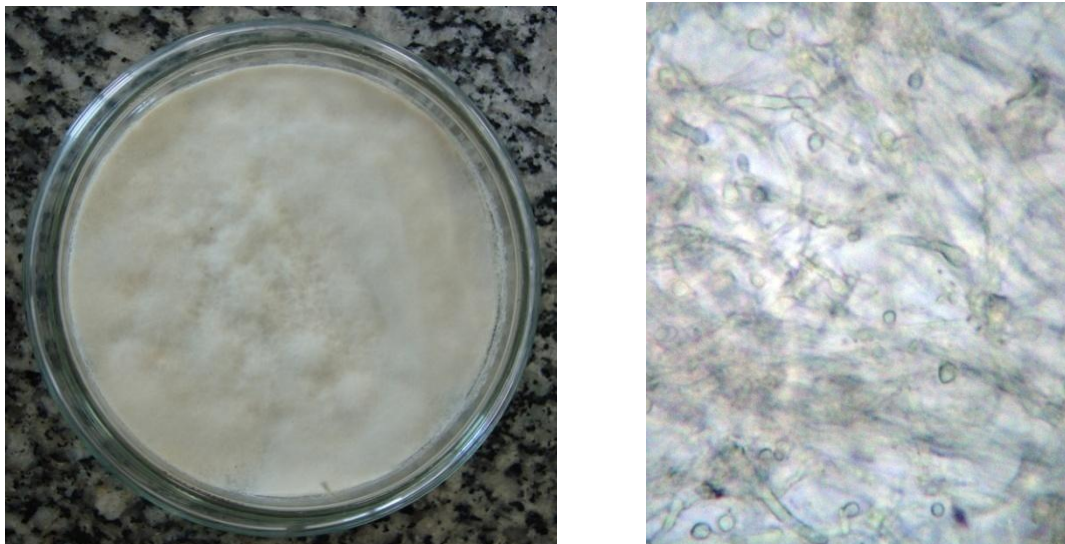


Figura 3.8. Fotografias do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b. (a) Aspecto da superfície em placa de petri e (b) ampliação obtida por microscopia ótica com aumento de 10x).



Capítulo 4

Materiais e Métodos

Os experimentos de movimentação de partículas no tambor rotativo com defletores, capacidade de retenção de água do leite, avaliação térmica do sistema, tolerância à agitação mecânica do fungo e produção de celulases por FES foram realizados nos laboratórios do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do IBILCE/UNESP, em São José do Rio Preto. Os experimentos de movimentação de partículas no tambor dotado de pás internas giratórias foram realizados no laboratório de Engenharia Bioquímica da Escola Politécnica de Engenharia Química, da USP em São Paulo.

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Partículas

Neste trabalho foram utilizadas partículas de bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo. O bagaço de cana foi fornecido pela Usina Colombo, de Ariranha/SP e o farelo de trigo foi adquirido no comércio local.

A proporção da mistura bagaço e farelo, usada em todos os experimentos desta tese foi definida em 70% de bagaço de cana e 30% de farelo de trigo (em massa), levando-se em consideração os resultados obtidos por Zanelato et al. (2012), nos quais foi alcançada a maior atividade enzimática de celulases, produzidas por FES em um reator de leito fixo, empregando-se esta proporção.

Materiais e métodos

Na Tabela 4.1 é apresentada a composição média do bagaço de cana e na Tabela 4.2 a composição do farelo de trigo.

Tabela 4.1. Composição média do bagaço de cana.

Composição elementar média (%)		Composição média da fibra do bagaço (%)	
Carbono	39,7 – 49	Celulose	26,6 – 54,3
Oxigênio	40 – 46	Hemicelulose	14,3 – 24,4
Hidrogênio	5,5 – 7,4	Lignina	22,7 – 29,7
N ₂ e cinzas	0 – 0,3		

Fonte: SILVA; GOMES; ALSINA , 2007.

Tabela 4.2. Composição média do farelo de trigo.

Composição média (%)	
Proteína	15,2 ± 0,1
Lipídeos	3,3 ± 0,1
Minerais (cinzas)	7,0 ± 0,2
Fibra dietária	62,3 ± 4,2
Amido	6,2 ± 0,2

Fonte: HEMERY et al., 2009.

4.1.2 Microrganismo: *Myceliophthora thermophila* I1D3b

O fungo termofílico utilizado foi o *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, mesmo fungo empregado por Zanelato et al. (2012). Este foi conservado em tubos criogênicos que continham o meio de Batata Dextrose Agar (BDA) inclinado, com adição de glicerina a 15% e armazenado em criostato à temperatura de -80°C.

Para o uso habitual do fungo, este foi mantido em tubos de ensaio com meio BDA inclinado à temperatura de 5°C, preservando-o com repiques periódicos.

4.1.3 EQUIPAMENTOS

4.1.3.1 Tambor rotativo com defletores

Um cilindro rotativo construído em acrílico, de 30cm de diâmetro interno por 60cm de comprimento, totalizando aproximadamente 42,4L de volume, foi empregado na avaliação da homogeneidade e movimentação de partículas, tanto radial quanto axial, e na capacidade de retenção de água pelo leito de partículas sólidas.

Este equipamento contou com quatro defletores longitudinais retos e um tubo interno de acrílico de 2cm de diâmetro externo e 60cm de comprimento, posicionado na parte inferior do tambor como indicado na Figura 4.1. Este tubo interior teve por finalidade simular, no tambor de acrílico, a alimentação de ar e vapor no biorreator rotativo construído em aço inoxidável, conforme descrição adiante. Além disso, o sistema contou com um tubo dotado de aspersores agrícolas de cone cheio posicionado na porção superior da seção transversal do cilindro, como esquematizado na mesma figura. Este tubo teve como objetivo aspergir água sobre o leito de partículas.

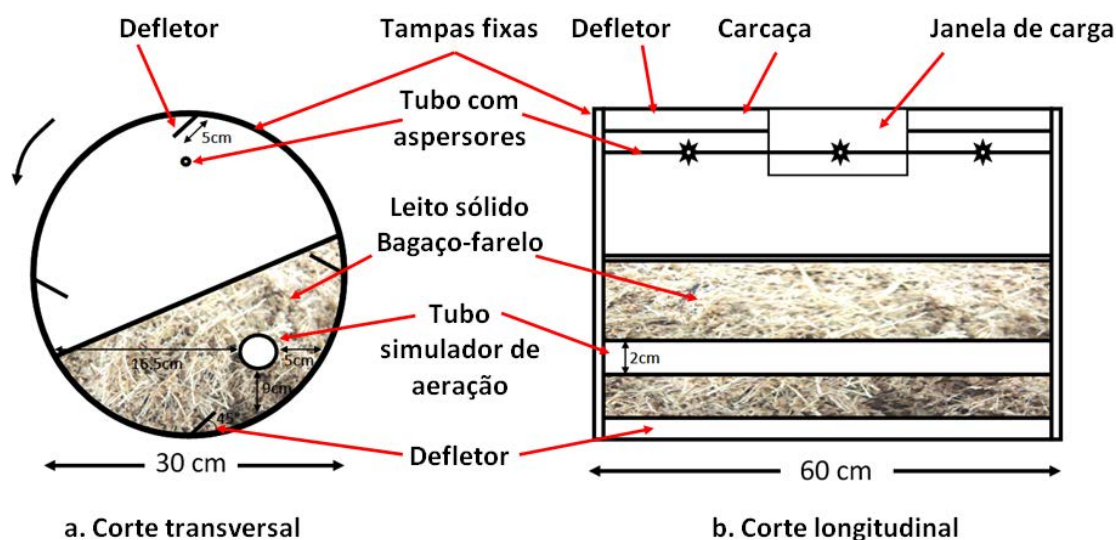


Figura 4.1. Diagrama esquemático do tambor rotativo com defletores construído em acrílico.

O tambor foi mantido sobre uma estrutura metálica, a qual contou com dois roletes de metal, como mostra a Figura 4.2. O movimento rotacional foi dado por um sistema de

Materiais e métodos

correntes e engrenagens conectadas a um motor elétrico acionado por um variador de frequências, de modo que a rotação foi uma variável controlada.

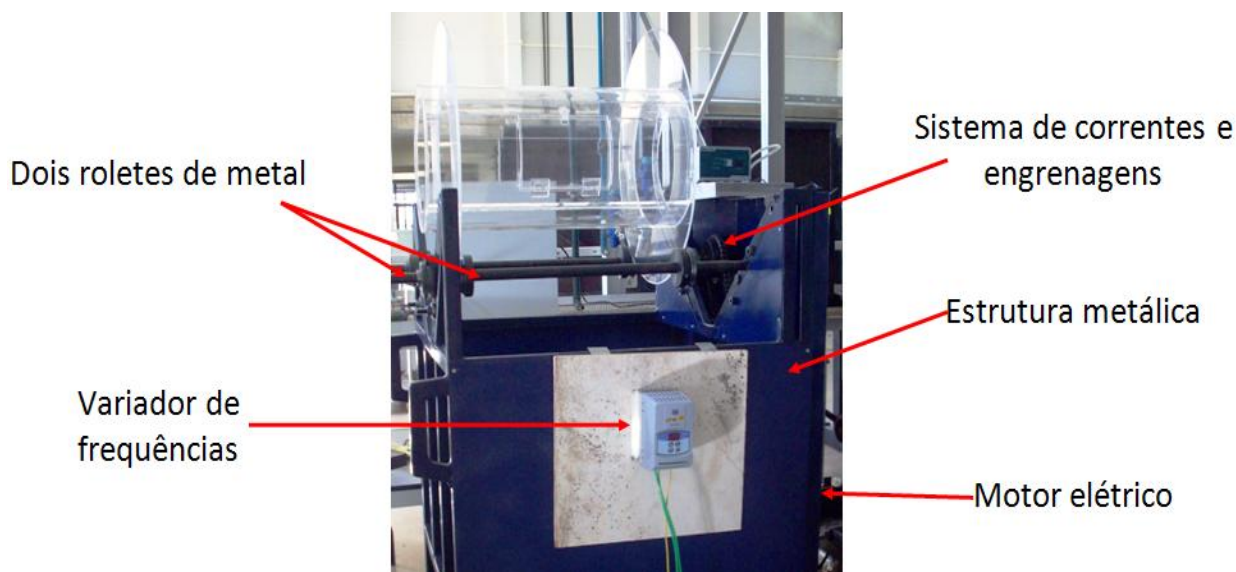


Figura 4.2. Fotografia do sistema do tambor rotativo com defletores construído em acrílico.

4.1.3.2 Tambor com agitação interna através de pás

Um tambor cilíndrico, construído em aço-inox, de 32,5cm de diâmetro interno e 50cm de comprimento, totalizando aproximadamente 40L de volume, dotado de pás giratórias internas, foi empregado na avaliação da homogeneidade e movimentação de partículas de bagaço-farelo, tanto radial quanto axial. A finalidade deste ensaio foi a de comparar as características de mistura das partículas com aquelas obtidas no tambor rotativo de acrílico com defletores, descrito no item anterior.

O sistema de agitação foi composto por um eixo central com oito pás posicionadas em ângulo reto em relação ao eixo e a frequência de rotação foi regulada através de um variador de frequência. A Figura 4.3 apresenta o diagrama esquemático deste equipamento e na Figura 4.4 é apresentada uma fotografia do mesmo.

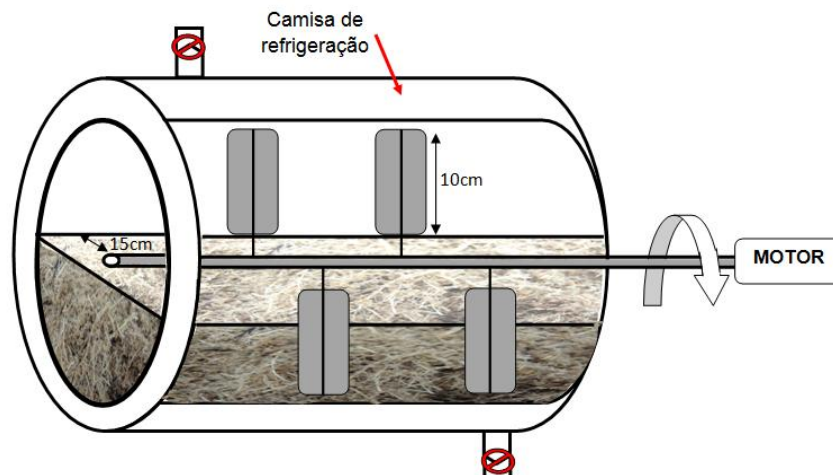


Figura 4.3. Diagrama esquemático tambor com agitação interna.

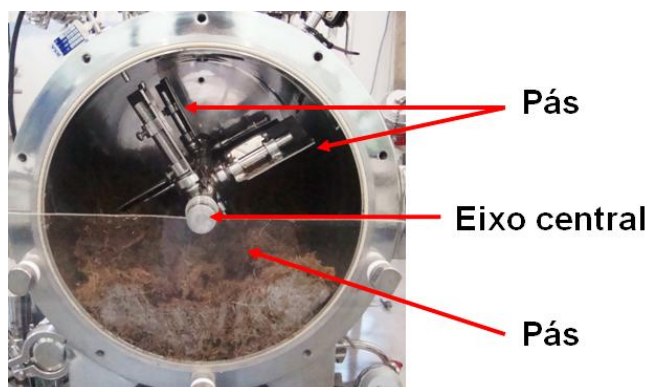


Figura 4.4. Fotografia interna do tambor com agitação interna.

Este equipamento pertence ao grupo do Laboratório de Bioquímica da EPUSP e foi empregado por Eduardo (2010) para o cultivo de *Monascus sp.* para a produção de pigmentos por fermentação em estado sólido, tendo arroz como substrato.

4.1.3.3 Protótipo de biorreator em alumínio

Um biorreator construído em alumínio, de 10cm de diâmetro interno por 20cm de comprimento, totalizando aproximadamente 1,6L de volume, foi usado para a avaliação da tolerância à agitação mecânica do fungo *Myceliphthora thermophila* I1D3b.

O biorreator possui um sistema de alimentação de ar através de um tubo de 0,5cm de diâmetro externo e 19cm de comprimento com perfurações a cada 1cm, como

Materiais e métodos

apresentado no esquema da Figura 4.5. A temperatura foi controlada por uma camisa de refrigeração, na qual a água de circulação provinha de um banho termostático.

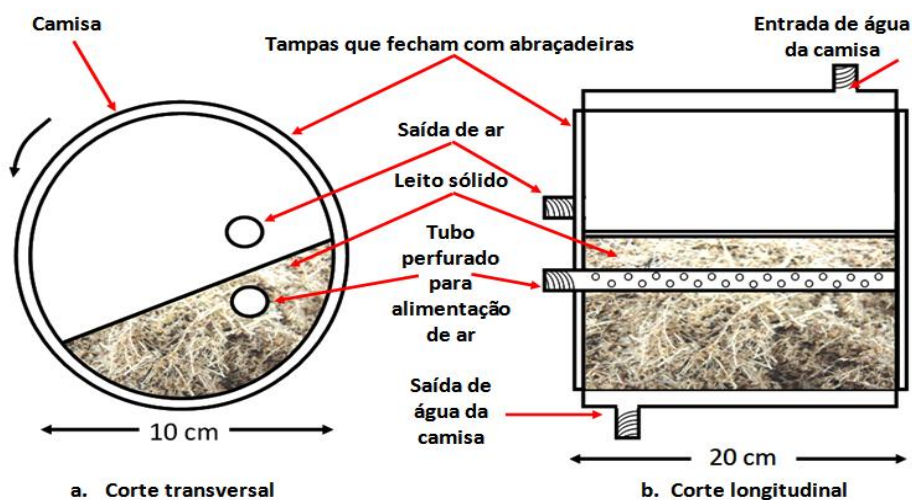


Figura 4.5. Esquema do biorreator rotativo construído em alumínio.

O equipamento permaneceu suportado em uma estrutura metálica, a qual contou com dois roletes que foram movimentados através de um motor elétrico. Este, por sua vez, estava conectando a uma fonte de corrente contínua responsável pela variação na frequência de rotação do tambor, como mostrado na fotografia da Figura 4.6.

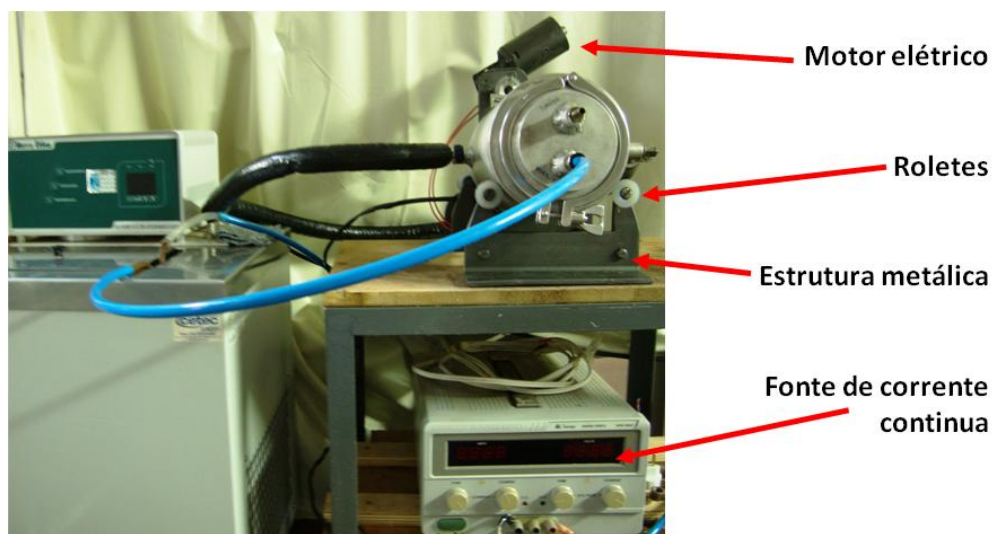


Figura 4.6. Fotografia do sistema do protótipo de biorreator rotativo construído em alumínio.

4.1.3.4 Biorreator rotativo em escala de bancada

Um biorreator construído em aço-inox, de 30cm de diâmetro interno por 60cm de comprimento, totalizando 42,4L de volume, esquematizado na Figura 4.7, foi usado para a análise térmica do sistema e para a produção de enzimas celulolíticas por FES. Este contou com um tubo interno perfurado, de 2cm de diâmetro externo, que foi empregado para suprimento de ar (6). Esta forma de alimentação, faz com que o escoamento do ar através do leito de partículas seja preferencialmente radial, percorrendo uma curta distância entre o tubo e a parede do tambor ou a superfície do leito. Este tubo também foi usado para inserção de vapor dentro do biorreator para esterilização do sistema. Uma tubulação auxiliar (3), dotada de aspersores agrícolas (4), foi posicionada na porção superior da seção transversal do tambor, a qual foi empregada para atomizar a solução nutriente, a suspensão de esporos ao meio de cultivo, água de resfriamento e água para a extração das enzimas. O equipamento foi encamisado (8) e as temperaturas de entrada (1) e de saída (2) de água da camisa foram monitoradas através de termopares tipo T. (1) e de saída (2) de água da camisa foram monitoradas através de termopares tipo T.

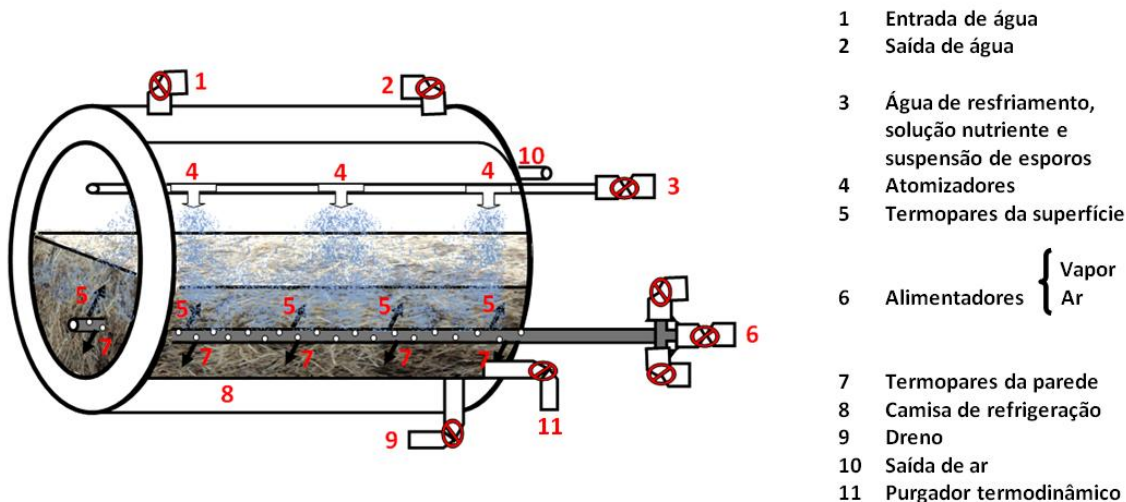


Figura 4.7. Diagrama esquemático do biorreator rotativo construído em aço-inox.

O tambor estava provido de um dreno inferior (9) para retirada do excesso de umidade do sistema, um purgador termodinâmico (11) para eliminar água condensada durante o processo de esterilização e um tubo para saída dos gases de fermentação (10). Também contou com quatro defletores longitudinais retos, que ajudaram na mistura das

Materiais e métodos

partículas. Finalmente, as medidas de temperatura no interior do tambor foram obtidas com termopares tipo T, cujas extremidades foram posicionadas próximo da superfície das partículas (5), ou seja, na interfase com o ar, e no fundo das mesmas (7), isto é, próximo da parede do tambor. Os termopares foram inseridos no sistema na tubulação de suprimento de vapor e ar (6).

O biorreator estava suportado em uma estrutura metálica e o movimento rotacional foi dado por um sistema de correntes e engrenagens conectadas a um motor elétrico acionado por um variador de frequências, de modo que a rotação foi uma variável controlada. Na Figura 4.8 é apresentada uma fotografia externa do tambor de aço inoxidável e do sistema de suporte.



Figura 4.8. Fotografia externa do tambor rotativo e o seu sistema de suporte.

Na Figura 4.9 é apresentado o diagrama esquemático para todo o sistema empregado nos ensaios térmicos e fermentativos, incluindo o biorreator e os periféricos. Os itens de 1 a 7 são responsáveis pelo controle e monitoramento das condições do ar fornecido ao reator, mantendo temperatura, vazão e umidade estáveis e isento de impurezas que pudessem contaminar o meio. O ar, fornecido por um compressor (1) e com vazão regulada por uma válvula de agulha (2), foi filtrado para remoção das sujidades mais grosseiras e óleo (3). O ar foi umidificado pela percolação do gás em uma coluna empacotada com esferas de vidro de 3mm de diâmetro (4) imersa em um banho termostático (5). Antes da entrada do fermentador, a vazão do ar foi monitorada com um rotâmetro (6), seguido da passagem por uma resistência elétrica (7). A temperatura da camisa de refrigeração foi controlada e mantida constante por meio de um banho termostático.

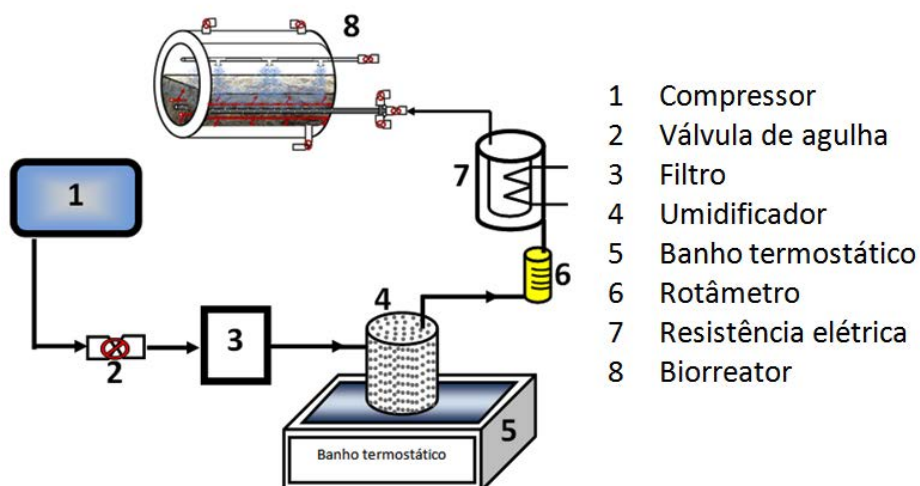


Figura 4.9. Diagrama esquemático do conjunto para os experimentos térmicos e produção de celulasas por FES.

4.2 MÉTODO EXPERIMENTAL

4.2.1 Mistura e movimentação de partículas de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo

4.2.1.1 Experimentos preliminares

Movimentação em tambor rotativo com defletores, com dois tubos internos:

Originalmente, o biorreator disponível no Laboratório de Engenharia de Processos e Biorreatores do IBILCE/UNESP foi projetado para operar com arroz como material sólido e o projeto do equipamento contemplava a aeração do meio através de dois tubos internos perfurados, como mostra a fotografia da Figura 4.10.

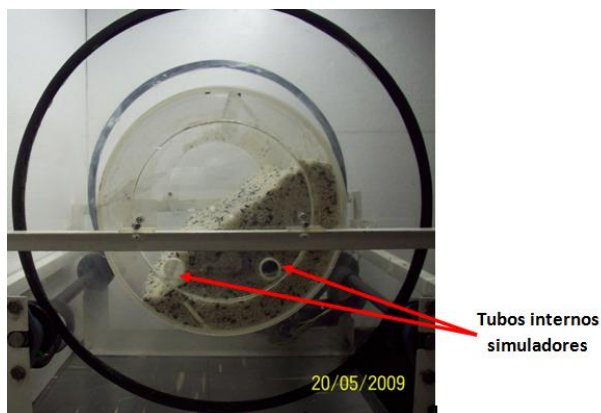


Figura 4.10. Tambor rotativo com dois tubos internos.

Com partículas de arroz a movimentação foi satisfatória e, deste modo, decidiu-se iniciar os ensaios com a mistura bagaço-farelo mantendo-se a configuração original. Preliminarmente, foram testadas duas cargas de material diferentes (3 e 6Kg) com a mistura bagaço-farelo úmida (75%) e seca (15%) a diferentes frequências de rotação (1, 4 e 7rpm), com a finalidade de detectar possíveis pontos de estagnação e/ou zonas de baixa movimentação. Os resultados mostraram sérias deficiências desta configuração e decidiu-se prosseguir os ensaios com apenas um tubo interno.

Técnica de traçadores para avaliação da mistura das partículas: Inicialmente, para avaliar a mistura das partículas de bagaço de cana-farelo de trigo, foi testada a técnica analítica de traçadores utilizada por Marsh et al. (2000), que empregaram uma fração do total de partículas de farelo de trigo embebidas com solução de Rodamina WT. As partículas com e sem traçador foram dispostas no equipamento de forma radial e misturadas ao se girar o tambor. Posteriormente, estes autores coletaram amostras e a Rodamina WT presente nas amostras foi extraída e quantificada em espectrofotômetro de fluorescência para determinação da sua concentração. No presente trabalho foi empregada Rodamina B em lugar de Rodamina WT, devido à disponibilidade do produto. Foi realizada, então, uma curva de calibração com diferentes concentrações de Rodamina B em água destilada em função da fluorescência. Tal curva foi construída empregando-se os mesmos comprimentos de onda utilizados por MARSH et al. (2000), quais sejam 557nm e 581nm, para a excitação e a emissão, respectivamente. As leituras de fluorescência foram realizadas em um espectrofotômetro de fluorescência Shimadzu RF-5301 PC.

Materiais e métodos

Uma vez construída a curva de calibração, a mistura bagaço-farelo foi impregnada com uma solução de Rodamina B a 0,01%, sendo posteriormente seca ao ambiente durante duas horas, seguindo-se da adição de água para realizar a extração. O processo de extração foi realizado coletando-se uma amostra de 1g de mistura bagaço-farelo impregnado e adicionando-se 50mL de água destilada para homogeneizar a amostra, completando-se a seguir para 100mL e com agitação por uma hora a 150rpm. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro de 3µm de porosidade, centrifugado por 10min a 10000rpm e novamente filtrado (MARSH et al., 2000). Este processo de extração foi realizado cinco vezes.

Com o objetivo de aumentar a eficiência da extração foi realizado um novo processo de extração, com álcool na concentração volumétrica de 70%. Desta forma, realizou-se uma nova curva de calibração com amostras preparadas com álcool.

Entretanto, um inconveniente do uso da técnica de extração com água ou álcool é que é necessário 1g de amostra a cada vez, e dado que no tambor de acrílico seriam coletadas amostras em 5 posições diferentes, significariam 5g por cada amostragem. Esses 5g ao serem retirados do meio, modificariam a estrutura do leito de partículas. Outro inconveniente é o tempo prolongado para a obtenção dos resultados, em torno de 2 horas de análise por amostra.

No intuito de diminuir o tempo de análise e evitar a desestruturação do leito, foi aplicada a técnica de análise de imagens para a determinação da concentração dos traçadores, empregando-se a metodologia desenvolvida por Grajales et al. (2012). Estes autores determinaram a concentração de traçador em misturas coloridas de arroz cozido, fazendo uso do *software Lenseye (Engineering & Cyber Solutions, Gainesville, FL)*, onde a área de coloração reconhecida pelo programa correspondia diretamente à concentração de arroz tingido nas amostras.

Inicialmente, decidiu-se tingir a mistura bagaço-farelo com solução de azul de metileno a 2%, devido baixo custo, fácil disponibilidade e atoxidade. Uma curva de calibração foi construída, onde amostras de mistura de bagaço-farelo de 15g a 75% de umidade foram preparadas em placas de petri a diferentes concentrações (peso) de traçador: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%. Posteriormente, essas amostras, sob condições de iluminação controladas, foram fotografadas, digitalizadas e submetidas à análise no *software Lenseye*.

Após a obtenção da curva de calibração, foram realizados três experimentos de movimentação axial da mistura farelo-bagaço no tambor rotativo construído em acrílico.

Materiais e métodos

Ao longo dos experimentos, observou-se visualmente, através da parede do tambor, que houve difusão do corante através da água presente no material sólido aderido à parede do tambor, evidenciando-se a sobreposição dos fenômenos da difusão molecular do corante ao da movimentação axial macroscópica do sólido. Assim, decidiu-se interromper esta análise e empregar-se Rodamina B como corante, desta vez na concentração de 0,02%. Para tanto, foi avaliada a aderência do corante na mistura bagaço-farelo nas seguintes condições: lavada, sem lavar, peneirada, sem peneirar, seca e úmida.

Algumas amostras foram lavadas com água em abundância para a remoção de resíduos de açúcar e contaminantes, sendo posteriormente secos em estufa de convecção forçada até peso constante e armazenadas em sacos plásticos de polietileno de alta densidade em câmara de refrigeração a 5°C até o seu uso. Nesses experimentos foi observado que o efeito da lavagem das amostras não era conveniente à fixação do corante. Assim, decidiu-se adotar duas estratégias de preparo do material sólido antes da adição do corante: mistura bagaço-farelo sem peneirar e sem lavar, ou seja, nas condições nas quais foram obtidos do fornecedor (50%±4% de umidade) e mistura peneirada e sem lavar, ou seja, houve peneiramento do bagaço e do farelo em tamiz de 3mm.

A alternativa que apresentou melhor fixação do corante foi a mistura sem lavar e sem peneirar, pois dois experimentos de mistura axial de partículas foram realizados e não mostraram difusão visível de Rodamina B para tempos de mistura superiores às 5 horas. Portanto, esta técnica foi adotada para a determinação da concentração de traçador por análise de imagem, como descrito nas seções 4.2.1.2 e 4.2.1.3 deste trabalho.

4.2.1.2 Calibração do software Lenseye para aplicação em análise de imagem

A umidade da mistura bagaço-farelo foi determinada em um analisador de lâmpada de halogênio Ohaus MB45, sendo posteriormente adicionada água para completar 75% de umidade. A mistura de traçador bagaço-farelo foi preparada da mesma forma que a mistura ao natural, porém no lugar de adicionar água foi adicionada solução de Rodamina B com concentração 0,02% (m/v) até completar 75% de umidade. Ambas as misturas, não impregnada e impregnada com Rodamina B, foram distribuídas sobre peneiras, em camadas finas, e deixadas ao ambiente durante 2 horas para complementar o processo de absorção de líquido e fixar o corante.

Materiais e métodos

Para a calibração do *software* de análise de imagens *LensEye*, amostras de 15g de mistura bagaço-farelo foram preparadas com as seguintes concentrações de traçador: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100%. Estas amostras foram colocadas em placas de petri, e sob condições de iluminação controladas, foram fotografadas, digitalizadas e analisadas através do recurso de identificação da área da figura que tinha a cor pré-determinada (rosa). Na Figura 4.11 são apresentadas fotografias de amostras preparadas nas placas de petri, com diferentes concentrações de traçador.

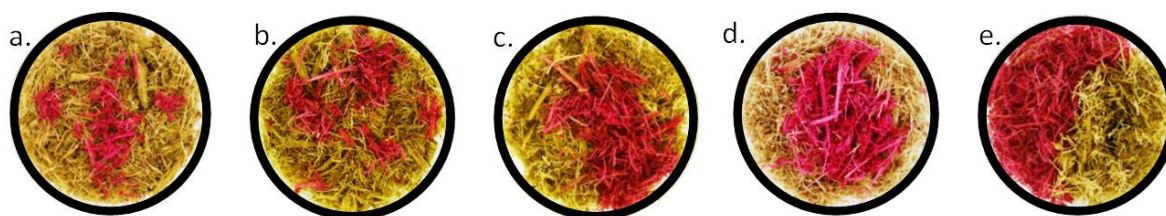


Figura 4.11. Amostras de bagaço-farelo preparadas com (a) 5%, (b) 10%, (c) 20%, (d) 30% e (e) 60% de traçador.

4.2.1.3 Técnica de traçadores coloridos

Para avaliar a mistura das partículas foram empregados dois equipamentos distintos: o tambor de parede rotativa com defletores e o tambor com agitação interna através de pás.

Primeiramente, a carga total de material a ser adicionada no tambor foi selecionada, as porções impregnada com corante e não impregnada foram dispostas lado a lado longitudinalmente para os ensaios de mistura radial, como exemplificado na Figura 4.12a, e em duas porções distintas ocupando completamente a seção transversal do tambor para os ensaios de dispersão axial, como esquematizado na Figura 4.12b.

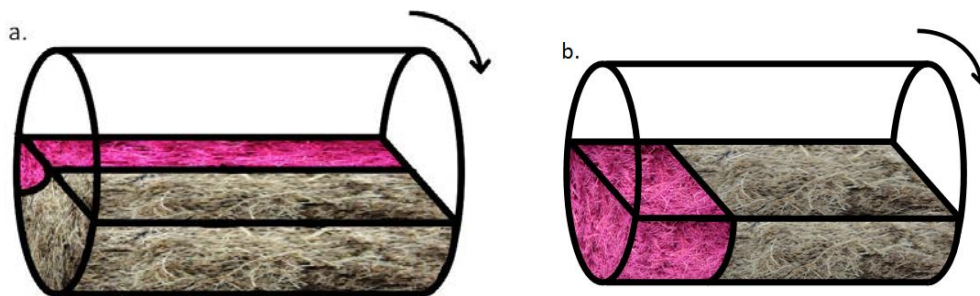


Figura 4.12. Condição inicial da técnica de traçadores coloridos para mistura (a) radial e (b) axial.

Alguns testes foram realizados preliminarmente, onde foi avaliada a concentração de partículas tingidas com traçador (20, 30 e 40% em peso) sobre os resultados finais de mistura e não foram encontradas diferenças expressivas entre as leituras finais de concentração de traçador, de modo que se decidiu empregar 30% para todos os experimentos de mistura.

4.2.1.3.1 Mistura radial

A finalidade deste procedimento foi avaliar se a configuração dos reatores favorecem a circulação das partículas e detectar a existência de pontos de estagnação. Ao mesmo tempo, procurou-se verificar as melhores condições operacionais que fornecessem boa mistura das partículas.

Tambor rotativo com defletores: após o tambor ser carregado, conforme mostra a Figura 4.12a, este foi submetido a rotação. Simultaneamente, pela parte frontal do tambor, como apresentado na fotografia da Figura 4.13, sob condições de iluminação controladas, o leito de partículas foi filmado com uma câmera digital SONY, modelo DCR-DVD408, durante meia hora.



Figura 4.13. Parte frontal do tambor de acrílico no início de um experimento de mistura radial na presença de tubo interno simulador.

Após a realização do processo de mistura, foi analisado o vídeo com ajuda do *software Picture Motion Browser (Sony Co.)* de edição de vídeo, que fornece ferramentas para fazer medições de tempo na faixa de milissegundos. Desta forma foi possível capturar a imagem do sistema depois de cada giro do tambor e cada imagem foi digitalizada no formato de imagem *bmp* e analisada mediante o *software Lenseye* para determinar a concentração de traçador em cada amostra.

A região de análise foi o segmento circular do quadrante inferior direito para um ângulo de 90° como apresentado no esquema da Figura 4.14. O critério de homogeneidade adotado foi de $30 \% \pm 2 \%$ de concentração do traçador.

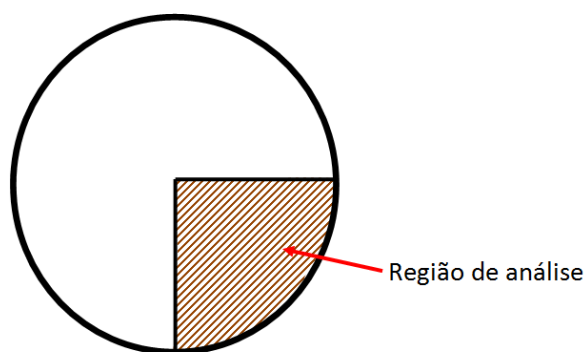


Figura 4.14. Região analisada na determinação da concentração de traçador.

Estes experimentos de homogeneidade do leito de partículas foram avaliados em função do grau de enchimento, frequência de rotação do tambor e a presença e ausência

Materiais e métodos

do tubo interno. Na Tabela 4.3 são apresentadas estas variáveis com seus respectivos níveis. A variável de resposta foi o número de giros necessários à homogeneização das partículas.

Tabela 4.3. Variáveis independentes nos experimentos de homogeneidade de partículas no tambor de acrílico.

Variável	Níveis		
Frequência (rpm)	1	4	7
Carga (Kg)	3	4,5	6
Tubo interno	com	sem	

Tambor com agitação interna: De forma similar ao procedimento realizado com o tambor de acrílico com defletores, o tambor com agitação interna foi carregado com o material como apresentado nas Figuras 4.12a e 4.15. A seguir, o eixo central com pás foi posto a girar e, simultaneamente, a tampa frontal do tambor foi filmada durante meia hora.



Figura 4.15. Tampa frontal do tambor com agitação interna no início de um experimento de mistura radial.

Após a filmagem, o procedimento para determinar a concentração de traçador foi análogo ao descrito para o tambor de acrílico. Neste caso, os experimentos de homogeneidade de partículas foram avaliados em função do grau de enchimento e da frequência de rotação com os níveis mostrados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Variáveis independentes nos experimentos de homogeneidade de partículas no tambor com agitação interna.

Variável	Níveis		
Frequência (rpm)	1	4	7
Carga (Kg)	3	4,5	6

4.2.1.3.2 Movimentação radial

As filmagens realizadas na etapa de mistura de partículas também serviram a avaliação da movimentação. Estes ensaios foram realizados em duas etapas. Na primeira etapa, qualitativa, o registro de imagens permitiu detectar e verificar eventuais pontos de estagnação em virtude dos elementos internos do tambor e das características dos materiais sólidos. A segunda etapa, quantitativa, permitiu calcular as velocidades das partículas, em diferentes regiões do leito, como mostrado na Figura 4.16, e estabelecer o regime de movimentação, inicialmente de acordo com o Quadro 3.1 do capítulo *Revisão Bibliográfica*.

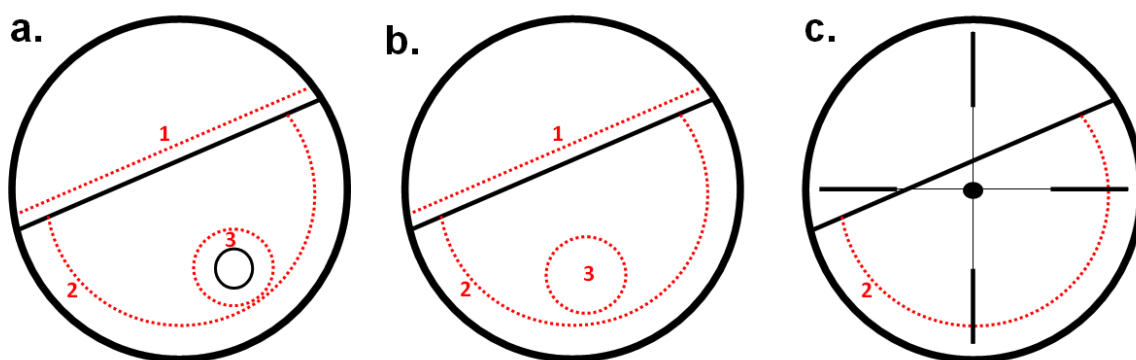


Figura 4.16. Regiões de velocidades avaliadas em (a) tambor rotativo com tubo interno, (b) tambor rotativo sem tubo interno e (c) tambor com pás de agitação interna.

Velocidades das partículas: As velocidades das partículas quando empregado o tubo interno, Figura 4.16a, foram calculadas nos seguintes planos:

Materiais e métodos

- a) Superfície livre do leito (indicada como 1 na Figura 4.16a): é o plano que inicia no topo da superfície livre e vai até a parede oposta do tambor;
- b) Adjacente à parede do cilindro (2): compreende a região que inicia quando a partícula abandona a superfície livre e é coletada por um dos defletores;
- c) Em torno do tubo alimentador (3): área circular com diâmetro de 4 cm ao redor do tubo alimentador, ou seja, 1 cm de distância do diâmetro externo do tubo.

Nos experimentos realizados sem tubo interno, Figura 4.16b, as regiões 1 e 2 mantiveram-se inalteradas, enquanto que a região (3) permaneceu com a localização anterior, mas incluindo todo o círculo que fora ocupado pelo tubo interno. Nos experimentos realizados com o eixo central com pás, Figura 4.16c, as velocidades das partículas foram calculadas somente ao lado da parede do tambor (2).

As velocidades das partículas na região 2, das Figuras 4.16a, b e c teoricamente correspondem à velocidade rotacional do tambor, portanto estas foram comparadas com:

$$v = R \times \omega \quad 4.1$$

onde v é a velocidade da partícula ao lado da parede, ω é a velocidade angular, a qual foi determinada pela Equação 3.2, e R é o raio do cilindro igual a 0,30m. Nas regiões 1 e 3, as velocidades foram calculadas por:

$$v = \frac{S}{t} \quad 4.2$$

onde S é a distância percorrida pela partícula durante o tempo t .

O tempo, t , que demoram as partículas para percorrer a distância S , nas regiões 1 e 3, foi determinado através do *software Picture Motion Browser*. Assume-se que as velocidades determinadas nas regiões de análise, vistas da tampa frontal do tambor, são próximas às velocidades que têm as partículas no interior do leito.

Regimes de escoamento: Os regimes e sub-regimes de escoamento de partículas sólidas foram classificados através do Quadro 3.1 e das filmagens realizadas para determinar as velocidades das partículas. O Quadro 3.1 mostra que os modelos físicos de movimentação provêm do número de Froude, Fr , definido pela Equação 3.1, e

Materiais e métodos

do grau de enchimento, f , definido pela Equação 3.8. O ângulo de repouso dinâmico () para a mistura bagaço-farelo natural e para a mistura tingida com solução de Rodamina B foi determinado com o objetivo avaliar se a tintura poderia alterar as características movimentação das partículas. Estas determinações foram realizadas unicamente no tambor rotativo com defletores.

4.2.1.3.3 Mistura axial

A finalidade deste procedimento foi avaliar se a arquitetura do reator favorece a circulação das partículas na direção axial.

Tambor rotativo com defletores: após o tambor ser carregado com as misturas tingida e não tingida, na posição indicada na Figura 4.12b, o tambor de acrílico foi submetido à rotação. Em intervalos de 15 minutos, o cilindro foi imobilizado e, através da janela de carga, sob condições de iluminação controladas, a superfície das partículas foi fotografada em cinco posições longitudinais como indicado na Figura 4.17.

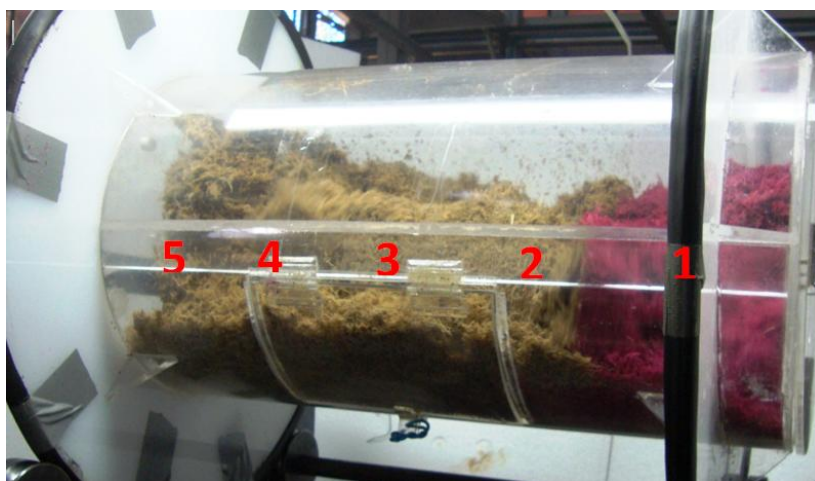


Figura 4.17. Posições axiais do cilindro onde a superfície das partículas foi fotografada.

As regiões das fotografias analisadas se sobrepõem umas às outras como indicado na Figura 4.18, já que estão distribuídas da seguinte forma: de 0 a 15cm para a posição 1, de 10 a 25cm para a posição 2, de 22 a 37cm para a posição 3, de 35 a 51cm para a posição 4 e de 45 a 60cm para a posição 5, tendo como referência a tampa frontal na qual foi posicionado o traçador.

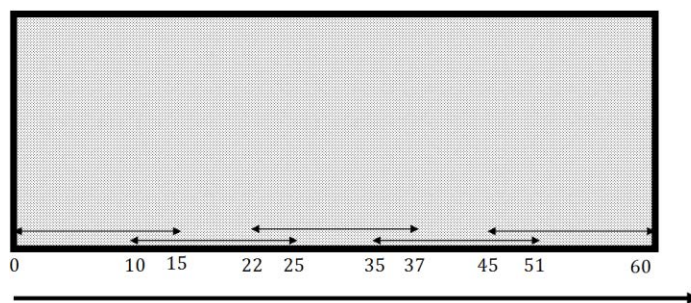


Figura 4.18. Regiões axiais do cilindro onde a superfície das partículas foi fotografada, localizadas entre 0 e 15cm (posição 1), 10 e 25cm (posição 2), 22 e 37cm (posição 3), 35 e 51cm (posição 4) e 45 e 60cm (posição 5), tendo à esquerda a tampa frontal de onde foram feitas as filmagens.

Cada fotografia foi digitalizada e analisada mediante o *software Lenseye* para determinar a concentração de traçador em cada região. Este processo foi repetido até a mistura obter a homogeneidade desejada. O critério de homogeneidade adotado foi de $30 \% \pm 2 \%$ de concentração do traçador.

O coeficiente de dispersão axial D foi calculado a partir da Equação 3.12 truncada no primeiro termo da série, pois foi observada variação só na segunda casa decimal para dois termos da série. Posteriormente, os valores dos coeficientes de dispersão axial foram empregados para simular este processo. A simulação numérica foi realizada a partir da equação diferencial de dispersão axial (Equação 3.11), através de uma rotina feita em *Matlab versão R2008a (The MathWorks)*, onde a discretização das derivadas na direção axial (z) foi realizada pelo método de diferenças finitas, considerando 60 partições. Posteriormente, as equações diferenciais ordinárias resultantes foram integradas no tempo pelo método de Runge Kutta, através do comando *ode45*. As concentrações de traçador fornecidas pela simulação foram comparadas com as concentrações de traçador experimentais, nas 5 posições analisadas, e foi calculado o erro entre ambas segundo a expressão a seguir:

$$erro = \frac{C_{simulada} - C_{experimental}}{C_{simulada}} \times 100 \quad 4.3$$

Os programas computacionais desenvolvidos encontram-se no Apêndice B.

Materiais e métodos

Os experimentos de dispersão axial foram avaliados em função do grau de enchimento, da frequência de rotação do tambor e da presença ou ausência do tubo interno. Na Tabela 4.5 são apresentadas estas variáveis com seus respectivos níveis. A variável de resposta foi o número de giros necessários à homogeneização das partículas.

Tabela 4.5. Variáveis independentes nos experimentos de dispersão axial no tambor de acrílico.

Variável	Níveis		
Frequência (rpm)	1	4	7
Carga (Kg)	3	4,5	6
Tubo interno	com	sem	

Tambor com agitação interna: De forma similar ao procedimento realizado com o tambor de acrílico com defletores, o tambor com agitação interna foi carregado com o material particulado como apresentado na Figura 4.12b. A seguir, o eixo central com pás foi posto a girar e, simultaneamente, a frente do tambor foi filmada com a câmera digital SONY, modelo DCR-DVD408. Devido ao material de construção do tambor, aço inox, não foi possível fotografar o leito de partículas ao longo do cilindro. Portanto as medidas de dispersão axial neste equipamento estão limitadas às concentrações em $z = 0$. Neste caso, os experimentos de homogeneidade de partículas foram avaliados em função do grau de enchimento (3, 4,5 e 6Kg), fixando-se a frequência de rotação em 7rpm.

4.2.2 Capacidade de retenção de água pelo leito de partículas sólidas

No início do processo fermentativo é necessário inocular o substrato com uma suspensão de esporos e adicionar solução nutritiva. Ao longo da fermentação, faz-se necessário molhar o meio de cultura com água estéril visando à diminuição da temperatura. Desta forma, é indispensável conhecer a distribuição de umidade no leito em função do grau de enchimento, vazão de atomização de água e quantidade de água aspergida.

4.2.2.1 Capacidade máxima de retenção de água

O sistema empregado na determinação da capacidade máxima de retenção de água da mistura bagaço e farelo, consistiu em um cilindro de aço inoxidável de 7,5cm de diâmetro interno e 10cm de comprimento, que possuía uma tela de 1mm de abertura fixada em sua extremidade inferior. O cilindro estava suportado por uma base de acrílico transparente a qual continha papel absorvente no fundo. Água foi bombeada por uma bomba de engrenagens MICROPUMP COLE-PARMER e atomizada através de um aspersor agrícola de cone cheio localizado 1cm acima do cilindro como mostrado na Figura 4.19, de modo que o jato aspergido cobria toda a área da seção transversal do cilindro.

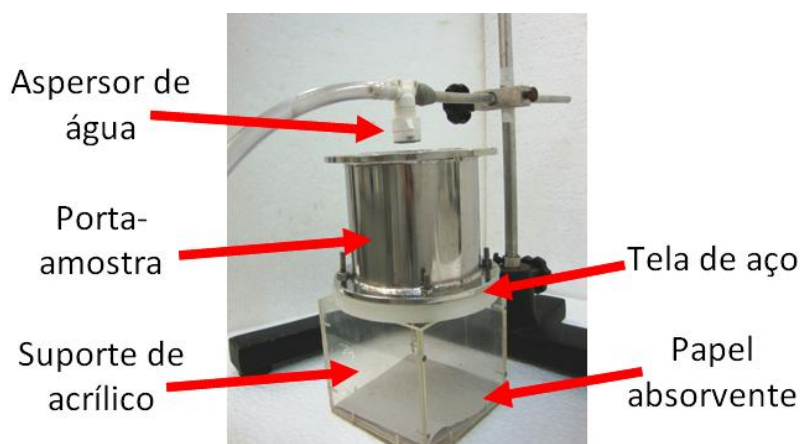


Figura 4.19. Sistema empregado na determinação da capacidade máxima de retenção de água pelo leito de partículas sólidas.

No cilindro foram colocados 23g da mistura bagaço-farelo, com umidade inicial de 8%. Posteriormente, através do aspersor foram adicionados 5mL de água a cada 1 minuto até observar a queda da primeira gota de água, definido-se este valor como a máxima capacidade de retenção de água pela matriz sólida. Este procedimento durou cerca de 30 minutos e para ter maior confiabilidade nos resultados foi reproduzido 5 vezes.

Para eliminar as suspeitas de que a umidade inicial do sólido pudesse interferir no valor final de retenção de água, o experimento foi repetido com 15g de mistura a 50% de umidade inicial.

4.2.2.2 Experimentos preliminares

Aspersão de água: Com a finalidade de observar a retenção de água pelo leito de partículas sólidas frente à quantidade de água aspergida, à vazão de água e à intermitência de adição, foram realizados ensaios empregando-se mistura bagaço-farelo com teor inicial de umidade de 50%, elevando-a até 75%. Para realizar as aspersões foi escolhida solução de Rodamina B, com concentração de 0,02%, em lugar de água para facilitar a visualização.

No início, solução de Rodamina B foi aspergida continuamente, para 3, 4,5 e 6Kg de material, à uma vazão de 1500mL/min, Em seguida, foram realizadas aspersões intermitentemente, em intervalos de tempo regulares, dependentes da carga avaliada, levando-se em consideração os resultados de mistura obtidos na etapa de homogeneização de partículas (seção 5.1.2). Assim, para 3Kg de material, a solução de Rodamina B foi aspergida a cada 13 minutos, para 4,5Kg a cada 15 minutos e para 6Kg a cada 17 minutos, sendo que o tambor girava a 1rpm de frequência. A aspersão foi realizada à vazão de 1500mL/min em volumes de 50mL, 100mL, 150mL, 200mL, 250mL, 300mL e 400mL.

Os resultados permitiram estabelecer os níveis das variáveis analisadas na etapa de retenção de água conforme descrição adiante (seção 4.2.2.3).

4.2.2.3 Experimentos de retenção de água

Nesta etapa, colocou-se o material dentro do tambor rotativo com defletores, sem o tubo interno simulador de aeração, que, a seguir, foi posto a girar. Simultaneamente, solução de Rodamina B 0,02% foi aspergida sobre as partículas através do tubo dotado com aspersores, como esquematizado na Figura 4.20. Dado que os experimentos de mistura de partículas determinaram que a frequência de rotação do tambor não teve influência no número de rotações necessárias a alcançar a homogeneidade, os experimentos de retenção de água foram realizados a 1rpm.

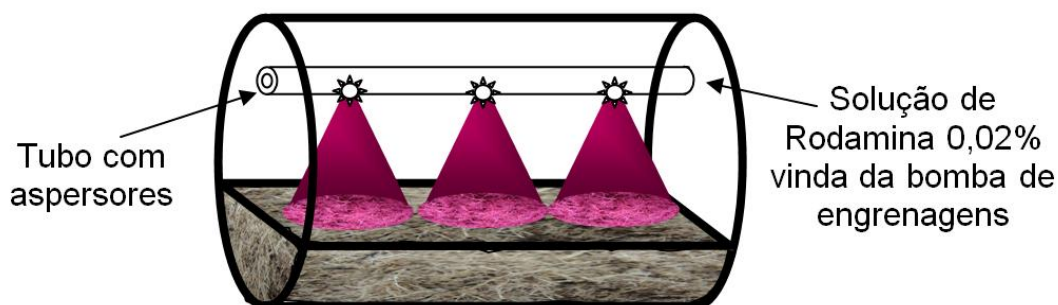


Figura 4.20. Esquema do sistema de aspersão de solução de Rodamina B para os ensaios de absorção de água.

A quantidade total de corante aspergida foi suficiente para que o leito de partículas alcançasse uma umidade final de 75%. Esta solução foi adicionada ao leito de forma intermitente, com volumes de 100, 150 e 200mL para 3, 4,5 e 6Kg de carga de sólidos, respectivamente; e com volumes de 200, 300 e 400mL para 3, 4,5 e 6Kg de carga de sólidos, respectivamente, a fim de determinar com qual dos dois volumes se obtém umidade homogênea para a mesma carga de material. Também, foram testados duas configurações para o tubo com aspersores agrícolas, uma com três e outra com cinco aspersores. As vazões de aspersão foram escolhidas a partir dos resultados obtidos por Grajales (2010) para a maior área molhada no mesmo equipamento (1500 e 2500mL/min).

Ao final do processo, ou seja, no momento em que foi aspergido o total de solução de Rodamina B, o tambor foi imobilizado e sob condições de iluminação controlada, o sistema foi fotografado nas cinco posições do leito apresentadas na Figura 4.17. Estas fotografias foram digitalizadas, para determinar a homogeneidade na cor das mesmas através do *software* *Lenseye*. Posteriormente, foram retiradas cinco amostras da superfície das partículas e uma da camada próxima à parede do tambor, para determinação de umidade no analisador de umidade Ohaus modelo MB45.

Na Tabela 4.6 são apresentadas as variáveis analisadas nos experimentos de retenção de água pelo leito de partículas bagaço-farelo, onde a variável de resposta foi a maior homogeneidade na umidade das partículas.

Materiais e métodos

Tabela 4.6. Variáveis controladas nos experimentos de umidade.

Variável		Níveis		
Carga (Kg)		3	4,5	6
Vazão de aspersão (mL/min)		1500	2500	
Quantidade de aspersores o tubo		3	5	
Intervalos de aspersão (mL/carga do tambor)	3Kg	100	200	
	4,5Kg	150	300	
	6Kg	200	400	

4.2.3 Análise térmica do sistema

Particularmente, para o caso FES, é de vital importância conhecer o comportamento térmico do reator, dado que gradientes de temperatura no interior do leito podem prejudicar o metabolismo microbiano. Na avaliação de um novo equipamento, faz-se necessário analisar a capacidade de remoção do calor e a distribuição de temperatura do meio.

Todos os experimentos realizados nesta etapa foram levados a cabo no tambor de aço inoxidável. Dentro do equipamento, foram dispostos dois conjuntos de sensores, um cujas extremidades foram posicionadas próximo à parede do tambor, e outro cujas extremidades foram posicionadas próximo à superfície das partículas. Esses conjuntos de sensores foram dispostos longitudinalmente a 10, 20, 30, 40 e 50cm do comprimento total do tambor e, foram identificados como 1, 2, 3, 4 e 5, desde a alimentação de ar até o extremo oposto do reator, conforme a nomenclatura expressa no esquema da Figura 4.21. Devido à carga de partículas e ao arranjo mecânico do tubo, os termopares permaneceram sempre na mesma posição, imersos no leito de bagaço-farelo. Tendo em vista que o procedimento de carga foi realizado manualmente, inclusive nos experimentos feitos com o leito fixo, os sensores mantiveram a mesma posição inicial.

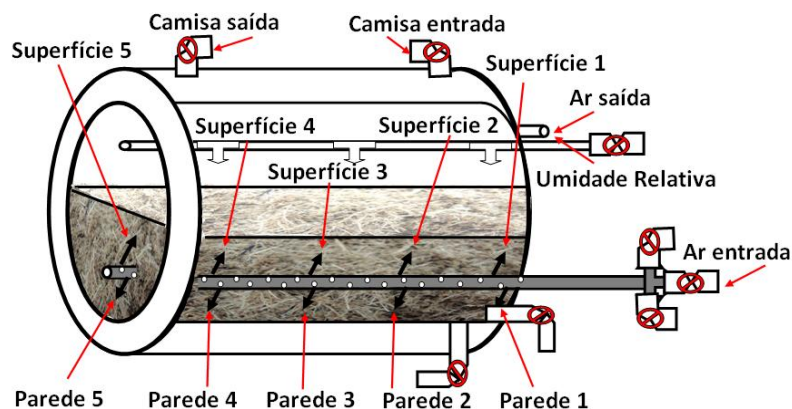


Figura 4.21. Diagrama esquemático do tambor de aço-inox com a nomenclatura dos termopares.

Não foi estabelecido um arranjo estatístico definido, realizando-se apenas alterações nas principais variáveis do sistema com a finalidade de detectar a maneira mais eficiente de controlar a temperatura do meio de partículas sólidas. Nesta etapa do trabalho, somente os meios sólidos sem inoculação foram empregados.

Primeiramente, foi realizado um ensaio para verificar o tempo de resposta do sistema sem carga. Neste caso, o tambor encontrava-se à temperatura inicial de 25°C e subitamente a temperatura da camisa foi colocada a 45°C, não foi feita aspersão de água, e foi inserido ar a uma vazão de 5L/min a 45°C. A temperatura de 45°C foi escolhida pois é a ótima de crescimento do fungo *Myceliophthora thermophila* I1D3b e a vazão de ar de 5L/min foi selecionada levando em consideração as condições de operação utilizadas por Zanelato (2011), que empregou o mesmo fungo e substrato em um reator de leito fixo.

A seguir, experimentos foram realizados com o leito carregado com 3Kg da mistura farelo/bagaço a 75% de umidade e com temperatura inicial de 25°C, mantendo-se a temperatura da camisa e do ar a 45°C, e vazão de ar a 5L/min. Visando à diminuição do tempo de aquecimento do meio particulado foi realizado um experimento similar ao anterior, porém incluindo aspersão de água a 65°C e 2500mL/min, sendo que o meio particulado foi colocado a 50% de umidade inicial. Com a finalidade de homogeneizar as temperaturas no interior do leito sólido foi conduzido um experimento análogo ao anterior, porém incluindo rotação do tambor a 1rpm.

Como durante o processo fermentativo é gerado calor, o qual deve ser removido rapidamente para favorecer as atividades metabólicas do microrganismo, foi realizado um experimento com as seguintes condições de operação: 3Kg de material particulado a 75% de umidade e temperatura inicial de 55°C, temperatura da camisa 45°C, inserção de ar a

Materiais e métodos

5L/min à mesma temperatura da camisa. Posteriormente, foi comparado com um experimento similar, mas o meio particulado a 50% de umidade inicial e realizando aspersão de água a 25°C e 2500mL/min.

Finalmente, três experimentos foram realizados para três cargas de material diferentes: 3, 4,5 e 6kg. As condições de operação empregadas foram: temperatura e umidade inicial do meio particulado 55°C e 50%, respectivamente, inserção de ar a 5L/min e 45°C, temperatura da camisa 45°C, aspersão de água a 25°C e 2500mL/min e rotação intermitente do tambor a 1rpm.

Em todos os experimentos foi monitorada a umidade relativa do ar de entrada ao equipamento.

As condições operacionais dos experimentos anteriormente mencionados encontram-se resumidos na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Condições de operação da avaliação térmica do sistema.

Exp*	f	T_{camisa} (°C)	Aspersão de água 2500mL/min	Ar 5L/min e 45°C	Umidade inicial do leito (%)	$T_{inicial}$ do leito (°C)	Rotação
1	-	25/45	X	✓	-	-	X
2	0,4	45	X	✓	75	25	X
3	0,4	45	✓	✓	50	25	X
4	0,4	45	✓	✓	50	25	✓
5	0,4	45	X	✓	75	55	X
6	0,4	45	✓	✓	50	55	X
7	0,4	45	✓	✓	50	55	✓
8	0,5	45	✓	✓	50	55	✓
9	0,6	45	✓	✓	50	55	✓

*Exp: experimento

Materiais e métodos

4.2.4 Avaliação da tolerância à agitação mecânica pelo fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b

4.2.4.1 Preparação do inoculo, da solução nutriente e substrato

Pré-inóculo: O fungo *Myceliophthora thermophila* I1D3b, então armazenado em câmara fria a 5°C, foi deixado à temperatura ambiente durante 3 horas. Após este período, a superfície do meio de cultivo foi suavemente raspada com alça de platina, e os esporos transferidos para um erlenmeyer contendo 50mL do meio BDA inclinado, previamente esterilizado em autoclave a 120°C durante 20 minutos, e solidificado. Este procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. Uma vez o fungo introduzido no erlenmeyer, este foi incubado em estufa termostatzada BOD a 45°C durante 96 horas. Na Figura 4.22 é apresentada uma fotografia do pré-inóculo.

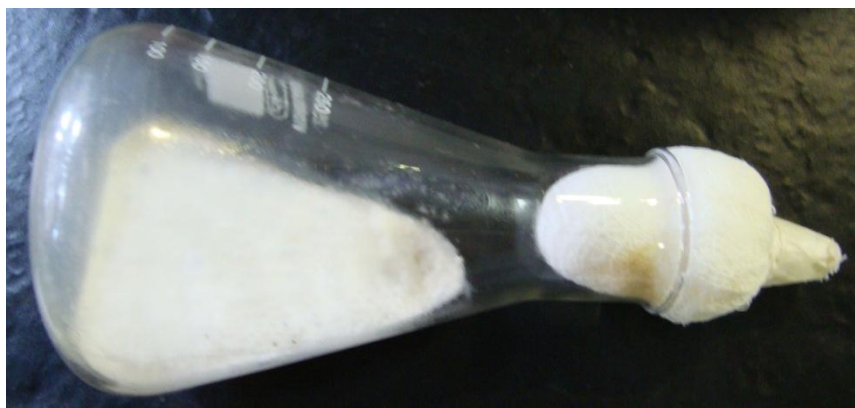


Figura 4.22. Pré-inóculo preparado em erlenmeyer.

Solução nutriente e suspensão de esporos: A solução nutriente foi composta de 10g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3g/L MAP (fertilizante agrícola), 2g/L de KCl, 0,5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1mL/L CaCl_2 e 1g/L de Tween 80. O pH foi ajustado para 5 com NaOH e/ou HCl (MORETTI, 2013). Esta solução foi esterilizada em autoclave a 120°C por 20 minutos e deixada à temperatura ambiente até resfriamento. Em câmara de fluxo laminar, os esporos do fungo presentes no pré-inóculo foram suspensos na solução nutriente raspando-se gentilmente a superfície do meio de cultura com alça de platina e ajustando-se a concentração para aproximadamente 10^7 esporos/mL, com auxílio de uma câmara de Neubauer.

Materiais e métodos

Substrato: Na maioria dos trabalhos desenvolvidos pelo Grupo de Bioenergia e Meio Ambiente, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista Campus de São José do Rio Preto, que envolveram bagaço de cana e farelo de trigo como substratos, realizou-se um tratamento prévio destes materiais anterior à fermentação (CASCIATORI, 2012; MORETTI, 2013; SHIOTA, 2013; ZANELATO, 2011). O pré-tratamento consistiu em lavar o bagaço de cana com água corrente para retirar terra e sacarose residual, secagem em estufa de convecção forçada a 60°C até peso constante, peneiramento em tamiz de 3mm para retirada do material mais grosseiro e peneiramento em tamiz de 1,41mm para retirada de poeira e partículas mais finas. O farelo de trigo submetido ao mesmo pré-tratamento, sem o peneiramento.

No entanto, prevendo-se a aplicação em larga escala deste processo, as etapas de lavagem, secagem e peneiramento, demandam estrutura física, tempo e gastos energéticos. Por este motivo, decidiu-se comparar as atividades enzimáticas de endoglucanase utilizando os substratos com e sem pré-tratamento (nas condições como foram entregues pelos fornecedores). Ambos os materiais com e sem pré-tratamento foram armazenados em sacos plásticos de polietileno de alta densidade, em câmara fria a 5°C até sua utilização.

4.2.4.2 Fermentações em sacos de polipropileno

Uma massa correspondente a 5g de substrato seco (com e sem pré-tratamento) foi introduzida em saco de polipropileno de 12cmx20cm. No interior do saco foi colocada uma espiral metálica, para evitar a compactação do meio e facilitar as trocas gasosas, e na parte superior foi fixado um tubo de PVC de 3,6cm de diâmetro, ao qual foi aplicado um tampão de algodão, como apresentado na fotografia da Figura 4.23. O sistema completo foi levado para autoclave a 120°C por 20 minutos para sua esterilização.



Figura 4.23. Sistema de fermentação em saco de polipropileno.

Materiais e métodos

O saco estéril foi deixado à temperatura ambiente até resfriamento. Em câmara de fluxo laminar, a suspensão de esporos foi adicionada ao meio sólido em quantidade suficiente para o substrato atingir umidade final de 75%, seguido de manipulação manual do material para homogeneização. Os sacos de fermentação foram levados a uma câmara climática DBO por 96 horas à temperatura de 45°C, seguindo-se recomendação de Zanelato (2011).

Nestes ensaios foram adotadas duas estratégias:

1. Sacos foram mantidos estáticos durante todo o processo fermentativo.
2. Promoveu-se agitação periódica dos sacos. Para isto, os sacos foram retirados da BOD em períodos de 12 e 24 horas e foram colocados em banho metabólico Dubnoff (Marconi, modelo MA 093), que operou sem água, mantendo-se apenas a agitação recíproca acionada, com deslocamento de 4cm e velocidade de 20bpm (batimentos por minuto), por períodos de 2 minutos.

De acordo com os resultados desses experimentos foi observado que o fungo *Myceliphthora thermophila* I1D3b tolerou o cisalhamento a grande amplitude e baixa frequência, além disso, o pré-tratamento do substrato não interferiu na produção de celulasas. Desta forma, decidiu-se provocar uma maior tensão, desta vez utilizando unicamente o substrato sem pré-tratamento. Para isto, foi utilizado um vibrador de peneiras da série *Tyler Produtest Alpha 3*, avaliando três tempos de agitação: 2,5, 5 e 7 minutos, a cada 12 e 24 horas.

4.2.4.3 Extração das enzimas e determinação das atividades enzimáticas

Uma vez concluído o processo fermentativo, a cada saco foi adicionando 100mL de água destilada ao material fermentado, que foi revolvido e levado à agitação por 30 minutos em agitador orbital a 100rpm. O material foi filtrado e centrifugado a 10000g, durante 15 minutos à temperatura de 5°C. O sobrenadante ou solução enzimática bruta foi utilizada na determinação da atividade de CMCase.

O método usado para a determinação das atividades de CMCase foi o método do Ghose (1987). O método consiste em colocar 0,1mL da solução enzimática com 0,9mL de

Materiais e métodos

substrato, solução de carboximetilcelulose (CMC – Sigma), incubado a 60°C em banho Maria. Esta reação teve lugar durante 10 minutos e foi interrompida pela adição de 1,0mL do reagente DNS e o aumento da temperatura. Para isto, essa solução foi mantida em água em ebulição durante 10 minutos. O DNS permitiu quantificar os açúcares redutores liberados a partir da curva padrão de glicose (concentração de glicose versus absorbância a 540nm). Posteriormente, essa segunda reação, de liberação de açúcares redutores, foi interrompida com a diminuição da temperatura colocando-a em um banho de gelo. Após este procedimento, foram adicionados 8,0mL de água destilada, seguida de agitação em um agitador para tubos de ensaio e determinação da absorbância. A leitura da absorbância foi realizada em um espectrofotômetro UV-VIS Perkin Elemer Lambda 25, a 540nm de comprimento de onda. Com as amostras controle foi realizado o mesmo procedimento, porém adicionado 0,1mL de água destilada em lugar do extrato enzimático. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1,0 μ mol de glicose, por minuto de reação e por mL de enzima.

4.2.1.4 Fermentações no protótipo de biorreator de alumínio

O pré-inóculo, a solução nutriente e a suspensão de esporos foram preparados conforme descrição no item 4.2.4.1. O substrato, em quantidade suficiente para atingir um dos três graus de enchimento a ser avaliado, foi esterilizado em autoclave (1,1Kg/cm²) a 120°C durante 20 minutos dentro de um saco de polipropileno, juntamente com o biorreator protótipo de alumínio. Em câmara de fluxo laminar, o meio foi inoculado da seguinte forma: a suspensão de esporos junto com a solução nutriente foi introduzida no saco de polipropileno que continha o substrato, este foi revolvido manualmente até observar a absorção do líquido pelas partículas de forma homogênea. Posteriormente, o meio já inoculado foi colocado dentro do biorreator e cultivado por 96 horas. A temperatura do reator foi mantida em 45°C e o ar foi introduzido à vazão de 5L/min e a 45°C. As massas de meio de cultivo empregadas foram 254,78, 318,48 e 382,17 a 75% de umidade, correspondentes ao primeiro, segundo e terceiro grau de enchimento, respectivamente.

Ao final da fermentação, foram coletadas seis amostras em diferentes regiões do biorreator, nas partes frontal, intermediária e traseira, conforme apresentado no esquema da Figura 4.24, sendo que é considerado como “Frontal” a região próxima à alimentação de ar.

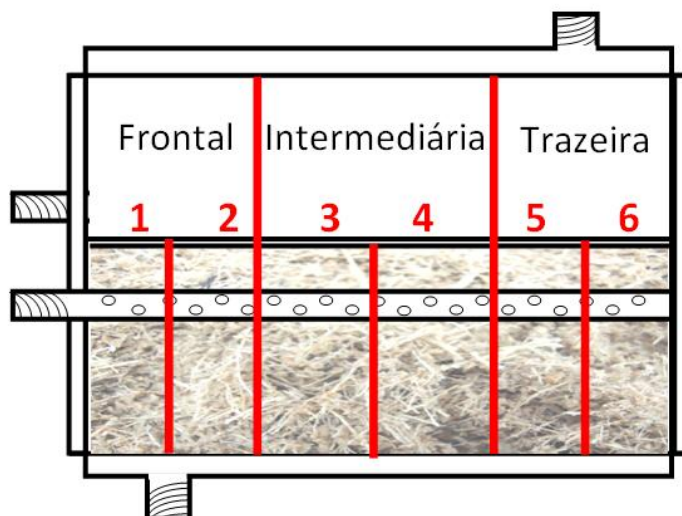


Figura 4.24. Diagrama de coleta de amostras no biorreator de alumínio.

Simultaneamente, foram conduzidas fermentações em sacos de polipropileno contendo 5g de substrato como referencia aos experimentos no biorreator rotativo construído em alumínio.

As variáveis adotadas neste ensaio foram o grau de enchimento do tambor e a intermitência de rotações (a cada 12 e 24 horas), sendo que a frequência de rotação do tambor foi mantida em 18rpm devido às características construtivas do equipamento. O número de rotações foi estabelecido em 12, 15 e 17 giros para o primeiro, segundo e terceiro grau de enchimento, respectivamente, de acordo com os resultados encontrados na etapa de mistura de partículas (seção 5.1.3). Na Tabela 4.8 são apresentadas estas variáveis com seus respectivos níveis A variável de resposta foi a atividade de endoglucanase.

Tabela 4.8. Variáveis independentes nos experimentos de tolerância do fungo em relação à rotação realizados no protótipo de alumínio.

Variável	Níveis		
Grau de enchimento	0,4	0,5	0,6
Rotações diárias	0	1	2

4.2.5 Produção de celulasas por FES em biorreator rotativo

Um dos principais objetivos do uso do biorreator rotativo para produção de celulasas por FES foi reunir várias etapas do processo no mesmo equipamento, a fim de reduzir a probabilidade de contaminação por práticas manuais. Desta forma dentro do biorreator rotativo construído em aço-inox foram realizadas as etapas de esterilização do substrato e do próprio equipamento, aspersão de solução nutriente e suspensão de esporos ao meio, fermentação e aspersão de água destilada para a extração das enzimas.

Pré-inóculo: A quantidade de inóculo necessário aos ensaios no biorreator foi grande comparada aos sacos plásticos de polipropileno, por este motivo os esporos do fungo foram repicados em uma área superficial maior. Para isto, meio de cultura BDA foi disposto em uma bandeja de alumínio de 36cm de diâmetro (200mL), a qual foi alojada no interior de um saco de polipropileno, em cuja extremidade foi colocado um tubo de PVC de 3,6cm de diâmetro, vedado com um tampão de algodão, como mostrado na Figura 4.25. Posteriormente, o conjunto foi esterilizado em autoclave a 120°C durante 20 minutos e após um período de 1 hora à temperatura ambiente este se solidificou. Em câmara de fluxo laminar os esporos do fungo foram transferidos para o meio BDA, seguidos de um período de incubação de 96 horas em estufa termostatzada DBO a 45°C.



Figura 4.25. Pré-inóculo preparado em fôrmas de alumínio.

Materiais e métodos

Solução nutriente e suspensão de esporos: A solução nutriente foi a mesma usada na etapa anterior (seção 4.2.4.1). Esta foi colocada em um tanque de aço-inox contíguo ao biorreator e esterilizada dentro do mesmo tanque com vapor proveniente da caldeira à temperatura de 120°C por 20 minutos. Posteriormente, esta foi deixada resfriar até alcançar a temperatura ambiente. Simultaneamente, em câmara de fluxo laminar, os esporos do fungo cultivados nas bandejas de alumínio foram suspensos em água destilada, com 1% de Tween, previamente esterilizada. A concentração de esporos também foi ajustada para aproximadamente 10^7 esporos/mL. Após este procedimento, a suspensão de esporos foi introduzida no tanque de aço contendo a solução nutriente à temperatura ambiente.

Substratos: O bagaço-farelo, em quantidade suficiente para atingir um dos três graus de enchimento a ser avaliado, foi introduzido no biorreator. Este foi fechado e esterilizado com vapor proveniente da caldeira a 120°C ($1,5\text{Kg}/\text{cm}^2$) durante 20 minutos, seguido de resfriamento até 45°C.

Fermentação: Através de uma bomba de engrenagens MICROPUMP COLPARMER, a suspensão de esporos e a solução nutriente foram bombeadas e aspergidas sobre o meio de substrato sólido. A aspersão foi realizada em volumes específicos para cada carga de material de acordo com os resultados encontrados na seção de capacidade de retenção de água (item 5.2). Simultaneamente o biorreator foi submetido à rotação para homogeneização e absorção do líquido nas partículas, sendo que o número de rotações necessárias para homogeneizar o meio também dependeu da quantidade de material carregado no equipamento, conforme os resultados da seção de mistura de partículas (item 5.1). Posteriormente, o meio já inoculado permaneceu dentro do biorreator durante 96 horas a 45°C em presença de ar a 5L/min.

Extração das enzimas: Uma vez culminado o processo fermentativo, 1,5L de água destilada/Kg de substrato foram aspergidos ao material fermentado, o qual foi revolvido dentro do biorreator por 30 minutos a 1,5rpm para liberação das enzimas. Nesse momento uma alíquota de 200mL do extrato enzimático foi retirado através da tampa do biorreator, que foi filtrado e centrifugado a 10000g, durante 15 minutos à temperatura de 5°C. O sobrenadante ou solução enzimática bruta foi utilizada na determinação da atividade de CMCase.

Materiais e métodos

Simultaneamente, aos ensaios no biorreator de aço-inoxidável, fermentações em sacos de polipropileno contendo 5g de substrato foram conduzidas como referencia aos experimentos no biorreator rotativo.

A produção de celulasas foi avaliada em função do grau de enchimento e da rotação do tambor. A agitação foi realizada a cada 24 horas e a frequência de rotação do biorreator foi mantida a 1rpm. O número de rotações foi estabelecido em 12, 15 e 17 giros para o primeiro, segundo e terceiro graus de enchimento, respectivamente, de acordo com os resultados encontrados na etapa de mistura de partículas (seção 5.1.3). Na Tabela 4.9 são apresentadas estas variáveis com seus respectivos níveis. A variável de resposta foi atividade de endoglucanase.

Tabela 4.9. Variáveis independentes nos experimentos de produção de celulasas por FES.

Variável	Níveis		
Carga (Kg)	3	4,5	6
Agitação do leito	sim	não	

Capítulo 5

Resultados e Discussão

5.1 MISTURA E MOVIMENTAÇÃO DE PARTÍCULAS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E FARELO DE TRIGO EM TAMBOR ROTATIVO

5.1.1 Experimentos preliminares

Movimentação em tambor rotativo com dois tubos internos: Na Figura 5.1a é apresentada uma fotografia do arranjo de partículas para um leito de 3Kg da mistura bagaço-farelo a 75% de umidade, no tambor com dois tubos internos. A rotação do tambor foi imposta no sentido anti horário, de modo que foi possível observar que o tubo do lado esquerdo não ficou imerso em meio das partículas devido ao alto ângulo de repouso dinâmico de 35° , característico de partículas fibrosas, irregulares e aderentes (McCABE; SMITH; HARRIOT, 1991), e ao baixo grau de enchimento. Ao redor do tubo do lado direito, houve movimentação das partículas com velocidades menores às do resto do leito, como já haviam observado Grajales et al. (2012) quando empregaram arroz neste mesmo equipamento.

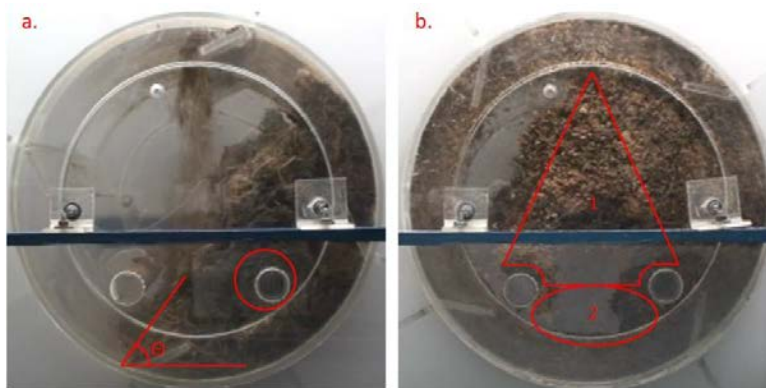


Figura 5.1. Movimentação de partículas para o leito de bagaço-farelo a 75% de umidade na presença de dois tubos internos (a) 3Kg e (b) 6Kg.

Resultados e discussão

Na Figura 5.1b mostra-se o leito com carga de 6Kg da mistura bagaço-farelo, também a 75% de umidade. No início dos ensaios, ambos os tubos ficaram imersos no leito de partículas, mas ao final do experimento houve aglomeração de material sólido acima dos dois tubos (região 1), sendo que a área de partículas aglomeradas aumentou conforme aumentou a frequência de rotação. Simultaneamente, observou-se uma região vazia entre e abaixo dos dois tubos (região 2). Tais heterogeneidades não foram observadas nos ensaios realizados com material seco (15% de umidade), havendo circulação das partículas em todas as regiões do tambor, sem serem observados pontos de estagnação. No entanto, tal condição de umidade não tem efeitos práticos para os objetivos de fermentação deste trabalho, já que as atividades metabólicas do microrganismo *Myceliophthora thermophila* I1D3b requerem materiais com umidade elevada, de acordo com os resultados encontrados por Zanelato et al. (2012).

Em decorrência destes resultados, decidiu-se empregar apenas o tubo do lado direito para todos os demais experimentos, com a finalidade de prover ar uniformemente ao sistema e de aumentar a área de transferência de calor, favorecendo o resfriamento do leito ao longo do processo fermentativo.

Técnica de traçadores - método analítico: A curva de calibração com diferentes concentrações de Rodamina B em água destilada em função da fluorescência, é apresentada na Figura 5.2,

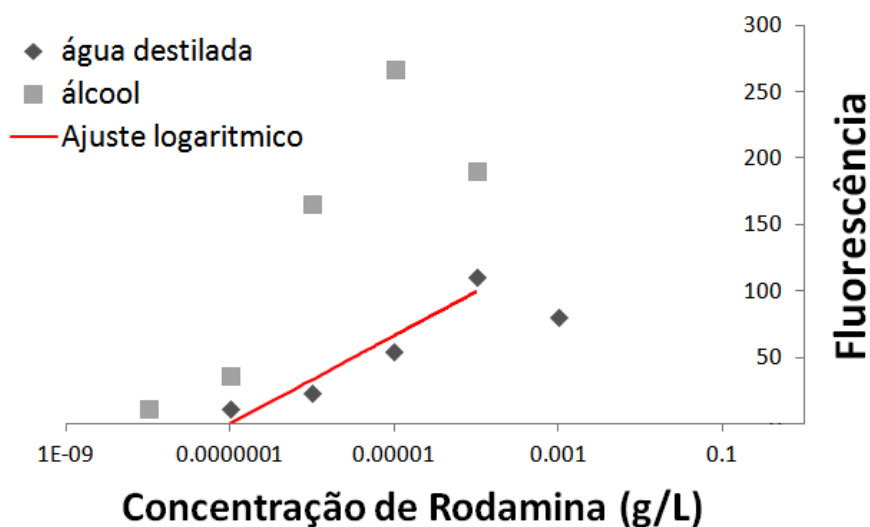


Figura 5.2. Curva de calibração para a concentração de Rodamina B, com extração realizada com água e álcool.

Resultados e discussão

Da figura, é possível observar que a faixa de aplicação para as concentrações variou entre 1×10^{-7} e 1×10^{-4} g/L uma vez que concentrações abaixo de 1×10^{-7} g/L não emitiram fluorescência, e concentrações acima de 1×10^{-4} g/L apresentam comportamento anômalo de queda, indicando possível interação entre a Rodamina B e a água da solução. No entanto, a faixa de aplicação é bastante ampla e adequada aos ensaios realizados. Uma regressão logarítmica na porção linear indicada na mesma figura foi feita excluindo-se o dado para a concentração mais elevada, resultando em:

$$C_R = 2 \times 10^{-8} \text{Exp}(0,0243 F) \quad 5.1$$

onde F é fluorescência e C_R é a concentração de Rodamina B em porcentagem.

Após a calibração, foram realizadas cinco extrações de Rodamina B da mistura de bagaço-farelo tingida e posteriores quantificações. A fluorescência obtida para estas extrações foi de $88,61 \pm 1,1$. Desta forma, aplicando-se a equação 5.1 obteve-se um rendimento de extração igual a 47,48%. No trabalho de Marsh et al. (2000) foi encontrado um rendimento de 60,6% para extração de Rodamina. Neste caso, a constituição fibrosa do bagaço de cana, possivelmente faz com que este fixe mais a Rodamina, sendo mais difícil sua posterior remoção. Apesar do baixo rendimento de extração, o desvio padrão para a média da fluorescência da Rodamina B proveniente das extrações foi baixo, sendo factível sua utilização como método analítico.

Como mencionado no capítulo de *Materiais e Métodos*, foram realizados alguns experimentos na tentativa de aumentar a eficiência da extração. Na Figura 5.3 são apresentadas duas fotografias de Rodamina B extraída com água (a) e álcool a 70% (b), sendo possível observar-se que o emprego de álcool melhora notavelmente a extração.

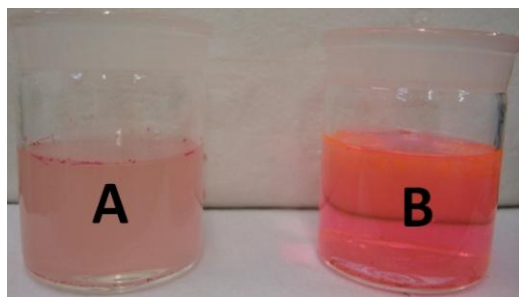


Figura 5.3. Extrato proveniente de uma mistura de bagaço-farelo tingida inicialmente com Rodamina B a 0,01%, após extração com (a) água destilada e (b) álcool.

Resultados e discussão

Os resultados das análises de fluorescência indicaram valores maiores do que os obtidos com a água para as mesmas concentrações de Rodamina B, porém, a curva se encontra deslocada à esquerda, como pode ser visto na Figura 5.2. Desta forma, estas determinações não são confiáveis, pois existe a possibilidade de que os comprimentos de onda de excitação e emissão correspondam a valores diferentes de 557nm e 581nm, respectivamente. Assim, seria necessário realizar um estudo detalhado do efeito da mistura de soluções alcoólicas e Rodamina B sobre a fluorescência, o que foge ao escopo deste trabalho.

Técnica de traçadores - método de análise de imagem: Na Figura 5.4 são apresentadas as fotografias de algumas amostras preparadas em placas de petri com azul de metileno como traçador.

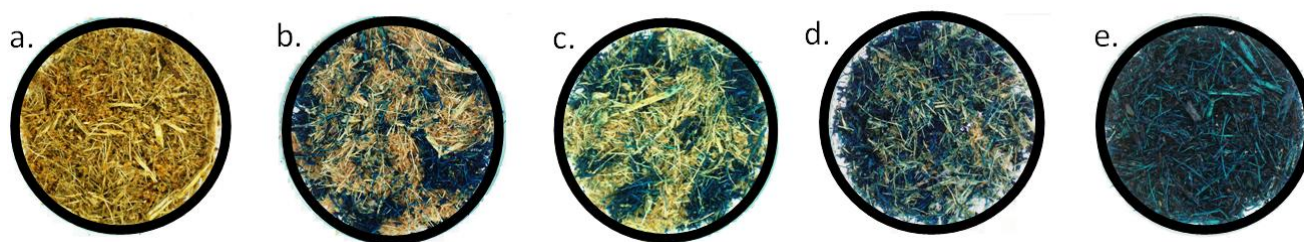


Figura 5.4. Amostras de bagaço de cana e farelo de trigo, na proporção 7:3 e 75% de umidade, preparadas com azul de metileno nas concentrações (a) 0%, (b) 20%, (c) 40%, (d) 60% e (e) 100%.

Na Tabela 5.1 são mostrados os valores correspondentes às áreas azuis reconhecidas pelo *software Lenseye*, com os respectivos erros em relação à concentração real. Note-se que há uma tendência de que as porcentagens das áreas identificadas sejam maiores do que os valores reais e que há uma tendência de crescimento desta diferença com o aumento da concentração de corante. Em termos do erro esperado para a análise, este se mostrou dentro de um limite aceitável, considerando-se a heterogeneidade do material, inclusive pelos tons variados de sua cor natural, sendo inferiores a 12,5%.

Resultados e discussão

Tabela 5.1. Análise de imagem no *software Lenseye* utilizando bagaço-farelo tingido com azul de metileno como traçador.

Concentração de traçador (%)	Área reconhecida pelo <i>software</i>	Diferença Real – Reconhecido (%)	Erro (%)
0,00	0,00	0	-
10,00	10,98	-0,98	-9,80
20,00	22,31	-2,31	-11,55
30,00	30,15	-0,15	-0,50
40,00	41,59	-1,59	-3,98
50,00	50,66	-0,66	-1,32
60,00	59,31	0,69	1,15
70,00	75,90	-5,9	-8,43
80,00	89,72	-9,72	-12,15
90,00	94,23	-4,23	-4,70
100,00	100,00	0	-

Através do *software Lenseye* foi realizada a determinação da área tingida pela Rodamina B presente em cada amostra de mistura bagaço-farelo, com umidade de 75%, preparadas em placas de petri nas concentrações de traçador indicadas na Tabela 5.2. Ressalte-se que a área reconhecida pelo *software* é muito próxima à concentração de traçador das amostras preparadas, havendo erro significativo apenas para concentrações muito baixas de material tingido, inferiores a 5%. Como as partículas não são homogêneas, com tamanhos, formas e massas distintas, ao se adotar baixas concentrações de traçador, pode-se estar particularizando um conjunto de partículas muito distinto da média de todas as partículas, justificando os erros elevados para as baixas concentrações. Desta forma, o aumento da concentração favorece obter uma área média mais representativa da concentração utilizada.

A Figura 5.5 representa os dados mostrados na Tabela 5.2, podendo-se observar uma relação linear entre a concentração de traçador das amostras e a área reconhecida pelo *software*. A partir destes dados fez-se uma regressão linear que originou a seguinte equação:

$$C = 1,0268 \times A - 0,4381 \quad (5.1)$$

onde C é a concentração de traçador em porcentagem e A é a área identificada pelo *software*. Dado o elevado coeficiente de determinação (0,997) e que o coeficiente angular

Resultados e discussão

é aproximadamente unitário, entende-se que há grande adequação nesta técnica, sendo possível relacionar diretamente a área reconhecida e a concentração real.

Tabela 5.2. Resultados da análise de imagem fornecida pelo *software Lenseye* utilizando mistura de bagaço-farelo a 75% de umidade com várias concentrações de traçador tingido com Rodamina B.

Concentração de traçador (%)	Área reconhecida pelo software	Diferença Real - Reconhecido	Erro (%)
0	0	0	0
1	0,8	0,2	20,00
2	1,94	0,06	3,00
3	2,01	0,99	33,00
4	3,44	0,56	14,00
5	5,01	-0,01	-0,20
6	5,33	0,67	11,17
7	6,81	0,19	2,71
8	8,3	-0,3	-3,75
9	8,9	0,1	1,11
10	9,8	0,2	2,00
20	18,58	1,42	7,10
30	29,45	0,55	1,83
40	38,51	1,49	3,73
50	51	-1	-2,00
60	62,31	-2,31	-3,85
70	78,65	-8,65	-12,36
80	81,99	-1,99	-2,49
90	89,33	0,67	0,74
100	100	0	0,00

Resultados e discussão

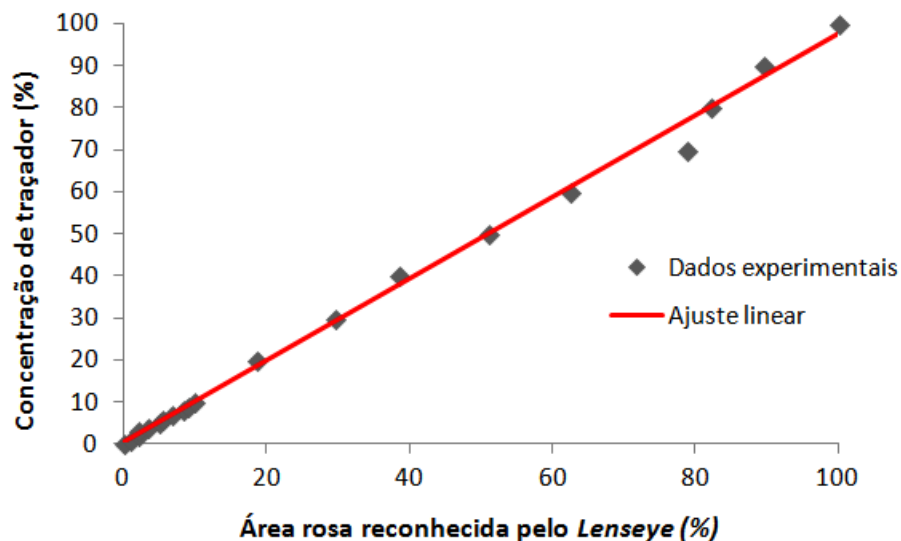


Figura 5.5. Concentração de traçador em função da área reconhecida pelo *software Lenseye*.

A Figura 5.6 ilustra a interpretação dada pelo *software Lenseye* às áreas tingidas da mistura bagaço-farelo.

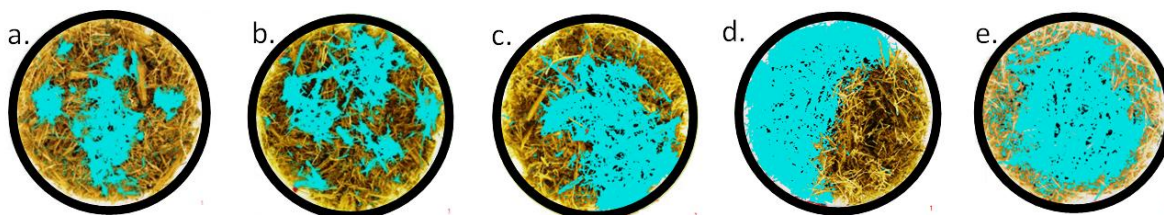


Figura 5.6. Amostras da mistura bagaço-farelo analisadas pelo *software* de (a) 5%, (b) 10%, (c) 20%, (d) 30% e (e) 60% de traçador Rodamina B.

Existem reportados na literatura vários trabalhos que empregaram a técnica de análise de imagens em sistemas particulados, alguns especificamente aplicados a tambores rotativos, dentre os quais encontram-se a medida de uma mistura binária de celulose granulada branca e verde (DAL GRANDE; SANTOMASO; CANU, 2008), determinação do comportamento de um leito de esferas de vidro como função da frequência de rotação do tambor, do grau de enchimento e do tamanho de partícula (SANTOMASO et al., 2003), determinação da cinética de mistura de xisto betuminoso no regime rolante (PUYVELDE et al., 1999), comparação dos regimes de escoamento e dos perfis de velocidade obtidos a partir de simulações em CFD com os obtidos experimentalmente para esferas de vidro (SANTOS et al., 2013), determinação da

Resultados e discussão

eficiência da mistura de partículas de diferentes tamanhos (DAUMANN; NIRSCHL, 2008), determinação da concentração de traçadores na mistura de arroz cozido (GRAJALES et al., 2012), processo de mistura obtido a partir de simulações em DEM com o obtido experimentalmente para esferas de plástico e madeira (SIMSEK et al., 2012), entre outros.

5.1.2 Mistura radial

Tambor rotativo com defletores: A Tabela 5.3 mostra que os ensaios com 3Kg de carga (0,4 grau de enchimento) alcançaram homogeneidade depois de 12 rotações do tambor. Considerou-se que a homogeneidade foi atingida quando a leitura da área de corante reconhecida pelo *software* foi igual a $30\% \pm 2\%$ para a região analisada. Observe-se que esta homogeneidade foi independente da frequência de rotação na qual foram realizados os experimentos e que a presença do tubo interno simulador não influenciou no número de rotações necessárias à mistura desejada das partículas (N_R). Os experimentos realizados com 4,5Kg de carga (0,5 grau de enchimento) mostraram boa homogeneidade após 15 rotações e para a carga de 6Kg (0,6 grau de enchimento) após 17 rotações (Ver os resultados de grau de enchimento no item 5.1.4.2). Como a fase passiva comporta-se como um corpo sólido, acredita-se que a mistura ocorra na fase ativa, ou seja, a camada adjacente à superfície livre das partículas e na interface entre as duas fases.

Schutyser et al. (2003) misturaram grãos de trigo em um tambor rotativo de 30cm de diâmetro interno e 40cm de comprimento, totalizando 28,3L de volume, empregando Rodamina WT como traçador e técnicas analíticas de avaliação da concentração, para graus de enchimento de 0,33 e 0,40, obtendo homogeneidade após 4 e 8 giros, respectivamente. Grajales et al. (2012) misturaram grãos de arroz cozido em um tambor rotativo de 30cm de diâmetro interno e 60cm de comprimento, para um total de 42,4L de volume, empregando corante para tecidos sintéticos como traçador, obtendo homogeneidade após 5, 9 e 11 rotações para os graus de enchimento de 0,23, 0,33 e 0,40, respectivamente. Comparando estes resultados com os do presente trabalho, observa-se que o N_R da mistura bagaço-farelo é maior, devido à natureza fibrosa e irregular das mesmas. Além disso, por se tratar de mistura de partículas binárias, ou seja, de tamanhos, densidades e formas diferentes, estas podem apresentar segregação ocasionando uma taxa de mistura menor (WILLIAMS; KHAN, 1973), embora não se tenha

Resultados e discussão

observado visualmente segregação para períodos de tempo inferiores a 17 minutos. A natureza elástica das partículas também contribui para uma mistura deficiente, pois nem toda a energia de rotação aplicada pela parede e pelos defletores é direcionada à movimentação das partículas, sendo parte dela empregada para a deformação das fibras.

Tabela 5.3. Concentração de traçador nos ensaios de mistura radial de partículas no tambor rotativo com defletores.

Experimento	Carga (Kg)	GE*	Tubo interno	Frequência (rpm)	N_R (Rotações)		
					12	15	17
1	3	0,4	com	1	29,76	-	-
2				4	31,55	-	-
3				7	29,4	-	-
4			sem	1	30,66	-	-
5				4	31,69	-	-
6				7	29,78	-	-
7	4,5	0,5	com	1	46,31	30,97	-
8				4	50,97	31,81	-
9				7	48,7	29,42	-
10			sem	1	52,08	31,49	-
11				4	39,44	29,85	-
12				7	45,58	29,87	-
13	6	0,6	com	1	-	45,79	32,01
14				4	-	51,58	30,48
15				7	-	46,51	31,76
16			sem	1	-	53,78	30,36
17				4	-	40,15	31,45
18				7	-	46,82	31,72

*GE: Grau de enchimento (ver item 5.1.4.2).

Tambor com agitação interna: A Tabela 5.4 mostra que os ensaios com 3Kg de carga alcançaram homogeneidade depois de 10 rotações. Observe-se que esta homogeneidade foi independente da velocidade de rotação na qual foram realizados os experimentos. Os experimentos realizados com 4,5Kg de carga mostraram boa homogeneidade após 13 rotações, e para a carga de 6Kg N_R foi igual a 15.

Resultados e discussão

Tabela 5.4. Concentração de traçador nos ensaios de mistura radial de partículas no tambor com agitação interna.

Experimento	Carga (Kg)	GE	Frequência (rpm)	N_R (Rotações)		
				10	13	15
1	3	0,4	1	29,67	-	-
2			4	31,53	-	-
3			7	29,4	-	-
4	4,5	0,5	1	46,91	32,01	-
5			4	40,85	30,62	-
6			7	49,7	29,17	-
7	6	0,6	1	-	20,24	29,18
8			4	-	41,82	31,43
9			7	-	39,56	31,02

Apesar de N_R para as partículas da mistura bagaço-farelo ser menor no tambor com agitação interna através de pás do que no tambor rotativo com defletores, observou-se visualmente problemas de má distribuição das partículas no interior do tambor que comprometem os resultados apresentados. Após finalizar o processo de mistura neste tambor, foram encontrados espaços vazios numa das extremidades do cilindro, como mostrado na Figura 5.7 e aglomeração de partículas em torno das pás. O ajuste do ângulo das pás do eixo móvel em relação a um plano de referência empregado nos ensaios foi o mesmo empregado por Eduardo (2010) para a movimentação de arroz, que apresentou distribuição uniforme ao final dos experimentos. Nagel et al. (2001) e Schutyser et al. (2002) afirmaram que o ressecamento de grãos de trigo, utilizados como substrato, durante o processo FES foi reduzido notavelmente quando as partículas no interior do reator foram misturadas com agitadores acoplados a um eixo central móvel dotado de pás, sendo que sobre as partículas foi aspergida uma fina camada de água, compensando a perda de calor por evaporação. Portanto, acredita-se que um estudo detalhado desta angulação possa resolver esta deficiência.



Figura 5.7. Má distribuição das partículas ao final do processo de mistura em tambor com agitação interna a través de pás.

5.1.3 Movimentação radial

5.1.3.1 Avaliação qualitativa

Santomaso, Olivi e Canu (2004) questionaram que os trabalhos publicados sobre mistura de partículas têm sido realizados com partículas ideais, ou seja, alta esfericidade, baixa aspereza superficial e distribuição mono-dispersa de tamanho de partícula, de modo que as aplicações práticas dos resultados publicados são discutíveis. Assim, o presente trabalho apresenta uma aplicação direta com mistura de bagaço de cana e farelo de trigo, para aplicação em FES, no qual as partículas são fibrosas, aderentes e de tamanhos variados.

Nos vídeos analisados, observou-se que, independentemente da velocidade de rotação, em presença do tubo simulador de aeração houve regiões de movimentação lentas em sua volta, indicando má circulação das partículas. O tempo que as partículas permaneceram nessa região foi maior quanto menor foi a frequência de rotação, o que pode ser corroborado pelas velocidades das partículas calculadas na análise quantitativa do presente trabalho. Os experimentos realizados em ausência do tubo simulador apresentaram boa movimentação em todas as regiões do leito, incluindo a região central. Finalmente, os experimentos realizados em presença do eixo central com pás apresentaram pontos estagnados em volta das pás, onde foram formados aglomerados de material aderidos às mesmas. É importante frisar que o número de rotações necessários a se obter a mistura desejada das partículas (N_R) não dependeu da presença ou ausência do tubo interno, de modo que a má circulação de partículas em torno do tubo

Resultados e discussão

deve ter sido compensada pelo aumento da velocidade em outras regiões da fase passiva, que deixa de se comportar como um corpo sólido em sua totalidade. Reforça ainda a percepção de que a mistura ocorra majoritariamente na fase ativa e que a provável mistura que venha a ocorrer nas vizinhanças do tubo interno não é expressiva.

No DVD em anexo a esta tese (Pasta: Avaliação Qualitativa) é apresentado um exemplo de movimentação para experimentos em ausência de tubo simulador, em presença de tubo simulador e com o eixo central com pás, onde é possível observar o comportamento anteriormente descrito.

5.1.3.2 Avaliação quantitativa

Na Figura 5.8 são apresentadas algumas das imagens empregadas para os cálculos geométricos dos ângulos de enchimento e dos ângulos de repouso dinâmico para o primeiro, segundo e terceiro graus de enchimento. Estes ângulos foram determinados com o auxílio do *software* gráfico *Corel Draw X3 versão 13*.

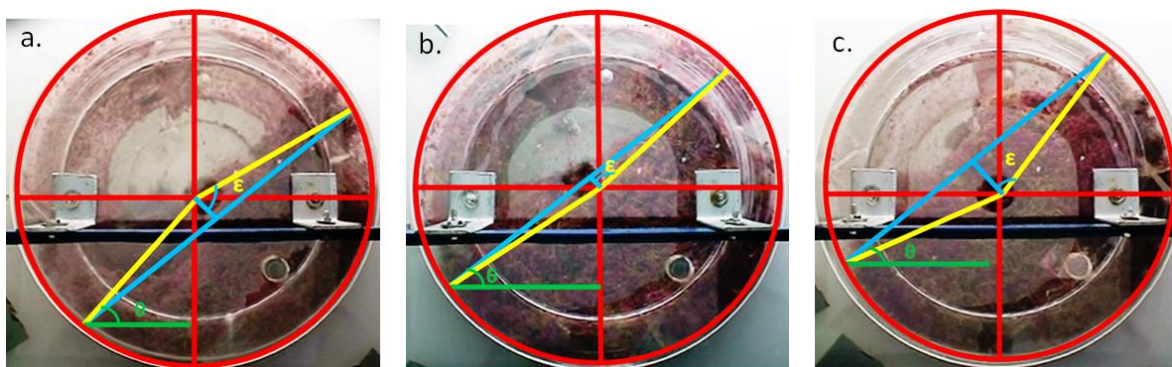


Figura 5.8. Imagens utilizadas no cálculo geométrico do ângulo de enchimento e do ângulo de repouso dinâmico para o (a) primeiro, (b) segundo e (c) terceiro grau de enchimento.

Na Tabela 5.5 são apresentados os resultados dos ângulos e os graus de enchimento obtidos. A média do ângulo de enchimento, ε , correspondente ao primeiro grau de enchimento, calculada para todos os ensaios, foi de $80,55 \pm 3,57^\circ$, resultando em um grau de enchimento, f , de $0,3963 \pm 0,0385$. Para o segundo grau de enchimento os valores de ε e f , foram $86,44 \pm 6,56^\circ$ e $0,5028 \pm 0,0318$, respectivamente, e para o

Resultados e discussão

terceiro grau de enchimento $80 \pm 5,0498^\circ$, e $0,6092 \pm 0,0543$, respectivamente. Resumindo, os três graus de enchimento empregados nesta pesquisa foram, 0,4, 0,5 e 0,6.

Tabela 5.5. Ângulos de enchimento, graus de enchimento e ângulos de repouso dinâmico.

Experimento	Carga (Kg)	Frequência (rpm)	Configuração interna	ε (Graus)	f	θ
1	3	1	Com tubo	78	0,3686	30
2			Sem tubo	86	0,4556	50
3			Eixo com pás	79	0,3793	-
4		4	Com tubo	83	0,4226	32
5			Sem tubo	84	0,4336	34
6			Eixo com pás	75	0,3371	-
7		7	Com tubo	83	0,4226	37
8			Sem tubo	79	0,3793	40
9			Eixo com pás	78	0,3686	-
10	4,5	1	Com tubo	88	0,4778	34
11			Sem tubo	88	0,5222	43
12			Eixo com pás	70	0,2866	-
13		4	Com tubo	88	0,5222	38
14			Sem tubo	88	0,5222	40
15			Eixo com pás	92	0,5222	-
16		7	Com tubo	91	0,5111	39
17			Sem tubo	89	0,5111	42
18			Eixo com pás	84	0,4336	-
19	6	1	Com tubo	78	0,6314	30
20			Sem tubo	80	0,6100	30
21			Eixo com pás	86	0,5444	-
22		4	Com tubo	87	0,5333	30
23			Sem tubo	77	0,6420	30
24			Eixo com pás	85	0,5554	-
25		7	Com tubo	72	0,6935	20
26			Sem tubo	76	0,6525	30
27			Eixo com pás	79	0,6207	-

Foram feitas comparações estatísticas entre as médias e as variâncias de todos os ensaios, incluindo-se os obtidos no tambor de pás giratórias, e os ensaios obtidos apenas no tambor giratório, através do teste Tukey para a comparação entre as médias e do teste de Levene para a comparação entre as variâncias, empregando-se o *software* Statistica 7.0 (Statsoft Inc.), a 95% de índice de significância. As análises indicam que as médias

Resultados e discussão

são distintas e que as variâncias são iguais. Como não há tendência definida para os valores de ε com o grau de enchimento, resolveu-se adotar o valor médio dos ângulos ε e dos graus de enchimento obtidos em todos os ensaios ao longo do restante deste texto.

Rodríguez, López e Sanroman (2006) recomendam trabalhar no máximo com um grau de enchimento de 0,30 para processos FES, já que consideram que a mistura das partículas em um tambor horizontal é ineficiente para valores acima dessa capacidade. Porém, nos experimentos realizados com 4,5 e 6Kg de material, que correspondem a 0,50 e 0,60 graus de enchimento, foi observada boa mistura radial das partículas. Outros autores como Schutyser et al. (2003) trabalharam com graus de enchimento de 0,33 e 0,40 obtendo bons resultados de mistura de partículas. Evidentemente, não somente a mistura das partículas deve ser levada em consideração na escolha do grau de enchimento do fermentador, sendo os aspectos de transferência de calor e massa igualmente importantes e ensaios específicos devem ser realizados para confirmar a melhor opção de enchimento, tendo como objetivo a ocupação máxima do fermentador.

A média do ângulo de repouso dinâmico, θ , para os experimentos realizados com o tubo interno foi de $32,2^\circ \pm 5,8^\circ$ e para os experimentos realizados sem o tubo interno foi de $37,7^\circ \pm 7,1^\circ$ (Tabela 5.5). O fato de o leito de partículas de mistura bagaço-farelo ter ângulo de repouso dinâmico maior do que o de outros leitos encontrados na literatura, como esferas de vidro de 3mm de diâmetro (23°) e esferas de sílica gel de 6mm de diâmetro (25°) (GRAJALES, 2010), deve-se às características das partículas, como forma, adesividade e heterogeneidade. Segundo McCabe, Smith e Harriot (1991) as partículas mais lisas e arredondadas possuem um menor ângulo de repouso estático, e partículas angulares, aderentes e de forma irregular, como a mistura bagaço-farelo, possuem um ângulo de repouso maior, fazendo com que o leito possua um ângulo de repouso dinâmico maior.

Experimentos de ângulo de repouso estático foram realizados, no qual a mistura bagaço-farelo foi colocada em uma caixa de acrílico com uma tampa lateral. Após o empacotamento do material, a tampa foi retirada esperando-se a queda das partículas para avaliar dito ângulo. O material não apresentou queda de partículas, como apresentado na Figura 5.9, não sendo possível determinar o ângulo de repouso estático, porém, confirmando que a forma das partículas influencia notavelmente na movimentação do leito.

Resultados e discussão



Figura 5.9. Sistema utilizado para determinar o ângulo de repouso estático da mistura bagaço-farelo (a) vista lateral e (b) vista frontal.

Regimes de movimentação: De acordo com a informação fornecida no Quadro 3.1 do capítulo de Revisão Bibliográfica deste texto, é necessário dispor do número de Froude e do grau de enchimento para classificar o regime de movimentação. Da Tabela 5.5 é possível notar que todos os graus de enchimento são maiores do que 0,1. Com estes valores e com os números de Froude encontrados na Tabela 5.6 tentou-se realizar a classificação recomendada por Mellmann (2001) para os regimes de movimentação. Porém, estas informações confrontadas com as avaliações visuais realizadas através dos vídeos produzidos no presente trabalho, encontraram-se algumas diferenças. No DVD em anexo a esta tese (Pasta: Regimes de escoamento) são apresentados alguns vídeos de movimentação selecionados para 6Kg de material, para os regimes de movimentação encontrados. Ressalte-se que as partículas empregadas por Mellmann foram areia grossa, areia normal e pedra calcária e que o tambor empregado não tinha defletores ou tubos internos. Pela classificação de Mellmann, os regimes de movimentação seriam o *Deslizante*, com o sub-regime *Oscilatório*, e *Cascata*, com o sub-regime *Rolante*.

No entanto, para todos os graus de enchimento e frequências de rotação avaliados foi observado que o movimento de partículas é realizado junto com a parede do tambor, ou seja, as partículas se elevam, com ajuda dos defletores e da própria parede do tambor, até terem energia potencial suficiente para que a camada superficial desça como um bloco ou aglomerado. Porém, diferentemente do observado por Mellmann, a queda não se dá como em uma única porção em forma de cunha, no sub-regime *Oscilatório*, ou como uma camada de partículas movendo-se continuamente, no sub-regime *Rolante*. Nos ensaios aqui realizados, os aglomerados descem de forma periódica, porém dentro dessa

Resultados e discussão

periodicidade, o tamanho dos blocos variam: primeiro caem dois blocos pequenos e depois um bloco de maior tamanho.

Assim, de acordo com estas observações, não é possível incluir este tipo de movimentação dentro dos regimes estabelecidos por Mellman (2001), sendo considerado um novo regime para partículas fibrosas, angulares, aderentes e de forma irregular. Observou-se ainda que com o aumento do número de Froude e do grau de enchimento há um aumento do tamanho dos blocos formados pelas partículas do leite.

Tabela 5.6. Sub-regimes de escoamento para todos os níveis de experimentação nos experimentos de movimentação de bagaço-farelo a 75% de umidade.

Exp	Carga (Kg)	Tubo interno	Frequência (rpm)	Frequência (rps)	ω (rad/s)	Fr	Sub-Regime teórico	Sub-Regime real
1	3	com	1	0,0167	0,1047	0,00017	Oscilatório	QUEDA EM BLOCOS
2			4	0,0667	0,4189	0,00268	Rolante	
3			7	0,1167	0,7330	0,00821	Rolante	
4		sem	1	0,0167	0,1047	0,00017	Oscilatório	
5			4	0,0667	0,4189	0,00268	Rolante	
6			7	0,1167	0,7330	0,00821	Rolante	
7	4,5	com	1	0,0167	0,1047	0,00017	Oscilatório	
8			4	0,0667	0,4189	0,00268	Rolante	
9			7	0,1167	0,7330	0,00821	Rolante	
10		sem	1	0,0167	0,1047	0,00017	Oscilatório	
11			4	0,0667	0,4189	0,00268	Rolante	
12			7	0,1167	0,7330	0,00821	Rolante	
13	6	com	1	0,0167	0,1047	0,00017	Oscilatório	
14			4	0,0667	0,4189	0,00268	Rolante	
15			7	0,1167	0,7330	0,00821	Rolante	
16		sem	1	0,0167	0,1047	0,00017	Oscilatório	
17			4	0,0667	0,4189	0,00268	Rolante	
18			7	0,1167	0,7330	0,00821	Rolante	

Resultados e discussão

Velocidades: As regiões delimitadas para o cálculo das velocidades, nos experimentos realizados em presença ou ausência de tubo simulador e com eixo central foram indicadas na Figura 4.16 e as velocidades das partículas obtidas nas diferentes condições de operação são apresentadas nas Tabelas 5.7 e 5.8. Observe-se de maneira geral que as maiores velocidades foram alcançadas nas altas frequências de rotação para as três regiões de análise.

Note-se da Tabela 5.7 que nas Regiões 2, as velocidades foram 0,0166, 0,0170 e 0,0173 m/s para carga de 3Kg e 1rpm do tambor com tubo, sem tubo e com o eixo central com pás, respectivamente. O valor teórico calculado a partir da definição de velocidade angular para esta região foi de 0,0157 m/s , constatando-se um erro máximo de 10% na determinação das velocidades das partículas nesta região. Para a mesma frequência de rotação do tambor, mas para 4,5Kg de carga foram obtidos valores similares de 0,0160, 0,0161 e 0,0163 m/s para o tambor com tubo, sem tubo e com o eixo central com pás, respectivamente, com um erro máximo de 4% e para 6Kg de carga foram 0,0163, 0,0160 e 0,0152 m/s , com um erro máximo próximo a 4%. O mesmo comportamento foi observado para 4 e 7rpm para todas as cargas analisadas. Levando-se em consideração a dificuldade de realizar medições individuais para este tipo de partículas, esses erros podem ser considerados aceitáveis.

Da Tabela 5.8 observa-se que a 1rpm de frequência as velocidades das partículas na região de queda foram próximas entre si para as cargas de 3, 4,5 e 6Kg, sendo que a média delas foi de $0,0157m/s \pm 0,0006m/s$, um coeficiente de variação (CV) de 3,8%, sendo este valor médio igual ao valor teórico da velocidade da parede do tambor. Para 4rpm, as velocidades na mesma região foram $0,0584m/s \pm 0,0044m/s$ ($CV = 7,5\%$), sendo estas muito próximas à velocidade teórica das partículas na região de subida do tambor (0,0628 m/s). Analogamente, para 7rpm as velocidades das partículas para todas as cargas na região de queda foram de $0,1010m/s \pm 0,0141m/s$, ($CV = 13,9\%$) onde a velocidade teórica na região de subida foi de 0,11 m/s .

Resultados e discussão

Tabela 5.7. Velocidades das partículas na região de subida do leito (região 2 da Figura 4.16).

Experimento	Carga (Kg)	Frequência (rpm)	Configuração interna	Velocidade de subida (m/s)		
				Experimental	Teórica	Erro
1	3	1	Com tubo	0,0166	0,0157	-5,60
2			Sem tubo	0,0170	0,0157	-8,45
3			Eixo central	0,0173	0,0157	-10,34
4		4	Com tubo	0,0658	0,0628	-4,78
5			Sem tubo	0,0655	0,0628	-4,24
6			Eixo central	0,0681	0,0628	-8,31
7		7	Com tubo	0,1124	0,1100	-2,20
8			Sem tubo	0,1190	0,1100	-8,27
9			Eixo central	0,1163	0,1100	-5,75
10	4,5	1	Com tubo	0,0160	0,0157	-2,00
11			Sem tubo	0,0161	0,0157	-2,59
12			Eixo central	0,0163	0,0157	-3,75
13		4	Com tubo	0,0575	0,0628	8,52
14			Sem tubo	0,0592	0,0628	5,82
15			Eixo central	0,0581	0,0628	7,46
16		7	Com tubo	0,0926	0,1100	15,76
17			Sem tubo	0,1042	0,1100	5,22
18			Eixo central	0,0963	0,1100	12,42
19	6	1	Com tubo	0,0163	0,0157	-3,68
20			Sem tubo	0,0160	0,0157	-1,63
21			Eixo central	0,0152	0,0157	3,10
22		4	Com tubo	0,0731	0,0628	-16,33
23			Sem tubo	0,0720	0,0628	-14,65
24			Eixo central	0,0704	0,0628	-12,04
25		7	Com tubo	0,1075	0,1100	2,20
26			Sem tubo	0,1002	0,1100	8,91
27			Eixo central	0,1000	0,1100	9,02

Resultados e discussão

Tabela 5.8. Velocidades das partículas nas regiões de queda e centro do leito (regiões 1 e 3 da Figura 4.16).

Experimento	Carga (Kg)	Frequência (rpm)	Configuração interna	Velocidade (m/s)	
				queda	Centro
1	3	1	Com tubo	0,0165	0,0057
2			Sem tubo	0,0161	0,0136
3		4	Com tubo	0,0629	0,0069
4			Sem tubo	0,0650	0,0556
5		7	Com tubo	0,1177	0,0084
6			Sem tubo	0,1150	0,0980
7	4,5	1	Com tubo	0,0157	0,0040
8			Sem tubo	0,0158	0,0136
9		4	Com tubo	0,0571	0,0049
10			Sem tubo	0,0559	0,0484
11		7	Com tubo	0,0885	0,0064
12			Sem tubo	0,0841	0,0710
13	6	1	Com tubo	0,0147	0,0031
14			Sem tubo	0,0151	0,0143
15		4	Com tubo	0,0538	0,0042
16			Sem tubo	0,0558	0,0440
17		7	Com tubo	0,1064	0,0052
18			Sem tubo	0,0943	0,0855

A Figura 5.10 sintetiza estas informações, onde se observa um comportamento linear crescente da velocidade das partículas da superfície com o aumento da rotação do tambor. O fato de o desvio relativo aumentar com o aumento da frequência de rotação deve-se ao aumento da instabilidade do leito, que passa a sofrer maior influência da presença do tubo imerso e da maior dificuldade em se medir estas velocidades através da técnica adotada. Possivelmente, com câmeras com alta velocidade de captura de imagem este problema seria minimizado. Também é relevante o fato da velocidade da parede do tambor, aqui denominada de teórica, ser muito próxima às velocidades calculadas na superfície, indicando que, apesar de não terem sido observados perfis de velocidade de partículas definidos, há boa circulação das partículas na superfície, sendo que a vazão mássica das partículas que chegam à altura de queda deve ser igual às que descem pela superfície. Assim, estudos posteriores poderão descrever melhor estas áreas de movimentação, as quais serão importantes para os processos de troca de calor e de massa entre as partículas da camada ativa com o ar no espaço vazio acima delas e com e as partículas da camada passiva.

Resultados e discussão

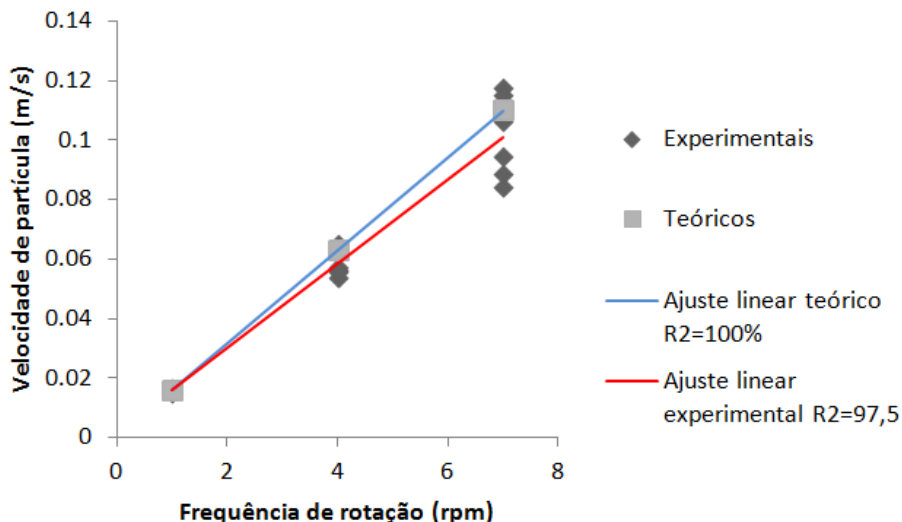


Figura 5.10. Velocidade das partículas na superfície do leito (região 1 da Figura 4.19).

Dado que a movimentação de partículas observada não se encontra dentro dos regimes de escoamento definidos por Mellmann (2011) há uma grande dificuldade para realizar uma comparação direta com a literatura, pois a maioria de trabalhos reportados incluem partículas regulares com perfis de velocidades definidos. A título de exemplo, Orpe e Khakhar (2001) indicaram que para baixos números de Froude o perfil de velocidade de partículas na camada superficial é simétrico para o movimento de partículas rolante. Também sugeriram que a espessura dessa camada aumenta com o número de Froude e com o aumento da relação d/D_c (diâmetro de partícula/diâmetro do cilindro). Neste caso, onde as partículas foram fibrosas e irregulares, foi observado o aumento do bloco superficial em queda com o número de Froude, porém não foi observada simetria de movimentação na mesma. O padrão de comportamento observado foi o de menores velocidades de partícula para as maiores cargas. Também se observou que as amostras da região central analisada são mais lentas ao lado do tubo interno simulador do que as que foram realizadas em ausência do tubo. Porém, a baixa circulação das partículas nesta região, neste caso, pode ser compensada pelo fato de que o tubo interno fornecerá ar ao sistema FES, favorecendo a remoção de calor metabólico gerado pelos microrganismos e as trocas gasosas no biorreator de aço-inox.

Resultados e discussão

5.1.4 Mistura axial

Tambor rotativo com defletores: Tanto na presença quanto na ausência do tubo interno foi obtido o mesmo tempo de homogeneização axial, portanto os resultados discutidos aplicam-se a ambos os sistemas.

O número de rotações necessárias à homogeneização axial (N_A) das amostras é apresentado na Tabela 5.9. Os resultados mostraram que a mistura alcançou a homogeneidade após 480, 540 e 630 rotações para 3Kg de carga a 1, 4 e 7rpm, respectivamente; 610, 680 e 770 giros para 4,5Kg de carga e 750, 800 e 945 rotações para 6Kg. Este dados também podem ser vistos na Figura 5.11, onde constata-se que há uma tendência linear crescente de N_A tanto com a frequência de rotações como com o aumento do grau de enchimento e que as curvas ajustadas são praticamente paralelas entre sí, em todos os casos, indicando um comportamento bastante regular que poderá ser modelado no futuro.

Tabela 5.9. Número de rotações necessários à homogeneização axial (N_A) da mistura bagaço de cana-farelo de trigo no tambor rotativo com defletores.

Frequência (rpm)	Carga (Kg)		
	3	4,5	6
1	480	610	750
4	540	680	800
7	630	770	945

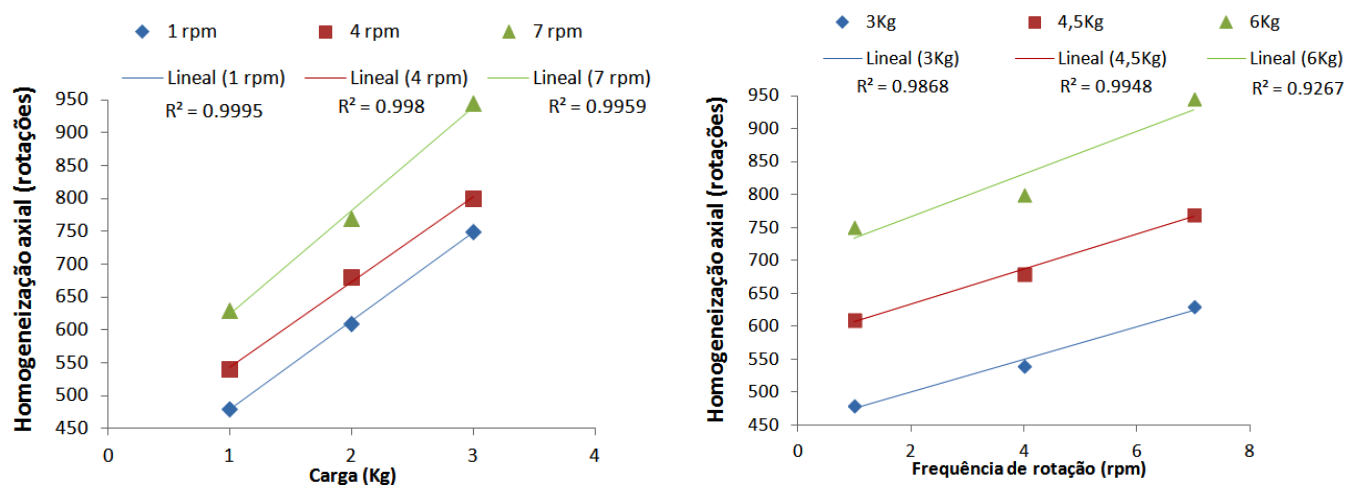


Figura 5.11. Rotações necessárias à homogeneização axial (N_A) em função de (a) a carga e (b) a frequência de rotação do tambor.

Resultados e discussão

O tempo decorrido para que as três cargas da mistura bagaço-farelo alcançassem a homogeneidade (t_A) são apresentados na Tabela 5.10. Este é o resultado da divisão do número de revoluções N_A pela frequência de rotação do tambor. Os tempos t_A foram 480, 135 e 90 minutos para 3Kg de carga a 1, 4 e 7rpm, respectivamente; 610, 170 e 110 minutos para 4,5Kg de carga e 750, 200 e 135 minutos para 6Kg.

Tabela 5.10. Tempo em minutos necessário para homogeneizar axialmente a mistura bagaço-farelo no tambor rotativo com defletores.

Frequência (rpm)	Grau de enchimento		
	0,4	0,5	0,6
1	480	610	750
4	135	170	200
7	90	110	135

Dado que não foram encontradas informações na literatura sobre partículas similares às deste trabalho, foram feitas comparações com resultados de autores que operaram com sistemas ou condições operacionais similares às do presente trabalho. Marsh et al. (2000), encontraram homogeneidade de partículas de farelo de trigo após 180 minutos em um tambor rotativo de 80cm de comprimento, 56cm de diâmetro interno e 5rpm de frequência de rotação, valores próximos aos resultados obtidos na frequência de 4rpm para os três graus de enchimento avaliados. Tallon e Davies (2008) reportaram um total de 800 revoluções para homogenizar areia carregada com ferro em um tambor de 1m de comprimento e 1m de diâmetro, a 1,47rpm e grau de enchimento de 0,17, quase três vezes o diâmetro e duas vezes o comprimento do tambor empregado neste estudo, cujos resultados são próximos aos obtidos para o grau de enchimento de 0,6. A movimentação axial pode estar influenciada pela segregação das partículas de farelo pois Hong et al.(2001) concluíram que a segregação radial de partículas é a razão para obter tempos extremamente longos de dispersão axial. Embora neste trabalho não tenha sido realizado um estudo de segregação, considera-se a possibilidade que esta contribuiu para os prolongados tempos de mistura axial, não sendo um inconveniente para o objetivo geral do trabalho, pois os processos fermentativos foram operados com curtos períodos de rotação do tambor, desta forma a segregação foi desconsiderada.

A partir das concentrações experimentais e por meio da solução em série do modelo difusivo (Equação 3.12 apresentada no capítulo *Revisão Bibliográfica*) truncada

Resultados e discussão

no primeiro termo, foram calculados os coeficientes de dispersão axial (D) para cada condição de operação, cujos resultados são mostrados na Tabela 5.11.

Tabela 5.11. Coeficientes de Dispersão Axial, D , da mistura bagaço de cana-farelo de trigo para o tambor rotativo com defletores (cm^2/min).

Frequência (rpm)	Carga (Kg)		
	3	4,5	6
1	2,42	1,98	1,64
4	13,14	9,25	8,64
7	19,87	14,56	13,78

Destes resultados, pode-se observar que conforme há aumento da carga de partículas, há diminuição no valor de D , indicando mais tempo para atingir a mistura desejada e quando há elevação da frequência de rotação do tambor, os valores de D aumentam. Marsh et al. (2000) determinaram que o coeficiente de dispersão axial, D para farelo de trigo foi de $9,15\text{cm}^2/\text{min}$ para experimentos realizados a 5rpm, valor similar ao encontrado em este estudo para 0,5 de grau de enchimento (4,5Kg de carga) a 4rpm.

Os coeficientes de Dispersão axial, D variam linearmente com a frequência de rotação como apresentado na Figura 5.12, sendo os coeficientes de regressão 98,3%, 99,2% e 99,2% para 3, 4,5 e 6Kg de carga (0,4, 0,5 e 0,6 graus de enchimento), respectivamente.

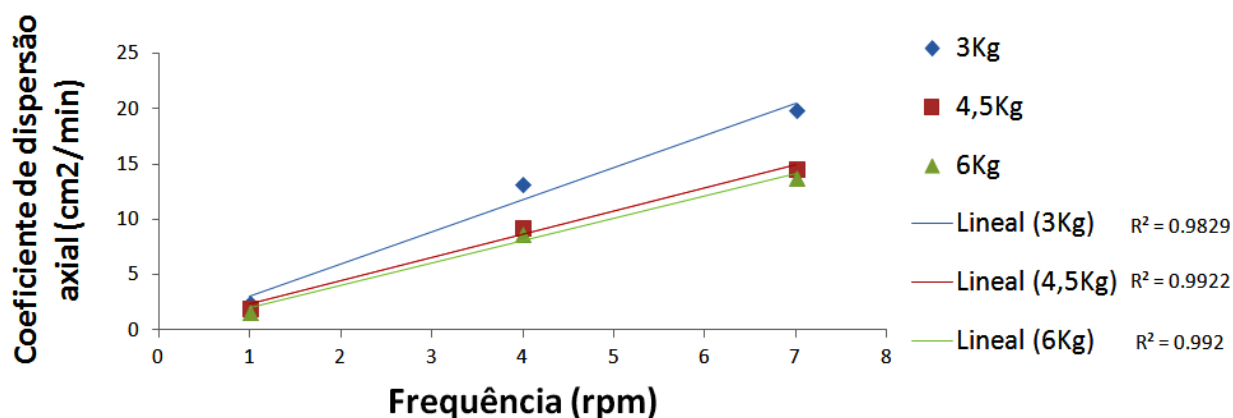


Figura 5.12. Coeficiente de dispersão axial na mistura bagaço de cana-farelo de trigo em função da frequência de rotação no tambor rotativo com defletores.

Resultados e discussão

Na Tabela 5.12 são apresentadas as concentrações simuladas para o primeiro grau de enchimento 0,4 (carga de 3Kg), 1rpm e sem tubo interno, comparadas com as concentrações determinadas experimentalmente e o erro entre elas para as diferentes posições onde foram obtidas as medidas. Todas as cargas e frequências de rotação foram simuladas na mesma rotina numérica em MATLAB para os diferentes coeficientes de dispersão e comparadas com os resultados experimentais.

Tabela 5.12. Concentrações experimentais (exp) e simuladas para 3Kg de carga, 1rpm e sem tubo interno.

t (min)	z = 7,5cm			z = 17,5cm			z = 29,5cm			z = 43cm			z = 52,5cm		
	exp	simuladas	erro	exp	simuladas	erro	exp	simuladas	erro	exp	Simuladas	erro	exp	simuladas	erro
0	100	100	-	60,0	56,3	6,2	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-	0,0	0,0	-
15	89,4	87,1	2,6	57,1	54,1	5,3	10,9	12,6	-15,6	1,0	0,6	40,0	0,0	0,0	-
29	80,4	78,6	2,2	54,8	52,9	3,5	15,7	19,4	-23,6	3,1	2,9	6,5	0,5	0,4	20,0
45	70,6	72,1	-2,1	50,6	51,7	-2,2	20,8	23,4	-12,5	5,0	5,8	-16,0	1,0	1,3	-30,0
62	67,3	66,9	0,6	50,2	50,4	-0,4	26,3	26,1	0,8	9,7	8,4	13,4	2,0	2,8	-40,0
76	62,0	62,7	-1,1	49,7	49,0	1,4	25,0	27,8	-11,2	10,1	10,7	-5,9	2,7	4,4	-63,0
90	56,5	59,1	-4,6	48,3	47,6	1,4	28,1	29,0	-3,2	11,1	12,8	-15,3	4,6	6,3	-37,0
105	56,5	56,1	0,7	44,9	46,2	-2,9	29,9	29,7	0,7	16,0	14,6	8,8	5,5	8,1	-47,3
120	55,9	53,5	4,3	43,5	44,9	-3,2	30,3	30,2	0,3	16,6	16,2	2,4	7,4	9,9	-33,8
135	51,6	51,2	0,8	43,3	43,7	-0,9	35,6	30,6	14,0	19,0	17,6	7,4	9,1	11,6	-27,5
155	50,6	49,2	2,8	42,2	42,5	-0,7	28,8	30,8	-6,9	20,2	18,8	6,9	13,8	13,2	4,3
165	43,8	47,4	-8,2	42,1	41,5	1,4	30,9	30,9	0,0	20,4	20,0	2,0	15,3	14,8	3,3
180	46,3	45,9	0,9	40,2	40,5	-0,7	31,0	31,0	0,0	21,4	21,0	1,9	17,7	16,2	8,5
198	40,9	43,2	-5,6	39,3	39,7	-1,0	30,0	31,0	-3,3	22,3	21,9	1,8	17,0	17,5	-2,9
223	42,5	41,0	3,5	38,8	38,1	1,8	31,1	31,1	0,0	24,8	23,5	5,2	18,3	19,8	-8,2
261	37,5	40,0	-6,7	35,5	36,3	-2,3	32,0	31,0	3,1	25,1	25,3	-0,8	22,2	22,5	-1,4
280	36,0	38,4	-6,7	34,5	35,8	-3,8	31,0	31,0	0,0	23,1	25,8	-11,7	25,7	23,3	9,3
411	33,1	34,4	-3,9	34,0	33,2	2,4	30,9	30,9	0,0	28,7	28,5	0,7	28,6	27,3	4,5
470	33,0	33,2	-0,6	32,3	32,4	-0,3	30,9	30,9	0,0	29,4	29,3	0,3	28,7	28,4	1,0
535	32,2	32,3	-0,3	31,7	31,8	-0,3	30,9	30,9	0,0	30,0	29,9	0,3	29,5	29,3	0,7
655	31,7	31,8	-0,3	31,4	31,5	-0,3	30,9	30,9	0,0	30,2	30,2	0,0	29,9	29,8	0,3

Na Figura 5.13 são apresentadas as concentrações obtidas experimentalmente e as simuladas para a condição anteriormente mencionada, onde pode-se constatar a grande proximidade entre os valores simulados e os experimentais..

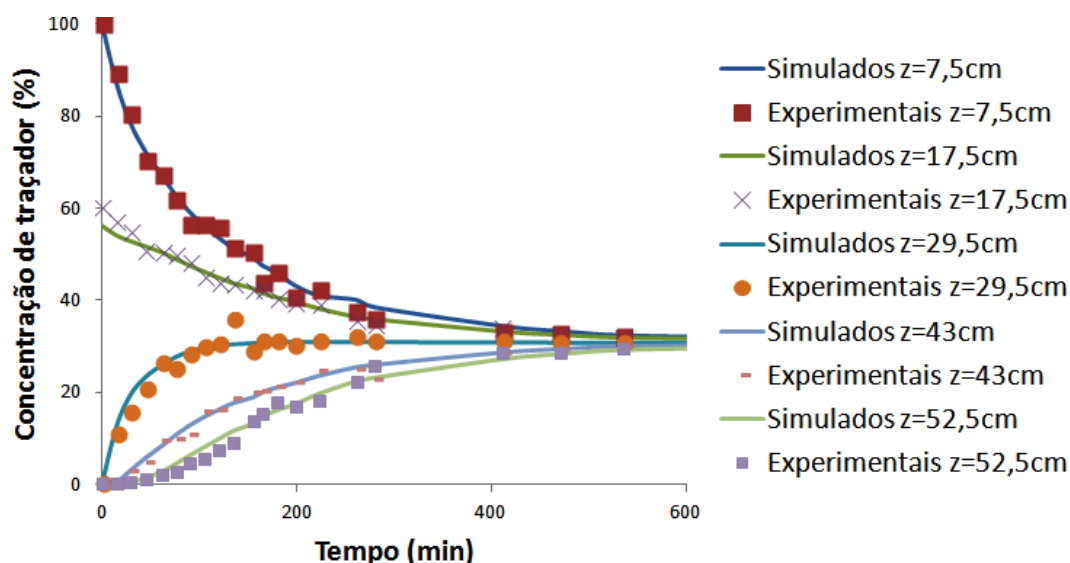


Figura 5.13. Concentração longitudinal de traçador, calculada através do modelo de dispersão axial e obtida experimentalmente, para 0,4 grau de enchimento (3Kg de carga), 1pm e sem tubo interno para o tambor rotativo com defletores.

Tambor com agitação interna: Os tempos de homogeneidade axial (t_A) obtidos no tambor com agitação interna através de pás são significativamente mais baixos quando comparados aos obtidos no tambor de parede rotativa com defletores, como apresentado na Tabela 5.13. Os valores de t_A foram 5 minutos para 3Kg, 7 minutos para 4,5Kg e 10 minutos para 6Kg. É necessário ressaltar que as medidas de concentração de traçador foram obtidas unicamente em $z = 0$, ou seja, na tampa frontal do equipamento. Estes tempos, quando expressos em números de rotações necessárias para a homogeneização axial, são 35 giros para 3Kg, 49 para 4,5Kg e 70 para 6Kg.

Resultados e discussão

Tabela 5.13. Tempo necessário, em número de rotações, à homogeneização axial da mistura bagaço de cana-farelo de trigo no tambor com agitação interna a 7rpm.

Carga (Kg)	Tambor com agitação interna	Tambor rotativo com defletores
3	5	90
4,5	7	110
6	10	135

No entanto, ao final do experimento, na descarga de material do tambor foi observada uma visível heterogeneidade entre as partículas tingidas e as demais, como apresentado na Figura 5.14 para o material presente no fundo do tambor, ainda que na tampa frontal a concentração de partículas tingidas tenha sido de 30%. Tal efeito não foi observado após os ensaios realizados no tambor com rotativo com defletores, obtendo-se boa mistura das partículas em todo o comprimento do tambor. Desta forma, acredita-se que a mistura não foi completa, de modo que não foram calculados os coeficientes de dispersão axial nem as concentrações foram simuladas. Novamente, antes de descartar o uso desta configuração do tambor de pás giratórias para um processo fermentativo empregando estas partículas, seria necessário estudo criterioso sobre o efeito da angulação e formato das pás sobre a mistura das partículas, o que foge ao escopo deste trabalho.



Figura 5.14. Aspecto de uma amostra de partículas ao final do processo de mistura pela técnica de traçadores coloridos em tambor com agitação interna demonstrando heterogeneidade da concentração de partículas tingidas.

5.2 ANÁLISE DA CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA PELO LEITO DE PARTÍCULAS SÓLIDAS

5.2.1 Capacidade máxima de retenção de água

As umidades finais da mistura bagaço-farelo após a aspersão de água até a queda da primeira gota sobre o papel toalha se encontram na Tabela 5.14. Note-se que a umidade máxima retida pelo leito tem um valor médio de $87,3\% \pm 1,4\%$ para o meio com umidade inicial de 8% e de $88,18\% \pm 2,04\%$ para o meio com umidade inicial de 50%, ou seja, a estrutura do bagaço-farelo foi pouco alterada durante a secagem, pois os dois valores de retenção de água são muito próximos entre si. Entende-se retenção de água pelo leito como a água absorvida pelas partículas e a água retida entre as partículas por capilaridade. Para os experimentos fermentativos para a produção de celulasas a partir da mistura de bagaço de cana com farelo de trigo, empregando-se o fungo *Myceliophthora thermophila* I1D3b requer-se que a umidade do meio seja em torno de 75% (ZANELATO, 2011), de modo que os altos valores de retenção obtidos são inadequados aos ensaios fermentativos devido à presença da água livre intersticial. Para os ensaios de aspersão de água no tambor rotativo com defletores, este resultado representou o limite de aspersão de água de modo a evitar que água escoasse entre as partículas.

Tabela 5.14. Quantidade máxima de retenção de água no leito de bagaço-farelo.

Ensaio	Umidade máxima retida pelo leito bagaço-farelo (%) Umidade inicial 8%	Umidade máxima retida pelo leito bagaço-farelo (%) Umidade inicial 50%
1	88,12	85,46
2	86,24	89,71
3	86,54	88,27
4	89,34	90,5
5	86,27	86,95
Média	87,30	88,18
Desvio padrão	1,38	2,04

Resultados e discussão

5.2.2. Experimentos preliminares

Inicialmente, a solução de Rodamina foi aspergida continuamente para 3, 4,5 e 6Kg de material, à uma vazão de 2500mL/min e foi observado excesso de água líquida, não aderida ao meio poroso, a qual escoou junto à parede lateral do tambor, causando vazamento através das tampas frontais. Também se constatou água nos interstícios entre as partículas, um efeito indesejado para FES, o que significa que a mistura bagaço-farelo não consegue absorver água suficiente para elevar sua umidade inicial de 50% para 75% em curto período de tempo. Na fotografia da Figura 5.15 mostra-se a solução de Rodamina que permaneceu nos interstícios das partículas quando a solução foi aspergida continuamente. Tal fenômeno foi detectado para os três graus de enchimento avaliados.

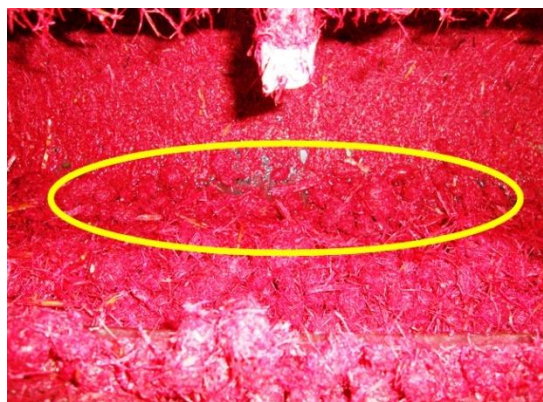


Figura 5.15. Solução de Rodamina B 0,02% na superfície das partículas quando aspergida continuamente.

Quando foram aspergidos 50mL a cada intervalo de tempo (12, 15 e 17 minutos para cada grau de enchimento), observou-se que as partículas tinham, em média, 58% de umidade ao final do ensaio, indicando que parte da água adicionada não foi incorporada ao leite, provavelmente devido à evaporação, uma vez que estes ensaios foram longos, de cerca de 270min. Tal efeito foi observado para os três graus de enchimento avaliados. Quando aspergidos 450mL por intervalo de tempo, a cada 12, 15 e 17 minutos para as três cargas, sendo que o tambor girava a 1rpm, observou-se que nem toda a solução foi retida pelas partículas, havendo escoamento de água livre junto as paredes do tambor. Assim, decidiu-se trabalhar com volumes intermediários entre 50mL e 450mL.

Resultados e discussão

Nos ensaios realizados com estes volumes intermediários, partiu-se de umidades aproximadas de 50%, a qual corresponde ao material recebido dos fornecedores de bagaço de cana e farelo de trigo, e constatou-se que a retenção da água nas partículas dependeu do grau de enchimento do tambor da seguinte maneira: para 3Kg de carga, aspersões de 100, 150 e 200mL foram distribuídas uniformemente nas partículas, obtendo-se umidade final de $73\% \pm 1,33\%$. Para 4,5Kg de carga, aspersões de 150, 200, 250 e 300mL, com umidade final de $70,64\% \pm 1,34\%$ e para 6Kg de carga, aspersões de 200, 250, 300, 350 e 400mL com umidade final de $68,95\% \pm 2,29\%$. Note-se que em nenhuma das alternativas a umidade atingiu 75% como estava previsto, sendo a situação mais drástica para o maior grau de enchimento. Assim, decidiu-se incluir no arranjo experimental um tubo dotado com cinco aspersores agrícolas para tentar distribuir melhor a umidade para grandes cargas. Deste modo, foram realizados experimentos com três e com cinco aspersores, sendo esta uma das variáveis do planejamento estatístico de experimentos conforme descrição adiante.

5.2.3 Experimentos de retenção de água

As médias e os desvios padrões das umidades coletadas nas cinco posições da superfície de partículas e em uma camada próxima da parede do tambor são apresentadas na Tabela 5.15. Note-se que, de forma geral, as umidades obtidas para os experimentos realizados com os maiores volumes de aspersão para cada carga foram mais próximas de 75%. Possivelmente, quando aspergidos os menores volumes de Rodamina B houve ressecamento das partículas, pois o tempo de experimentação foi maior e a umidade relativa de São José do Rio Preto, na época em que foram realizados os experimentos, foi muita baixa, favorecendo a perda de água do meio para o ambiente. As imagens analisadas através do *software* *Lenseye* não mostraram diferença na cor, pois todas foram reconhecidas como 100% de área rosa.

Resultados e discussão

Tabela 5.15. Valores médios de umidade no leito de bagaço-farelo após a aspersão de Rodamina B.

Carga (Kg)	Vazão de aspersão (mL/min)	Quantidades por intervalo (mL)	Aspersores	Umidades médias (%)	Desvio padrão
3	1500	100	3	58,48	2,99
			5	73,63	3,81
		200	3	72,73	3,84
			5	75,04	1,88
	2500	100	3	73,71	4,19
			5	70,91	1,78
		200	3	68,29	1,00
			5	76,66	1,75
4,5	1500	150	3	66,45	3,84
			5	71,85	6,46
		300	3	75,78	4,72
			5	70,29	5,69
	2500	150	3	78,47	4,48
			5	76,24	1,72
		300	3	75,89	2,43
			5	71,30	3,54
6	1500	200	3	69,80	4,22
			5	71,23	2,46
		400	3	73,95	5,32
			5	72,34	4,80
	2500	200	3	70,35	4,38
			5	73,28	2,33
		400	3	74,88	3,00
			5	71,66	3,85

Porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa de acordo com os resultados da análise de variância realizada através do *software* estatístico *Minitab 16* (*Minitab Inc.*) apresentada no Quadro 5.1. Esta análise foi realizada incluindo quatro fatores: carga, vazão de aspersão, volume por intervalo de aspersão e número de aspersores, com 3, 2, 2 e 2 níveis, respectivamente. O modelo avaliado foi um modelo linear com interação entre dois e três fatores, com um nível de confiança de 95%.

A ANOVA evidencia uma grande dispersão dos resultados, tornando o modelo não preditivo. Ainda assim, é possível inferir que houve diferença estatisticamente significativa entre as vazões de aspersão de solução de Rodamina B e a carga, sendo que a maior homogeneidade na umidade do leito de partículas foi obtida para a maior vazão de aspersão, 2500mL/min para cada carga e que não houve diferença para as demais variáveis.

Resultados e discussão

Quadro 5.1. Análise de variância nos experimentos de retenção de água.

Modelo linear geral: Umidades vs. Aspersores, carga, vazão e intervalo de aspersão.						
Fonte	GL	SC Sec.	SC Ajust.	CM ajust.	F	P
Aspersor	1	0,776	0,776	0,776	0,56	0,465
Carga	2	9,366	9,366	9,366	3,36	0,057
Vazão	1	10,124	10,124	10,124	7,27	0,015
Intervalo	1	0,029	0,029	0,029	0,02	0,886
Erro	18	25,071	25,071	1.393		
Total	23	45,366				

S=1,18018 Rquad =44,74% Rquad.(ajustado)=29.39%

As informações fornecidas são úteis para balizar os ensaios posteriores de análise térmica e de fermentação. Assim, de acordo com esta apreciação, na etapa de análise térmica do sistema e fermentação no biorreator de aço-inox foram selecionadas as seguintes condições de operação: 200, 300 e 400mL de aspersão de água por intervalo para 3, 4,5 e 6Kg, respectivamente, três aspersores e 2500mL/min de vazão. Estas condições foram importantes nas etapas de inoculação da suspensão de esporos e aspersão da solução nutriente sobre o substrato e durante a análise térmica para arrefecimento da temperatura. Na primeira etapa, durante a aspersão da solução nutriente e da suspensão de esporos, não há limitação no número de rotações ou de frequência de rotação que possa ser aplicada ao tambor, de modo que basta que haja homogeneidade na sua distribuição. Na segunda etapa, durante a fermentação, a água age como um eficiente método de controle de temperatura, pois permite a remoção de calor do sistema através do calor necessário à evaporação da água (NAGEL, 2002; SCHUTYSER et al., 2003). No entanto, devido à presença do micélio fúngico, é recomendável que o número e a frequência de rotações sejam os mínimos possíveis à obtenção da homogeneidade para evitar danos ao microrganismo que possam comprometer a síntese das enzimas.

Schutyser et al. (2003) avaliaram a distribuição de umidade em grãos de trigo, após a aspersão de solução Rodamina WT em um sistema de dois aspersores. O equipamento empregado foi um tambor rotativo horizontal de 30cm de diâmetro interno e 40cm de comprimento, onde a parede do tambor girava a 1rpm. Estes autores afirmaram que a melhor distribuição foi obtida quando a água não ligada presente na superfície dos grãos foi rapidamente distribuída no meio, ou seja, houve um curto período de aspersão seguido de um período de mistura sem adição de água, concordando com os resultados obtidos neste trabalho. Segundo estes autores o processo de captura da água aspergida

Resultados e discussão

em um leito de partículas sólidas misturadas em tambores rotativos se dá, principalmente, em três etapas: adição externa de água às partículas, absorção de água pelas partículas individuais e transferência de água entre as partículas vizinhas. No caso particular do bagaço de cana e o farelo de trigo, é de se esperar que a captura e absorção da água é realizada de forma diferente por cada material. Zanelato (2011) mostrou que o farelo de trigo atingiu uma umidade de 78% após um dia quando colocado em um frasco com água; enquanto que o bagaço de cana demorou quase 6 dias para atingir a umidade de 75% quando submetido às mesmas condições de umidificação.

5.3 ANÁLISE TÉRMICA DO SISTEMA

Dado que a taxa de geração de calor metabólico e as diferentes fases de crescimento do microrganismo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b são desconhecidas, nesta etapa do trabalho, somente os meios sólidos sem inoculação foram empregados para facilitar a comparação com outros trabalhos encontrados na literatura e para determinar a melhor forma de controlar a temperatura do reator rotativo.

Como mencionado no capítulo *Materiais e Métodos*, a umidade relativa foi monitorada durante todos os experimentos e, apesar das variações climáticas ocorridas durante sua realização, esta se manteve constante, com valor médio $91,53\% \pm 3,5\%$. Ainda que a umidade relativa fosse elevada, o ar não estava saturado, razão pela qual pode, o mecanismo de remoção de calor através da evaporação da água, ter ocorrido como será discutido mais adiante.

Na Figura 5.16 é apresentada a distribuição de temperaturas para um experimento sem carga, onde inicialmente a camisa do tambor encontrava-se à temperatura de 25°C e subitamente foi colocada a 45°C, com inserção de ar a 45°C e 5L/min e sem rotação. Note-se que o tempo decorrido para atingir a temperatura desejada (45°C) foi de 50 minutos, tanto nos sensores denominados como próximos da superfície quanto nos próximos da parede, podendo se dizer que o sistema, nas condições do ensaio, tem uma resposta térmica lenta. Tal resistência à transferência de calor é convectiva e é elevada devido à baixa vazão de escoamento do ar.

Resultados e discussão

Note-se que, no instante zero do experimento as temperaturas medidas nas posições mais afastadas da parede eram mais elevadas, cerca de 30°C, do que as temperaturas próximas da parede, cerca de 25°C. Tal fenômeno da tendência do ar quente se posicionar nas porções superiores do tambor e pelo fato de que a exaustão do ar do sistema se dava por um tubo postado na porção superior da tampa de saída. Tal diferença praticamente deixou de existir após 30min de ensaio, quando o sistema entrou em regime estacionário, no qual permaneceu durante o resto do experimento.

Guen et al. (2013) e Wes, Drinkenburg e Stermerding (1976a) determinaram o coeficiente de transferência de calor entre a parede do tambor e o ar em tambores rotativos. Wes, Drinkenburg e Stermerding (1976a) utilizaram um tambor rotativo de 9m de comprimento, 60cm de diâmetro e 9 chicanas de 6cm de largura colocadas em ângulo de 45° com a parede. O experimento foi realizado com o equipamento sem carga, unicamente foi feito passar ar com taxas de 95 e 155Kg/h, a temperatura da camisa permaneceu constante e foi girado a 1,6 e 6rpm. Guen et al. (2013) utilizaram um tambor de 1,7m de diâmetro, 7,86m de comprimento e 40 defletores na forma de L. Os dois trabalhos modelaram o fenômeno de formas diferentes, porém o sistema de ingresso de ar era similar, ou seja, a inserção de ar foi realizada através de uma tubulação colocada em um extremo do tambor e a saída foi no extremo oposto à entrada. Ambos coincidem em afirmar que o mecanismo de transferência de calor que governou o processo foi a convecção. Devido ao arranjo mecânico adotado no tambor objeto de pesquisa, onde o ingresso de ar foi realizado através de um tubo interno perfurado do mesmo comprimento do tambor, dificulta a modelagem matemática, porém já que o número adimensional Reynolds para este sistema é 28 poderia se sugerir que o mecanismo de transferência de calor predominante é a convecção natural.

Resultados e discussão

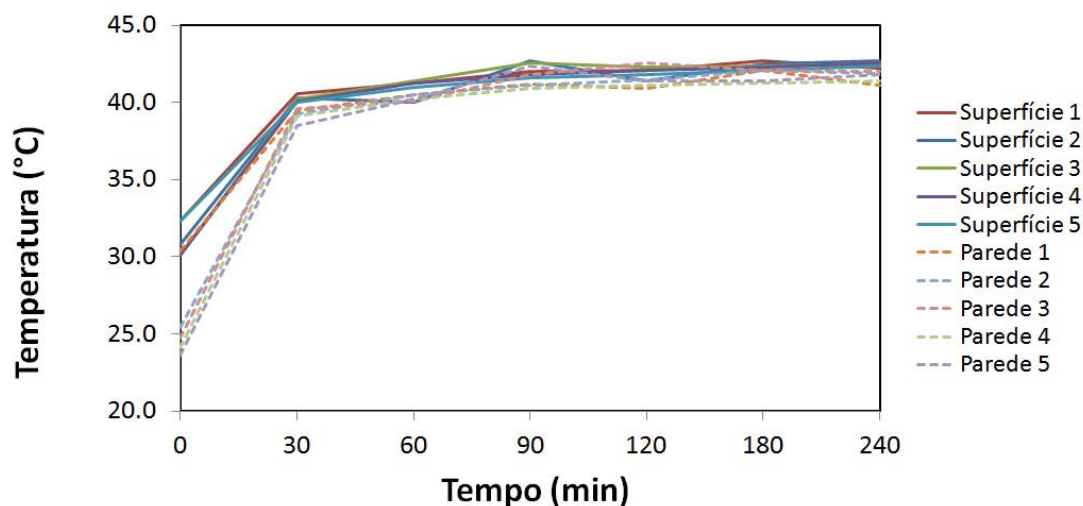


Figura 5.16. Temperatura em função do tempo de um experimento sem carga e em presença de ar a 45°C e 5L/min, com mudança súbita da temperatura da camisa de 25°C para 45°C.

Na Figura 5.17 são apresentados resultados para a variação temporal da temperatura de experimentos com 3Kg de bagaço-farelo (0,4 de grau de enchimento), temperatura inicial das partículas 25°C, e em presença de ar a 45°C e 5L/min. Na Figura 5.17a o tambor estava estacionário e a mistura farelo-bagaço estava a 75% de umidade e observa-se que as temperaturas foram muito heterogêneas entre si e o tempo necessário para atingir o estado estacionário foi de aproximadamente 75 minutos. Comparando-se com os resultados para o tambor vazio, para os quais o regime estacionário foi atingido após 30min, conclui-se que a resistência térmica imposta pelo leito de partículas é elevada, ocasionando as diferenças espaciais de temperatura significativas.

Grajales (2010) realizou ensaios com esferas de vidro de 3mm de diâmetro, neste mesmo equipamento, com graus de enchimento iguais a 0,23, 0,40 e 0,60, enquanto que no presente trabalho os graus de enchimento foram 0,40, 0,50 e 0,60. Grajales realizou ensaios preliminares com vazões de ar iguais a 15 e 90L/min e não observou influência significativa desta variável sobre os perfis de temperatura medidos nas mesmas posições do presente trabalho e somente para 150L/min o ar mostrou capacidade de influenciar o comportamento térmico do sistema. Ocorre que, vazões de ar muito elevadas são desaconselháveis para sistemas de FES, pois o ar dificilmente entrará saturado no sistema, de modo que a altas vazões estarão associadas altas taxas de transferência de água da fase sólida para a gasosa. Considerando-se que a condutividade térmica efetiva

Resultados e discussão

na estagnação do meio poroso composto por bagaço de cana e farelo de trigo a 75% é próxima da observada para esferas de vidro (FREIRE, 1979; CASCIATORI et al., 2013), cerca de 0,2 W/mK, é de se esperar que para a mistura bagaço de cana e farelo de trigo percolada por ar a 5L/min, a convecção seja desprezível, sendo a condução o mecanismo predominante.

Desta forma, a remoção de calor metabólico através do escoamento do ar é um mecanismo ineficiente de remoção de calor, sendo aspersão de água líquida e a rotação do tambor as outras alternativas disponíveis. Na Figura 5.17b são apresentados os resultados do experimento com aspersão de água a 65°C a 2500mL/min, estando o meio poroso inicialmente a 50% de umidade, sem rotação do tambor. A aspersão foi realizada intermitentemente com volumes de 200mL de acordo com os resultados da capacidade de retenção de água do leito de partículas sólidas. O volume total adicionado foi o suficiente para atingir 75% de umidade, totalizando 1,5L de água. Note-se que houve diminuição de 15 minutos no tempo de aquecimento do meio particulado em comparação ao aquecimento sem a aspersão de água. Esperava-se que a temperatura das partículas incrementasse significativamente, uma vez que esse é o método mais recomendado na literatura para o controle de temperatura nesse tipo de biorreator (MUZZIO, et al., 2003; SCHUTYSER, et al., 2002). Em vista de que o tempo de aquecimento foi reduzido somente em 15 minutos, decidiu-se realizar um experimento similar ao anterior submetendo o sistema a rotação. Para este caso foram realizados 12 giros a 1rpm, de acordo com os resultados de mistura de partículas para o primeiro grau de enchimento, e as leituras de temperatura foram obtidas após a rotação completa do tambor, sendo os resultados apresentados na Figura 5.17c. Notou-se maior homogeneização da temperatura nas várias posições do tambor, com redução do tempo necessário para atingir a temperatura desejada. Schutyser, et al. (2002) afirmaram que o controle da temperatura neste tipo de equipamento é favorecido se são aplicadas sinergicamente a aspersão de água seguida de um curto período de rotação, o que concorda com os resultados aqui apresentados.

Resultados e discussão

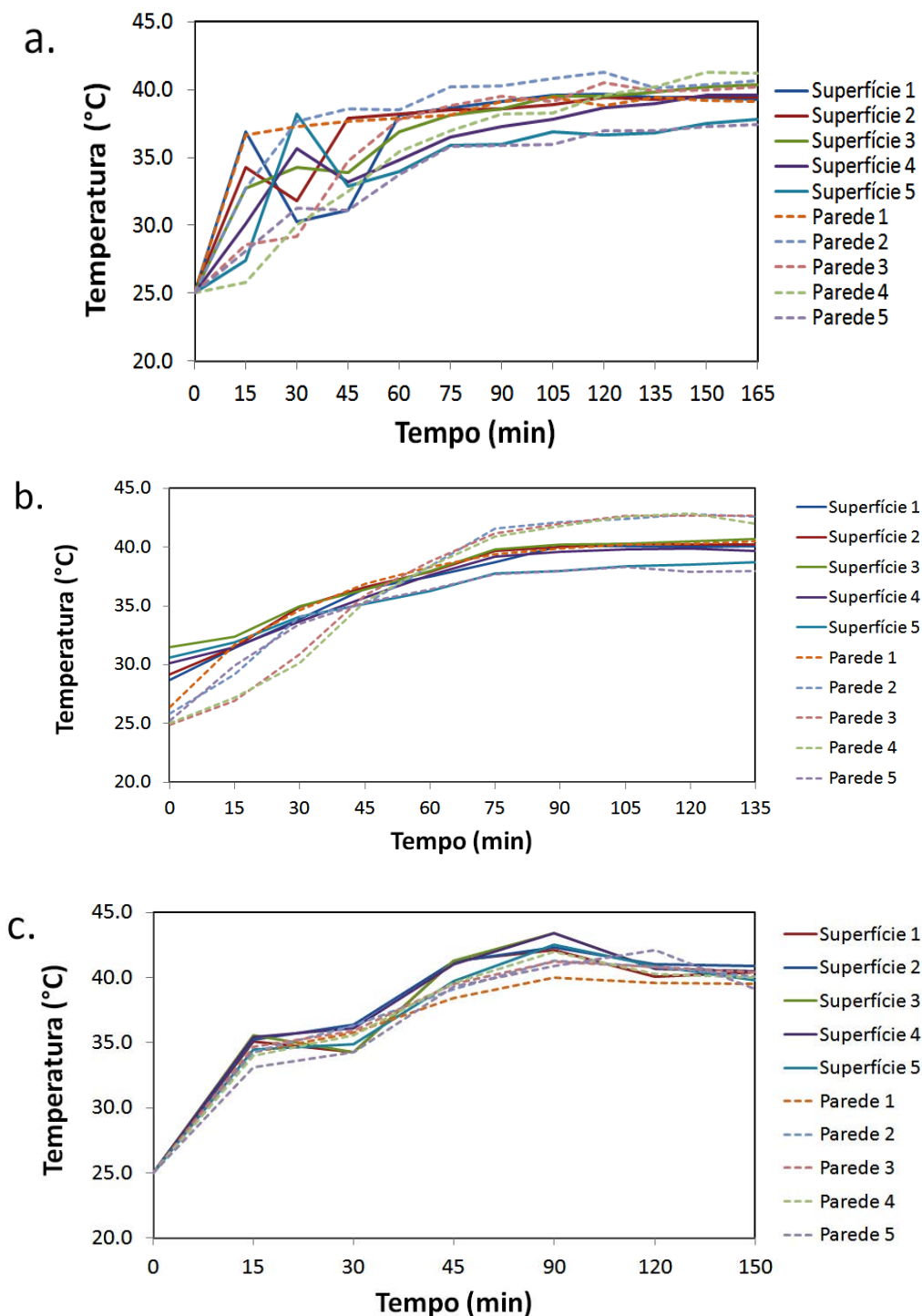


Figura 5.17. Temperatura em função do tempo de experimentos com 3Kg de mistura bagaço-farelo à temperatura inicial de 25°C, em presença de ar a 45°C e 5L/min (a) tambor estacionário e sem aspersão de água, (b) tambor estacionário com aspersão de água a 65°C a uma vazão de 2500mL/min e (c) tambor com rotação de 1rpm, com aspersão de água.

Resultados e discussão

Na Figura 5.18 são apresentadas as temperaturas medidas próximo à superfície do leito em função da posição axial do tambor, para 3kg de carga (grau de enchimento 0,40), nas mesmas condições experimentais da Figura 5.17. Na Figura 5.18a para 90 minutos a média de temperaturas foi 36,4°C e o desvio padrão foi de 4,82°C, o que pode afetar expressivamente as taxas e velocidades de reação em sistemas de FES, além de poder ocasionar algum dano às enzimas para as temperaturas mais elevadas. Com a aspersão de água, mas mantendo-se ainda o tambor imóvel, Figura 5.18b, para 90 minutos de ensaios há aumento da temperatura média e redução do desvio padrão, 39,6°C e 2,51°C, respectivamente, indicando melhora na obtenção e manutenção da temperatura ideal aos ensaios. No entanto, uma vez aspergida água e aplicada a rotação do tambor foi observada uma notável homogeneização das temperaturas conforme apresentado na Figura 5.18c, sendo a média das temperaturas e o desvio padrão após 90 minutos de ensaio iguais a 42,7°C e 0,62°C, respectivamente Schutyser et al. (2003) avaliaram a transferência de calor e massa para grãos de trigo, em um tambor rotativo construído em alumínio com tampas de policarbonato, de 30cm de diâmetro e 40cm de comprimento. O equipamento foi girado a 0,5 e 1rpm de frequência. Água foi atomizada através de dois bicos aspersores e os graus de enchimentos trabalhados foram 0,33 e 0,4. Estes autores observaram que a presença de água por aspersão de pequenas gotas não influenciava visivelmente a movimentação das partículas no interior do leito, mas sim na redução ou aumento da temperatura, concordando com o observado no presente estudo.

Resultados e discussão

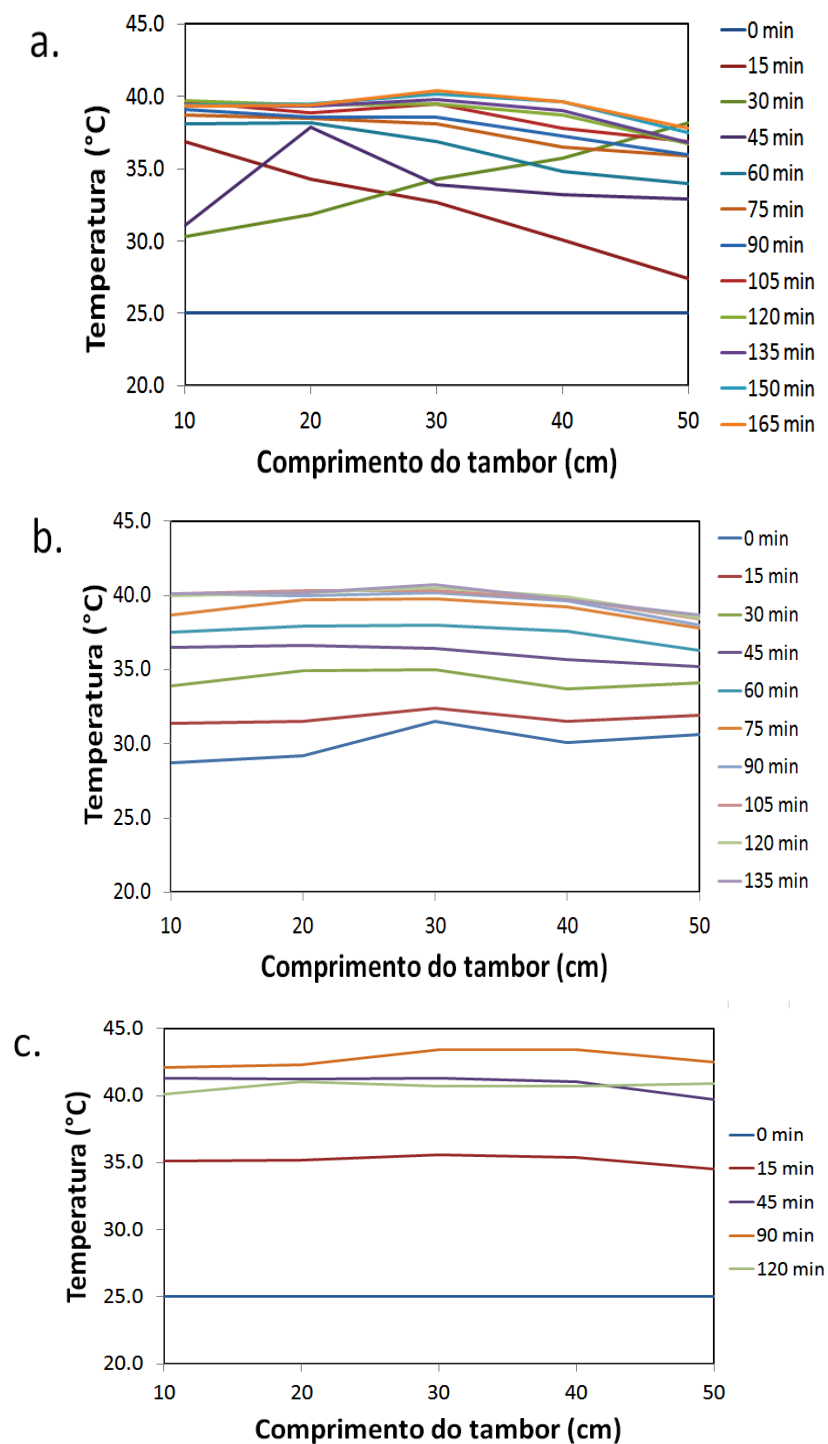


Figura 5.18. Temperatura próxima superfície das partículas de experimentos com 3Kg de mistura bagaço-farelo à temperatura inicial de 25°C, em presença de ar a 45°C e 5L/min (a) tambor estacionário e sem aspersão de água, (b) tambor estacionário com aspersão de água a 65°C a uma vazão de 1500mL/min e (c) tambor com rotação de 1rpm, com aspersão de água.

Resultados e discussão

Durante o processo fermentativo é gerado calor, o qual deve ser removido rapidamente para garantir as condições ótimas ao desenvolvimento e às atividades metabólicas do microrganismo. Por esta razão, foi realizado um experimento com as seguintes condições de operação: 3Kg de material particulado ($f = 0,40$) a 75% de umidade e temperatura inicial de 55°C, temperatura da camisa 45°C, inserção de ar a 5L/min à mesma temperatura da camisa, sem aspersão de água e sem rotação do tambor. O intuito deste ensaio foi o de verificar a velocidade com que o controle do processo é retomado a 45°C, após o microrganismo ter gerado calor suficiente para que a temperatura atingisse 55°C. Na Figura 5.19a é apresentada a variação temporal da temperatura, onde se constata a diminuição das temperaturas no início do experimento e posterior aumento até atingir-se estabilização, sendo as temperaturas finais muito próximas da temperatura da camisa e do ar. Lembrando que a umidade relativa do ar inserido no tambor foi de 92%, pode se dizer que o mecanismo de resfriamento do meio foi feito através da evaporação, ou seja, a fase gasosa tende a capturar a água da superfície do meio sólido até sua saturação, resfriando o meio (HARDIN; HOWES; MITCHELL, 2002). A redução imediata da temperatura é uma consequência positiva para o processo, pois as temperaturas inferiores às ótimas ao crescimento são menos danosas ao microrganismo do que as superiores. De um modo geral, o sistema passa a sofrer pequenas variações de temperatura após cerca de 30min, embora a distribuição espacial de temperatura ainda seja grande. Na Figura 5.19b as partículas estavam a 50% de umidade inicial e temperatura de 55°C, quando água a 25°C foi aspergida a uma taxa de 2500mL/min, em volume suficiente para que a umidade do meio atingisse 75% a volumes de 200mL. A rotação do tambor foi a uma frequência de 1rpm, realizada intermitentemente com volumes de 200mL sendo aplicadas 12 rotações a cada ciclo, as leituras de temperatura foram realizadas após cada 12 rotações do tambor. A principal diferença em relação ao ensaio anterior é que houve uma diminuição na heterogeneidade das temperaturas, pois o desvio padrão passou de 3,2°C para 2,5°C aos 15 minutos de experimentação, de 2,2°C para 1,5°C aos 75 minutos e de 1,5°C para 1,0°C após 160 minutos.

Resultados e discussão

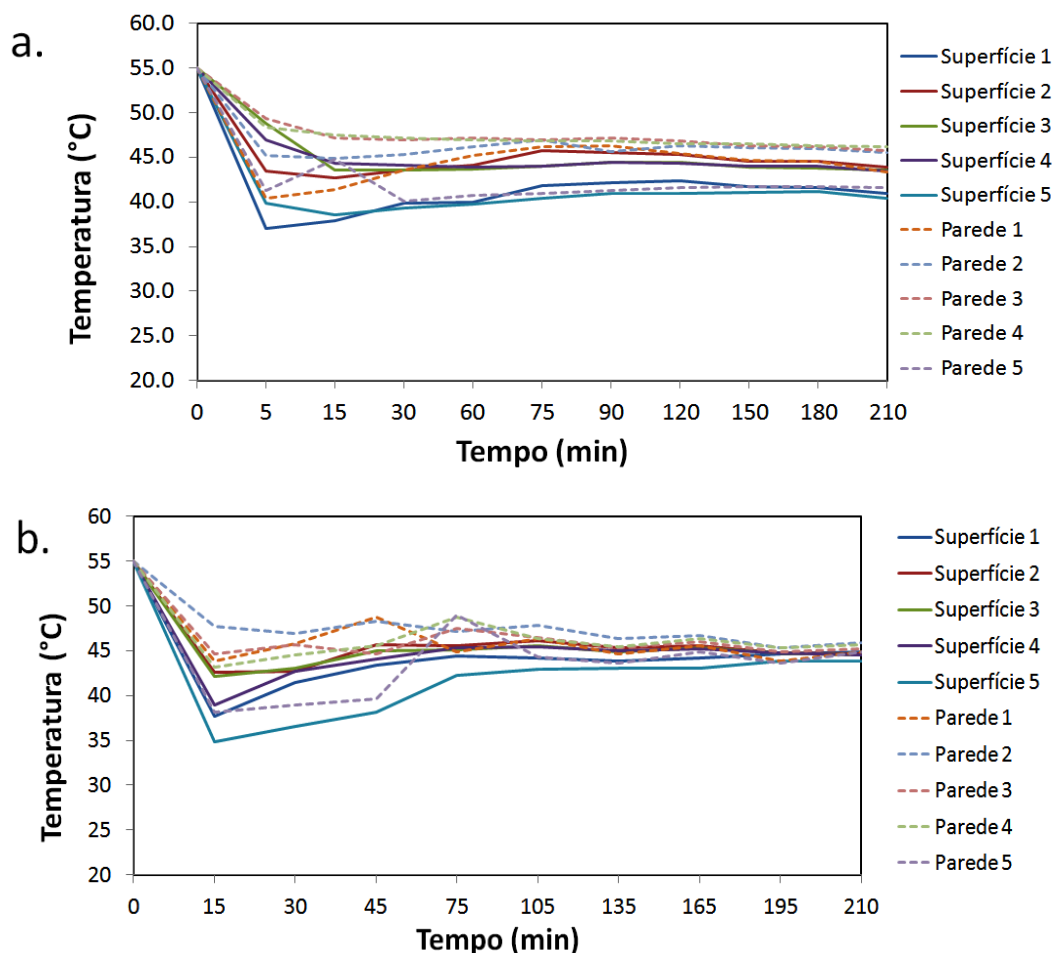


Figura 5.19. Variação temporal da temperatura para um experimento com 3Kg de mistura bagaço-farelo, com temperatura inicial 55°C, e vazão de ar de 5L/min a 45°C (a) leito estacionário e sem aspersão de água e (b) tambor com rotação intermitente do tambor a 1rpm e com aspersão de água a 25°C e 2500mL/min.

Na Figura 5.20 é mostrada a distribuição de temperaturas dos sensores próximos da superfície das partículas em função da posição axial, dentro do tambor para um experimento onde a temperatura inicial do meio particulado foi de 55°C, com inserção de ar a 45°C e 5L/min, aspersão de água a 25°C e 2500mL/min e rotação intermitente do tambor a 1rpm. As Figuras 5.20a, b e c correspondem aos graus de enchimento iguais a 0,4, 0,5 e 0,6, respectivamente. Para este caso foram realizadas 12, 15 e 17 rotações para cada grau de enchimento respectivamente, e as leituras de temperatura foram tomadas após cada série de rotações do tambor. A aspersão foi realizada intermitentemente com volumes de 200, 300 e 400mL para cada grau de enchimento

Resultados e discussão

respectivamente. Note-se que nas três figuras houve pouca variação axial de temperatura para todas as cargas de partículas e que há a redução inicial de temperatura, devido à remoção de calor evaporativo, embora menos intensa para a carga de 6kg, o que indica que o ar se satura antes de atingir a superfície, não podendo contribuir com este mecanismo de remoção de calor nas camadas superficiais do leito.

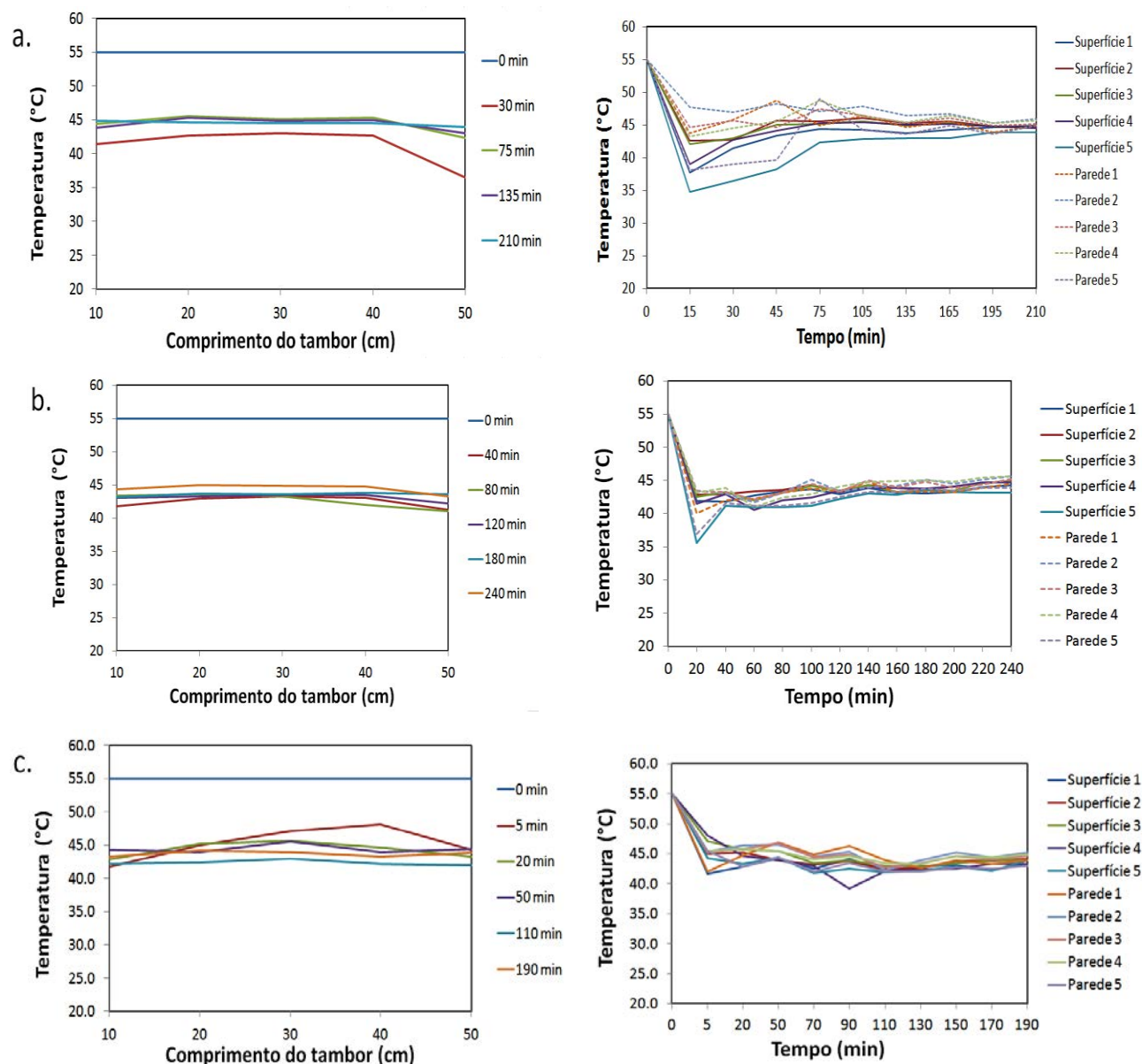


Figura 5.20. Temperatura em função do comprimento do tambor e de temperatura em função do tempo para experimentos com mistura bagaço-farelo à temperatura inicial de 55°C, em presença de ar a 45°C e 5L/min, com aspersão de água a 65°C e 2500mL/min e com rotação do tambor a 1rpm (a) 3,0kg, (b) 4,5Kg e (c) 6Kg.

Resultados e discussão

O tempo para atingir o regime estacionário foi diferente para cada carga, sendo de aproximadamente 75 minutos para 3Kg, 40 minutos para 4,5Kg e 20 minutos para 6Kg. Este comportamento foi totalmente inesperado, pois a literatura recomenda trabalhar com baixos graus de enchimento em tambores rotativos para aumentar o contato entre a fase gasosa e a fase sólida removendo mais facilmente o calor pela continua movimentação das partículas em todo o leito (BOATENG et al.,1996; KELBERT et al., 1991; MARSH et al. 2000; , RODRIGUEZ; SANROMAN, 2005).

Mellmam (2001) e Mellmann, Specht e Liu (2004) afirmaram que no interior de um tambor rotativo as partículas sólidas criam um ponto frio onde a posição e a temperatura não podem ser medidas com precisão devido ao movimento transversal dos sólidos e a quantidade de material particulado dentro do reator, tornando difícil estudar a transferência de calor nos cilindros rotativos. Entretanto, segundo o arranjo mecânico do equipamento empregado neste trabalho, conseguiu-se medir as temperaturas em duas posições do leito, próximo à superfície das partículas e próximo à camisa, possibilitando assim obter informações relevantes para compreender o processo fermentativo.

Desta etapa pode se concluir que a ação sinérgica da aspersão de água e a rotação do tambor contribuem para o bom controle da temperatura. Os experimentos realizados com a posição fixa do tambor apresentaram gradientes radiais de temperatura expressivos, os quais foram praticamente eliminados em experimentos similares com rotação do tambor. Para processos FES, estas observações realizadas para o tambor rotativo, contribuem positivamente ao desenvolvimento das reações biológicas, se comparadas aos biorreatores de leito fixo. Pois este tipo de biorreatores apresentam migração de umidade no interior do leito e gradientes de temperatura (ZANELATO, 2011).

Resultados e discussão

5.4 AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA À AGITAÇÃO MECÂNICA DO FUNGO *Myceliophthora thermophila* I-1D3b

5.4.1. Experimentos preliminares

Na Tabela 5.16 são apresentadas as atividades enzimáticas das fermentações realizadas em sacos plásticos de polipropileno com os substratos com e sem pré-tratamento, bem como as atividades enzimáticas quando os sacos plásticos fermentativos foram submetidos à agitação a cada 12 e 24 horas em banho Dubinoff. Pode-se observar que as fermentações realizadas com o substrato sem pré-tratamento apresentaram valores de atividades enzimáticas ligeiramente superiores às realizadas com o substrato com pré-tratamento. Sugere-se que as partículas de pequenas dimensões presentes no bagaço de cana de açúcar sem lavar, denominadas bagacilho, as quais correspondem entre 35 e 45% do bagaço (SOAREZ; ROSELL; 2009), aumentam a área superficial para o ataque das enzimas, e dado que essas partículas possuem entre 27 e 55% de celulose (SILVA; GOMES; ALSINA, 2007)., contribuem para o aumento da atividade enzimática. Por este motivo decidiu-se empregar o substrato sem pré-tratamento para todos os experimentos fermentativos realizados neste trabalho.

Tabela 5.16. Atividade de CMCase para fermentações em sacos plásticos com substrato com e sem pré-tratamento, sem agitação e com agitação a cada 12 e 24 horas em banho Dubinoff.

Pré-tratamento	Atividade Enzimática (U/mL)		
	Leito estático	Sacos com agitação	
		12 horas	24 horas
Sem	68,44 ± 18,31	25,55 ± 3,132	51,77 ± 13,628
Com	44,43 ± 7,116	20,77 ± 6,236	54,62 ± 18,6

A respeito das fermentações realizadas com agitação a cada 12 horas, pode-se inferir que estas afetaram negativamente a atividade enzimática se comparadas com os sacos que permaneceram estáticos durante todo o processo fermentativo, sendo as

Resultados e discussão

agitações a cada 12h mais prejudiciais do que a cada 24h. A cinética de crescimento do *Myceliophthora thermophila* I1D3b é ainda desconhecida, no entanto pode-se deduzir que as agitações durante o período inicial entre 12 e 24h danificou as hifas nos estágios iniciais após a germinação dos esporos, que não se recompuseram a ponto de poderem sintetizar as enzimas nos períodos subsequentes. Esta suposição é confirmada com os resultados com agitação a cada 24h, que apresentaram atividades enzimáticas próximas às dos ensaios sem agitação.

Na Tabela 5.17 são apresentadas as atividades enzimáticas médias dos experimentos fermentativos realizados também em sacos plásticos submetidos à agitação no vibrador de peneiras. É possível notar que este tipo de agitação provocou um estresse excessivo ao microrganismo durante o processo fermentativo, ainda que ele continuasse produzindo celulasas, confirmando mais uma vez que ele é tolerante à agitação mecânica. Com estas informações procedeu-se a realizar os experimentos específicos de tolerância à rotação no biorreator rotativo de alumínio.

Tabela 5.17. Atividade CMCase das fermentações realizadas com agitação no vibrador de peneiras Tyler.

Tempo (min)	Atividade Enzimática (U/mL)	
	12 horas	24 horas
0	21,13 ± 3,31	22,75 ± 4,06
2,5	9,84 ± 3,98	16,91 ± 2,71
5	15,58 ± 3,03	22,47 ± 6,13
7,5	9,07 ± 1,67	17,30 ± 0,32

5.4.2 Fermentações em biorreator de alumínio

As dimensões do biorreator de alumínio são menores quando comparadas com os outros tambores empregados nesta tese, e o grau de enchimento trabalhado nas etapas anteriores deveria ser mantido. Para isto a massa de bagaço-farelo foi recalculada através da densidade aparente da mistura, determinada experimentalmente $0,405\text{g/cm}^3$, e da definição de grau de enchimento descrita na Equação 3.3. Na Tabela 5.18 encontram-se as massas necessárias para atingir os três graus de enchimento.

Resultados e discussão

Tabela 5.18. Massa da mistura bagaço-farelo a 75% de umidade utilizadas no biorreator de alumínio para manter os graus de enchimento empregados nas etapas anteriores.

Área da seção			
<i>f</i>	transversal ocupada pelas partículas (cm)	<i>V</i> (cm)	<i>m</i> (g)
0,4	31,42	628,32	254,78
0,5	39,27	785,40	318,48
0,6	47,12	942,48	382,17

Na Figura 5.21 é mostrada uma fotografia do sistema com o primeiro grau de enchimento após 96 horas de fermentação, com agitação a cada 24 horas. Em relação à distribuição espacial das atividades enzimáticas, observou-se certa heterogeneidade sendo maior nas extremidades do biorreator (posição 1 e 6 da Figura 5.24), provavelmente devido à troca de calor entre a tampa metálica e o ambiente com consequente diminuição da temperatura, sendo favorável à produção das enzimas.



Figura 5.21. Biorreator de alumínio para o primeiro grau de enchimento após 96 horas de fermentação com uma agitação diária.

A Tabela 5.19 sintetiza os resultados para os três graus de enchimento, em termos de atividade enzimática relativa, que representa a razão das atividades enzimáticas obtidas no biorreator pelas atividades enzimáticas dos experimentos sem agitação nos sacos de polipropileno. Observe-se que para o primeiro e segundo graus de enchimento (0,4 e 0,5, respectivamente) a rotação do tambor não teve um efeito prejudicial às

Resultados e discussão

enzimas, havendo ligeiro aumento da atividade enzimática. No entanto, para o terceiro grau de enchimento (0,6) o efeito positivo da rotação do tambor foi observado somente para os experimentos realizados com agitação a cada 24 horas, sendo que as atividades enzimáticas obtidas para os experimentos sem agitação e com agitação a cada 12 horas foram inferiores às fermentações realizadas nos sacos de polipropileno. Embora tenha sido observada heterogeneidade na distribuição espacial das atividades enzimáticas, não é possível sugerir uma tendência definida das atividades com a posição a partir desses resultados.

Tabela 5.19. Atividades enzimáticas relativas para endoglucanases produzidas em biorreator de alumínio.

Graus de Enchimento	Intermitência de Agitação (horas)	Posição das amostras						Média
		1	2	3	4	5	6	
0,4	0	1,3	1,3	ND	ND	0,9	0,9	1,1
	12	1,2	0,9	ND	ND	0,7	1,0	1,0
	24	1,7	1,0	ND	ND	0,7	0,7	1,0
0,5	0	1,7	1,0	1,2	1,1	0,5	1,4	1,2
	12	1,7	1,0	1,2	1,0	0,7	1,4	1,2
	24	0,8	1,2	0,6	0,6	1,3	1,5	1,0
0,6	0	0,9	0,6	0,9	0,6	0,7	0,8	0,8
	12	0,2	0,7	0,6	0,7	0,9	1,3	0,7
	24	0,9	1,0	1,3	1,1	1,3	1,0	1,1

ND: Não disponível.

Visualmente foi constatado que houve crescimento microbiano, como pode ser observado na Figura 5.22 ao final da fermentação. Observe-se como o micélio fúngico ocupa parcialmente os poros interpartículas do meio de cultivo, o que não parece ter comprometido mecanismos de transferência de calor e massa, haja visto os resultados de atividade enzimática anteriormente relatados.



Figura 5.22. Aparência do meio de cultivo para o segundo grau de enchimento mantendo o biorreator sem agitação (a) antes do processo fermentativo e (b) após 96 horas de fermentação.

Em alguns experimentos foi observado transporte de material até o fundo do biorreator, como pode ser visto na Figura 5.23. Uma vez que os experimentos de mistura radial de partículas descritos no item 5.1.3, não revelaram transporte de material no tambor de acrílico devido à natureza fibrosa das partículas, a hipótese para este fato poderia ser que com o crescimento do fungo e formação do micélio, as hifas começam a unir o substrato formando blocos grandes de material e quando o reator é submetido à rotação esses blocos podem se deslocar e manter-se numa posição de estabilidade, da qual não poderia se mover devido à forte interação entre as hifas.



Figura 5.23. Material fermentado após 96 horas com duas agitações diárias para o segundo grau de enchimento (a) vista frontal e (b) vista traseira.

Analisando-se os valores de Atividade Enzimática Relativa (AER) para o segundo grau de enchimento e construindo um gráfico do tipo radar, Figura 5.24, é possível evidenciar a heterogeneidade espacial das mesmas, sendo que os experimentos realizados com agitação a cada 12 horas, apesar de ter menores valores de AER, tiveram uma distribuição mais uniforme comparada com os experimentos realizados com agitação a cada 24 horas.

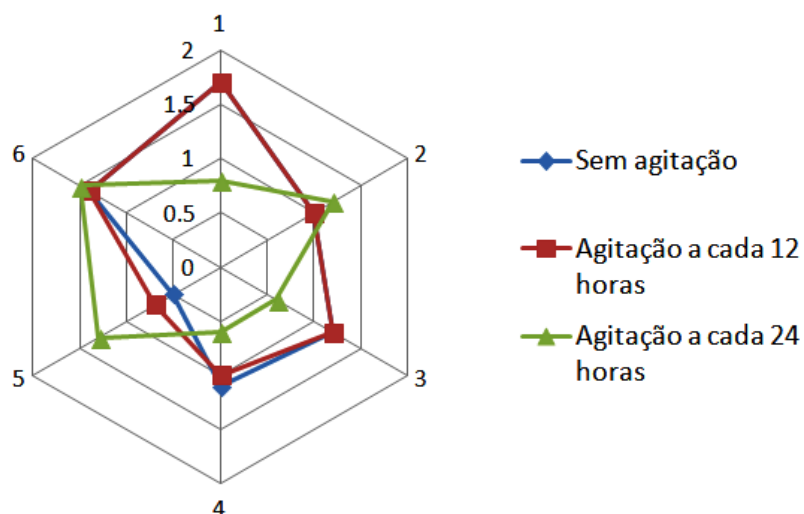


Figura 5.24. Distribuição espacial das atividades enzimáticas para o segundo grau de enchimento.

Resultados e discussão

Para o terceiro grau de enchimento foi observado um notável aumento no volume do meio fermentativo, como apresentado na Figura 5.25, que ocupou quase a área total da seção transversal do cilindro, representando uma dificuldade adicional para as grandes cargas de material em biorreatores deste tipo.



Figura 5.25. Meio fermentado após 96 horas para o terceiro grau de enchimento, com uma agitação diária.

Construindo a mesma representação gráfica do tipo radar para os valores AER para o terceiro grau de enchimento, Figura 5.26, é possível notar que as amostras mais homogêneas foram obtidas para as fermentações realizadas com agitação a cada 24 horas.

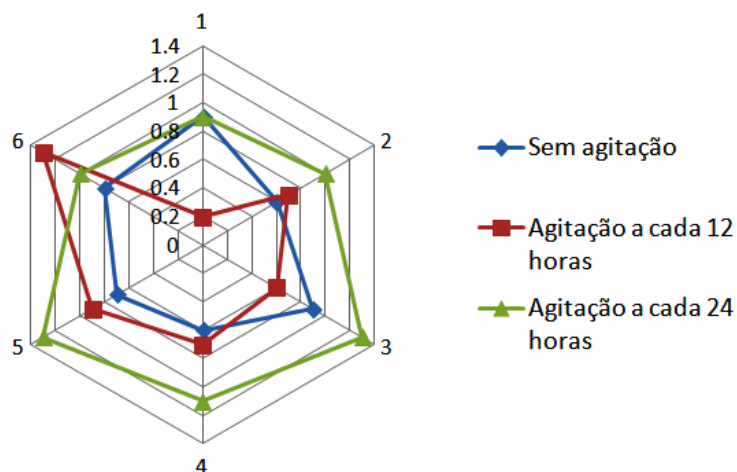


Figura 5.26. Distribuição espacial das atividades enzimáticas para o terceiro grau de enchimento.

Resultados e discussão

Outros microrganismos já foram submetidos ao estresse mecânico obtendo bons resultados dependendo do escopo da pesquisa. Dillon et al. (2012) produziram ácido cítrico por FES em um biorreator de tambor rotativo de 12L, a partir de bagaço de maçã e utilizando o fungo *Aspergillus niger* NRRL567 para fermentações de 12 dias, sendo a maior produção foi obtida quando o microrganismo foi submetido à rotação do tambor a 2rpm a cada 12 horas. Rodriguez-Jasso et al. (2013) estudaram a produção de fucoidanases a partir do fungo *Mucor* sp. 3P, tendo algas como substrato. O estudo foi realizado em um biorreator para FES em escala de laboratório, que girava a 10rpm, constatando que as atividades das fucoidanases foi maior quando o sistema foi submetido à rotação se comparado com o leito estático.

Evidentemente, serão necessários estudos estatísticos de repetições mais extensos para que se possa garantir com razoável exatidão as condições operacionais mais favoráveis à metabolização das enzimas mais ativas. No entanto, é possível afirmar-se que o fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b é tolerante a agitações moderadas encontradas em um tambor rotativo. Ressalte-se que a frequência de rotação foi de 18rpm, devido às limitações do equipamento, o que tende a aumentar o estresse cisalhante sobre o microrganismo. Com os resultados desta e das etapas anteriores prosseguiu-se com a produção de endoglucanases no biorreator de aço-inox de maior escala.

5.5 PRODUÇÃO DE CELULASES POR FES EM BIORREATOR ROTATIVO

5.5.1 Experimentos preliminares

Na Figura 5.27 é apresentada uma fotografia da primeira fermentação realizada com o fungo *Myceliophthora thermophila* I1D3b cultivado por FES, na mistura bagaço-farelo, em biorreator de aço inox, para o grau de enchimento igual a 0,5, após 96 horas de fermentação e sem agitação do leito. Neste ensaio, o material sólido foi carregado no tambor e esterilizado com vapor saturado, sendo o sistema colocado a girar durante os 20min de adição de vapor. Este experimento foi importante para compreender melhor o sistema: o purgador termodinâmico não estava funcionando corretamente, razão pela qual

Resultados e discussão

após o processo de esterilização e aspersão de solução nutritiva e suspensão de esporos, líquido percolou o meio particulado e permaneceu no fundo do tambor durante toda a fermentação. Esse excesso de umidade, superior a 85%, evitou o desenvolvimento do fungo em essa área como pode ser observado na fotografia. Entretanto, este inconveniente foi solucionado uma vez que o purgador foi substituído.

Além disso, todo o material impregnado com a solução nutritiva e a suspensão de esporos aderido às paredes do reator proporcionaram mais área de crescimento do microrganismo, inclusive havendo crescimento no meio de cultivo presente entre os defletores. Este fato de crescimento na parede do tambor não foi observado no protótipo construído em alumínio, possivelmente devido a que o empacotamento realizado em esse equipamento foi feito com o meio já inoculado, evitando escorregamento de água ou excesso de umidade nas paredes do mesmo, portanto sem adesão de material fermentescível.

Crescimento de
microrganismo na
parede do reator



Fundo do reator
com excesso de
umidade

Figura 5.27. *Myceliophthora thermophila* I1D3b cultivado por FES após 96 horas no biorreator de aço-inox para 0,5 de grau de enchimento e sem agitação do leito.

Posteriormente, o meio foi removido para observar o interior do reator e foi encontrada uma camada superficial de mais de 8cm de micélio, muito positivo para uma primeira transposição a uma escala de produção maior.

Resultados e discussão

5.5.2 Produção de celulases por FES em biorreator rotativo

Na Tabela 5.20 são apresentados os resultados para as atividades enzimáticas relativas (AER) para os três graus de enchimento que representa a razão das atividades enzimáticas obtidas no biorreator pelas atividades enzimáticas dos experimentos sem agitação nos sacos de polipropileno. Observe-se que para o segundo grau de enchimento (0,5) a rotação do tambor não teve um efeito prejudicial às enzimas, havendo ligeiro aumento da atividade enzimática, mesmo comportamento observado no biorreator de alumínio. Para o primeiro grau de enchimento (0,4) o efeito da rotação foi claramente negativo, enquanto que para o terceiro grau de enchimento as atividades foram praticamente iguais nos leito estático e rotacionado. Ressalte-se que a extração das enzimas realizada nesta etapa foi feita com 1,5mL de água para cada 1g de sólido seco e nos sacos foram utilizados 20mL por cada 1g de sólido seco, uma vez que o volume total do reator não comportava a quantidade de água usualmente empregada. Infelizmente, o dreno do interior do tambor não funcionou satisfatoriamente para que o volume correto fosse empregado, sendo este um aspecto a ser aprimorado no projeto do equipamento. Segundo Umza-Guez (2009) o volume de solvente utilizado durante a extração influencia na quantidade de enzima extraída, sendo que, quanto menor a quantidade de solvente empregada, menor será a quantidade de enzima extraída. Desta forma, possivelmente se o processo de extração fosse realizado com maior quantidade de água tivessem sido obtidas maiores atividades enzimáticas.

Tabela 5.20. Atividades enzimáticas relativas para endoglucanases produzidas em biorreator de bancada.

Grau de enchimento	Atividade enzimática relativa	
	Leito estático	Leito com agitação
0,4	1,4	0,7
0,5	1,4	1,5
0,6	1	0,9

Dado que nesta etapa não foram tomadas amostras do interior do reator ao final da fermentação, não foi possível avaliar a distribuição espacial das atividades ao final dos ensaios. Porém, sugere-se realizar novos processos fermentativos onde este procedimento seja realizado e as informações sejam corroboradas com a etapa anterior

Resultados e discussão

de tolerância à agitação mecânica do fungo. Também se sugere maior experimentação para confirmar as informações fornecidas na Tabela 5.20.

Na Figura 5.28 é apresentada uma fotografia do fungo *Myceliophthora thermophila* I1D3b cultivado por FES, para o grau de enchimento 0,4 e com agitação do leito. Note-se que, apesar de se tratar do menor grau de enchimento, o tubo interno de aeração permaneceu imerso nas partículas favorecendo o resfriamento do meio de cultivo e a transferência de oxigênio ao meio de cultivo.



Figura 5.28. *Myceliophthora thermophila* I1D3b cultivado por FES após 96 horas no biorreator de aço-inox para o grau de enchimento 0,4 e com agitação do leito.

Alguns autores como Rodríguez; Lopez; Sanroman (2006) recomendam trabalhar no máximo com um grau de enchimento de 0,30 para processos FES, já que consideram que a mistura das partículas em um tambor horizontal é ineficiente para valores acima dessa capacidade. Porém, nos experimentos realizados nesta tese para graus de enchimento até 0,6 mostraram altas atividades enzimáticas, demonstrando que houve produção de celulasas muito ativas, otimizando a ocupação do equipamento e aumentando a produtividade do processo.

Rodríguez-Jasso et al. (2013) compararam a produção de fucoidanases a partir do fungo *Mucor* sp. 3P tendo algas como substrato. Os experimentos foram realizados por FES em biorreatores rotativos de dois tamanhos diferentes: 0,15L e 18L. A maior dificuldade que reportaram na transposição de escala foi o controle do conteúdo de umidade do substrato sólido afetando a produção final. Neste trabalho várias medidas de

Resultados e discussão

umidade do substrato foram realizadas após os processos fermentativos e esta sempre se manteve próxima a 75%, acreditando-se que tal controle tenha favorecido a metabolização das enzimas.

Zanelato (2011) cultivou *Myceliophthora thermophila* I1D3b em um reator de leito empacotado, tendo farelo de trigo e bagaço de cana como substratos, obtendo resultados similares aos obtidos no presente trabalho. Assim, para adequação de qual tipo de fermentador deva ser empregado em um processo industrial, estudos mais detalhados do processo completo devam ser realizados, onde os custos de projeto, de construção, de manutenção e da operacionalidade do processo sejam analisados para decidir-se pela tecnologia mais adequada. Finalmente, cabe ressaltar que as quatro etapas prévias à produção de celulasas por FES, em biorreator rotativo de bancada, proporcionaram as condições de operação necessárias à realização das fermentações e, além disso, logrou-se reunir várias etapas do processo no mesmo equipamento. Dentro dessas etapas encontra-se esterilização do substrato e do próprio equipamento, aspersão de solução nutriente e da suspensão de esporos ao meio, fermentação, aspersão de água destilada para a extração das enzimas e rotação do tambor para liberação das mesmas. As atividades enzimáticas obtidas em este equipamento foram altas, podendo ser considerando todo o sistema como promissor, sendo que estudos de otimização de variáveis devem ser realizados.

Levando em consideração os objetivos atingidos nas etapas já concretizadas, pode-se dizer que o equipamento encontra-se em estado avançado de desenvolvimento e pronto para realizar ensaios fermentativos de produção de celulasas a partir do fungo *Myceliophthora thermophila* I1D3b e utilizando o bagaço de cana e o farelo de trigo como substratos.



Conclusões

Esta tese se propôs desenvolver um fermentador rotativo para fermentação em estado sólido visando a produção de celulases, tendo bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo como substrato, e o fungo termófilo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b como agente da fermentação. O trabalho foi desenvolvido em cinco etapas, quais sejam: mistura e movimentação de partículas, sem fermentação; retenção de água pelas partículas; transferência de calor; tolerância do fungo à tensão de cisalhamento; e ensaios fermentativos propriamente ditos. Ao final destas etapas, pode-se concluir que:

- ✓ A mistura radial de partículas de bagaço de cana e farelo de trigo depende diretamente do grau de enchimento e é independente da frequência de rotação na qual foram realizados os experimentos. No tambor com agitação interna através de pás, foi observada uma relação linear do número de rotações necessárias a se obter a homogeneidade da mistura com a carga do tambor; porém, ao final do processo, foram observados espaços vazios no fundo do tambor e aglomeração ao redor das pás. No tambor rotativo com defletores, o número de rotações também apresentou uma relação linear com a carga de partículas, tanto em presença do tubo interno simulador de aeração quanto na sua ausência, observando-se mistura homogênea das partículas em todo o comprimento do tambor.
- ✓ Independentemente da velocidade de rotação, os experimentos realizados em presença do tubo simulador de aeração apresentaram região de movimentação lenta ao redor do tubo. Os experimentos realizados em ausência do tubo simulador apresentaram boa movimentação em todas as regiões do leito, incluindo a região central.
- ✓ Na fase ativa do leito, superfície do leito de partículas, as partículas tiveram velocidades próximas para todas as cargas, mostrando que na superfície livre

Conclusões

as velocidades das partículas dependem somente da velocidade rotacional do tambor. Tais velocidades foram próximas às velocidades lineares de rotação da parede. As menores velocidades foram detectadas na fase passiva, nas regiões centrais do leito, onde o padrão de escoamento observado foi uma menor velocidade de partícula às maiores cargas.

- ✓ O regime de movimentação detectado não foi descrito na literatura, pois constatou-se que as partículas descem sobre a superfície livre em blocos com movimentos periódicos, sendo que primeiro caem dois blocos pequenos e depois um bloco de maior tamanho. O tamanho do bloco de partículas formado aumentou conforme aumentou o número de Froude e o grau de enchimento.
- ✓ Os tempos necessários à homogeneidade axial obtidos no tambor com agitação interna através de pás são menores do que os obtidos para o tambor de parede rotativa, porém na descarga do material do tambor com pás rotativas foi observada concentração heterogênea do traçador. Os coeficientes de difusão efetiva axial foram obtidos e os resultados experimentais de variação axial de concentração de partículas foram bem ajustados pelo modelo difusivo.
- ✓ Os experimentos de retenção de água pelo leito de partículas de bagaço de cana e farelo de trigo no tambor rotativo com defletores revelaram que as variáveis volume de água aspergida por intervalo de aspersão e número de aspersores não influenciaram significativamente a retenção de água pelas partículas para os três graus de enchimento avaliados, que foi influenciada apenas pela vazão de água aspergida. A maior homogeneidade foi obtida com a maior vazão de água aspergida.
- ✓ Os experimentos da análise térmica do sistema mostraram que a ação sinérgica da aspersão de água e a rotação do tambor contribuem para um bom controle da temperatura, tanto para resfriamento quanto para aquecimento do leito de partículas. Os experimentos realizados com a posição fixa do tambor apresentaram gradientes radiais de temperatura expressivos, os quais foram praticamente eliminados em experimentos similares com rotação do tambor.
- ✓ As fermentações preliminares feitas em saquinhos de polipropileno mostraram que não é necessário realizar o pré-tratamento do substrato: lavagem, secagem, peneiramento e nova hidratação, para obter valores similares ou superiores

Conclusões

das atividades enzimáticas de celulases. Também foi evidente que o fungo *Myceliophthora termophila* I1D3b é intolerante à vibração excessiva.

- ✓ As fermentações realizadas no biorreator de alumínio revelaram que o fungo *Myceliophthora termophila* I1D3b é tolerante à rotação do tambor e as atividades enzimáticas obtidas foram em média superiores às dos sacos plásticos de polipropileno.
- ✓ As quatro etapas prévias à produção de celulases por FES, em biorreator rotativo de bancada, proporcionaram as condições de operação necessárias à realização das fermentações e, além disso, logrou-se reunir várias etapas do processo no mesmo equipamento. Dentro dessas etapas encontra-se esterilização do substrato e do próprio equipamento, aspersão de solução nutriente e suspensão de esporos ao meio, fermentação, aspersão de água destilada para a extração das enzimas e rotação do tambor para liberação das mesmas. As atividades enzimáticas obtidas em este equipamento foram elevadas, em média superiores às obtidas em sacos plásticos de polipropileno.
- ✓ O equipamento encontra-se em estado avançado de desenvolvimento e pronto para realizar ensaios fermentativos mais de talhados de produção de celulases a partir do fungo *Myceliophthora termophila* I1D3b e utilizando o bagaço de cana e o farelo de trigo como substratos.



Sugestões

Para a continuidade deste trabalho, sugere-se:

- ✓ Realizar o estudo da cinética de crescimento do fungo *Myceliophthora thermophila* I1D3b a fim de determinar o tipo de produção enzimática, consequentemente os tempos ótimos para agitação sem afetar a produção enzimática.
- ✓ Estudos de otimização da produção de enzimas que incluam vazão de ar e frequência de agitação do tambor como variáveis.
- ✓ Instrumentar o biorreator visando ao controle das variáveis chave do processo. Dentro dessas variáveis estão: a vazão de ar, aspersão de solução nutriente e suspensão de esporos, rotação do tambor, temperatura de entrada de ar e temperatura do sistema fermentativo.
- ✓ Realizar uma análise de transferência de calor onde haja crescimento de microrganismos e sejam incluídos modelos matemáticos para posterior simulação.
- ✓ Estudar o movimento da mistura bagaço de cana-farelo de trigo através de simulações em CFD (*Computational fluid dynamics*) ou DEM (*Discrete Element Method*), de modo a compreender a dinâmica de movimentação das partículas.



Bibliografía

AIDOO, K. E.; HENDY, R.; WOOD, J. B. Solid substrate fermentation. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v. 28, p. 201 – 237, 1982.

ARRUDA, E. B.; FAÇANHA, J. M. F.; PIRES, L. N.; ASSIS, A. J.; BARROZO, M. A. S. Conventional and modified rotary dryer: comparison of performance in fertilizer drying. **Chemical Engineering and Processing**, Karlsruhe, v. 48, p. 1414 – 1418, 2009.

ASAGBRA, A. E.; SANNI, A. I.; OYEWOLE, O.B. Solid-state fermentation production of tetracycline by *Streptomyces* strains using some agricultural wastes as substrate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 107 – 114, 2005.

ASHLEY, V. M.; MITCHELL, D. A.; HOWES, T. Evaluating strategies for overcoming overheating problems during solid-state fermentation in packed bed bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 3, n. 2, p. 141 – 150, 1999.

BABITHA, S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, p. 1554 – 1560, 2007.

BADHAN, A. K.; CHADHA, B. S.; KAUR, J. SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 3, p. 504 – 510, 2007.

BEESON IV, W. T.; IAVARONE, A. T.; HAUSMANN, C. D.; CATE, J. H. D.; MARLETTA, M. A. Extracellular aldono-lactonase from *Myceliophthora thermophila*. **Applied and environmental microbiology**, Washington DC, v. 77, n. 2, p. 650 – 656, 2010.

BERKA, R. M.; GRIGORIEV, I. V.; OTILLAR, R.; SALAMOV, A.; GRIMWOOD, J.; REID, I.; ISHMAEL, N.; JOHN, T.; DARMOND, C.; MOISAN, M. C.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P. M.; LOMBARD, V.; NATVIG, D. O.; LINDQUIST, E.; SCHMUTZ, J.; LUCAS, S.; HARRIS, P.; POWLOWSKI, J.; BELLEMARE, A.; TAYLOR, D.; BUTLER, G.; VRIES, R. P.; ALLIJN, I. E.; BRINK, J. V. D.; USHINSKY, S.; STORMS, R.; POWELL, A. J.; PAULSEN, I. T.; ELBOURNE, L. D. H.; BAKER, S. E.; MAGNUSON, J.; LABOISSIERE, S.; CLUTTERBUCK, A. J.; MARTINEZ, D.; WOGULIS, M.; LOPEZ DE LEON, A.; REY, M. W.; TSANG, A. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *thielavia terrestris*. **Nature biotechnology**, London, v. 29, n. 10, p. 922 – 927, 2011.

BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, Waterloo, v. 18, p. 355 – 383, 2000.

BOATENG, A. A.; BARR, P. V. Modelling of particle mixing and segregation in the transverse plane of a rotary kiln. **Chemical Engineering Science**, New York, v. 51, n. 17, p. 4167 – 4181, 1996.

BRINK, J. V. D.; MUISWINKEL, G. C. J. V.; THEELEN, B.; HINZ, S. W. A.; VRIES, R. P. Efficient Plant Biomass Degradation by Thermophilic Fungus *Myceliophthora heterothallica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 79, n. 4, p. 1316 – 1324, 2013.

BUCHERT, J.; OKSANEN, T.; PERE, J.; SIIKA-AHO, M.; SUURNÄKKI, A.; VIIKARI, L. Applications of *Trichoderma reesei* enzymes in the pulp and paper industry. In: HARMAN, G. F.; KUBICEK C. P. (Ed.). **Trichoderma and Gliocladiu**: v. 2, enzymes – biological control and commercial applications. London: **CRC Press**, 1998. p. 343 – 363.

BUCHHOLTZ, V.; PÖSCHEL, T.; TILLEMANS, H. Simulation of rotating drum experiments using non-circular particles, **Physica A**, Amsterdam, v. 216, n. 3, p. 199 – 212, 1995.

CAHN, D. S.; FUERSTENAU, D. W. Simulation of diffusional mixing of particulate solids by Monte Carlo techniques, **Powder Technology**, Lausanne, v. 1, p. 174 – 182, 1967.

CASCIATORI, F. P. Biorreatores de leito fixo para fermentação em estado sólido: ampliação de escala para produção de celulasas de origem fúngica, 2012. 96 f. Tese (Qualificação de Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2012.

CASCIATORI, F. P.; LAURENTINO, C. L.; LOPES, K. C. M.; SOUZA, A. G.; THOMÉO, J. C. Stagnant effective thermal conductivity of agro-industrial residues for solid-state fermentation. **International Journal of Food Properties**, London, v. 17, p. 1578 – 1593, 2013.

CHINN, M. S.; NOKES, S. E. Temperature control of a solid substrate cultivation deep – bed reactor using an internal heat exchanger. **Transactions of the ASAE**, Saint Joseph, v. 46, n. 6, p. 1741 – 1749, 2003.

CISAR, S. E.; OTTINO, J. M.; LUEPTOW, R. M. Geometric effects of mixing in 2D granular tumblers using discrete models. **Aiche Journal**, Houston, v. 53, p. 1151 – 1158, 2007.

CLEARY, P. W. Particulate mixing in a plough share mixer using DEM with realistic shaped particles. **Powder Technology**, Lausanne, v. 248, p. 103 – 120, 2013.

COUGHLAN, M. P. Cellulases: production, properties and applications. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 13, p. 405 – 406, 1985a.

COUGHLAN, M. P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, New Jersey, v. 3, p. 37 – 109, 1985b.

CRISTO, H.; MARTINS, M.; OLIVEIRA, L.; FRANCA, A. Transverse flow of coffee beans in rotating roasters. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 75, p. 142 – 148, 2006.

DAL GRANDE, F.; SANTOMASO, A.; CANU, P. Improving local composition measurements of binary mixtures by image analysis. **Powder Technology**, Lausanne, v. 187, p. 205 – 213, 2008.

DAUMANN, B.; NIRSCHL, H. Assessment of the mixing efficiency of solid mixtures by means of image analysis. **Powder Technology**, Lausanne, v. 182, p. 415 – 423, 2008.

Bibliografia

DIAZ, A. B.; ORY, I.; CARO, I.; BLANDINO, A. Solid state fermentation in a rotating drum bioreactor for the production of hydrolytic enzymes. **Chemical Engineering Transactions**, Milano, v. 17, p. 1041 – 1046, 2009.

DILLON, G. S.; BRAR, S. K.; KAUR, S.; VERM, M. Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor. **Industrial crops and products**, New York, v. 41, p. 78 – 84, 2013.

DURAND, A.; DE LA BROISE, D.; BLACHERE, H. Laboratory scale bioreactor for solid state processes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 8, p. 59 – 66, 1988.

DURAND, A.; RENAUD, R.; MARATRAY, J.; ALMANZA, S. The INRA-Dijon reactors: designs and applications. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SOLID STATE FERMENTATION, 2., 1995, Montpellier. **Proceedings...** Montpellier: Kluwer Academic, 1995. p. 71 – 92.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, p. 113 – 125, 2003.

EDUARDO, M. Desempenho e homogeneidade de cultivos em meio sólido de *Monascus sp.* em biorreator do tipo tambor com agitação interna: efeitos do padrão de agitação. 2010. 144 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

FANTOZZI, P.; PETRUCCIOLI, G.; MONTEDORO, G. Trattamenti con additivi enzimatici alle paste di oliva sottoposte ad estrazione, per pressione unica: Influenze delle cultivars, dell'epoca di raccolta e della conservazione. **Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, Milano, v. 54, p. 381 – 388, 1977.

FERNANDEZ, M.; PEREZ-CORREA, J. R.; SOLAR, I.; AGOSIN, E. Automation of a solid substrate cultivation pilot reactor. **Bioprocess Engineering**, New York, v. 16, p. 1 – 4, 1996.
FITTER, J.; HEBERLE, J. Structural equilibrium fluctuations in mesophilic and thermophilic α -amylase. **Biophysical journal**, Massachusetts, v. 79, p. 1629 – 1636, 2000.

FREIRE, J. T. Transferência de calor em meios porosos, 1979. 223 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1979.

Bibliografia

GALANTE, Y. M.; DE CONTI, A.; MONTEVERDI, R. Application of Trichoderma enzymes in food and feed industries. In: HARMAN, G. F.; KUBICEK C. P. (Ed.). **Trichoderma and Gliocladiu**: v. 2, enzymes – biological control and commercial applications. London: **CRC Press**, 1998a. p. 327 – 342.

GALANTE, Y. M.; DE CONTI, A.; MONTEVERDI, R. Application of Trichoderma enzymes in textile industry. In: HARMAN, G. F.; KUBICEK C. P. (Ed.). **Trichoderma and Gliocladiu**: v. 2, enzymes – biological control and commercial applications. London: **CRC Press**, 1998b. p. 311 – 326.

GHOSE, T K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, Research Triangle Park, v. 59, p. 257 – 268, 1987.

GOES, T.; MARRA, R. A expansão da cana-de-açúcar e sua sustentabilidade. Disponível em: <www.embrapa.br/.../A%20expansao%20da%20cana-de-acucar%20e%20a%20sua%20sustentabilidade.pdf>. Acesso em: 14 maio 2009.

GOLAN, A. E. **Cellulase**: types, actions, mechanisms and uses. New York: Nova Science Publishers, 2011, 306 p.

GOLDBECK, R.; RAMOS, M. M.; PEREIRA, G. A. G.; MAUGERI-FILHO, F. Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian Biome using different substrates. **Bioresource Technology**, Essex, v. 128, p. 797 – 803, 2013.

GOMES, I.; SARKAR, P. K.; RAHMAN, S. R.; RAHIM, M. A.; GOMES, D. J. Production of cellulase from *Talaromyces emersonii* and evaluation of its application in eco-friendly functional finishing of jute-based fabrics. **Bangladesh Journal Microbiology**, Bangladesh, v. 24, p. 109 – 114, 2007.

GOMEZ, R. J. Sacarificação da hemicelulose do bagaço de cana de açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus*. 1985. 137 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1985.

GRAJALES, L. M. Avaliação de um biorreator rotativo para fermentação em estado sólido, 2010. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

GRAJALES, L. M.; XAVIER, N. M.; HENRIQUE, J. P.; THOMEO, J. C. Mixing and motion of rice particles in a rotating drum. **Powder Technology**, Lausanne, v. 222, p. 167–175, 2012.

GRASSIN, C.; FAUQUEMBERGUE, P. Fruit juices. In: GODFREY, T.; WEST, S. (Ed.). **Industrial enzymology**. 2nd ed. New York: Macmillan, 1996. p. 226 – 383.

GUEN, L. L.; HUCHET, F.; DUMOULIN, J.; BAUDRU, Y.; TAMAGNY, P. Convective heat transfer analysis in aggregates rotary drum reactor. **Applied Thermal Engineering**, Amsterdam, v. 54, p. 131 – 139, 2013.

HARDIN, M. T.; HOWES, T.; MITCHELL, D. A. Residence time of gas flowing through rotating drum bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 74, n. 2, p. 145 – 153, 2001.

HEMERY, Y.; ROUAU, X.; DRAGAN, C.; BILICI, M.; BELECA, R.; DASCALESCU, L. Electrostatic properties of wheat bran and its constitutive layers: influence of particle size, composition, and moisture content. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 93, p. 114 – 124, 2009.

HENEIN, H.; BRIMACOMBE, J. K.; WATKINSON, A. P. Experimental study of transverse bed motion in rotary kilns. **Metallurgical and Materials Transactions**, Warrendale, v. 14, n. 2, p. 191 – 205, 1983.

HESELTIME, C. W. Solid state fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 14, p. 517 – 532, 1972.

HIROSUE, H. Axial mixing of particles in rotary dryers and coolers. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, Nagoya, v. 13, n. 5, p. 365 – 371, 1980.

HONG, D. C.; QUINN, P. V.; LUDING, S. Reverse Brazil nut problem: competition between percolation and condensation. **Physical Review Letters**, New York, v. 86, p. 3423 – 3426, 2001.

HUMPF, H. U.; SCHRIER, P. Bound aroma compounds from the fruit and the leaves of blackberry (*Rubus laciniata* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 39, p. 1830 – 1832, 1991.

INGRAM, A.; SEVILLE, J. P. K.; PARKER, D. J.; FANA, X.; FORSTERET, R. G. Axial and radial dispersion in rolling mode rotating drums. **Powder Technology**, Lausanne, v. 158, p. 76 – 91, 2005.

JIANG, M.; YONGZHI ZHAO, Y.; LIU, G.; ZHENG, J. Enhancing mixing of particles by baffles in a rotating drum mixer. **Particuology**, Beijing, v. 9, n. 3, p. 270 – 278, 2011.

KELBERT, F.; ROYERE, C. Lateral mixing and heat transfer in a rolling bed. **International Chemical Engineering**, New York, v. 31, n. 3, p. 441 – 449, 1991.

LAURENTINO, C. L. Transferência de calor em leitos fixos com aplicação em reatores de fermentação em estado sólido. 2007. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2007.

LI, C.; YANG, Z.; ZHANG, R. H. C.; ZHANG, D.; CHEN, S.; MA, L. Effect of ph on cellulase production and morphology of *Trichoderma reesei* and the application in cellulosic material hydrolysis. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 168, p. 470 – 477, 2013.

LONSANE, B. K.; SAUCEDO-CASTANEDA, A. G.; RAIMBAULT, B. M.; ROUSSOS, S.; VINIEGRA-GONZALEZ, G.; GHILDYAL, N. P.; RAMAKRISHNA, M.; KRISHNAIAH, M. M. Scale-up strategies for solid state fermentation systems. **Process Biochemistry**, London, v. 27, p. 259 – 273, 1992.

MANDELS, M. Applications of cellulases. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 13, p. 414 – 415, 1985.

MANICKAM, S. S.; SHAH, R.; TOMEI, J.; BERGMAN, T. L.; CHAUDHURI, B. Investigating mixing in a multi-dimensional rotary mixer: experiments and simulations. **Powder Technology**, Lausanne, v. 201, p. 83 – 92, 2010.

MARIKH, K.; BERTHIAUX, H.; MIZONOV, V.; BARANTSEVA, E.; PONOMAREV, D. Flow analysis and markov chain modelling to quantify the agitation effect in a continuous powder mixer. **Chemical Engineering Research and Design**, London, v. 84, n. A11, p. 1059 – 1074, 2006.

Bibliografia

MARSH, A. J.; STUART, D. M.; MITCHELL, D. A.; HOWES, T. Characterizing mixing in a rotating drum bioreactor for solid-state fermentation. **Biotechnology Letters**, Dodrecht, v. 22, p. 473 – 477. 2000.

McCABE, W. L.; SMITH, J. C.; HARRIOT, P. **Operaciones unitarias en ingeniería química**. Madrid: McGraw-Hill, 1991. 1112 p.

McCARTHY, J. J.; KHAKHAR, D. V.; OTTINO, J. M. Computational studies of granular mixing. **Powder Technology**, Lausanne, v. 109, p. 72 – 82, 2000.

MELLMANN, J. The transverse motion of solids in rotating cylinders - forms of motion and transition behavior. **Powder Technology**, Lausanne, v. 118, p. 251 – 270, 2001.

MELLMANN, J.; SPECHT, E.; LIU, X. Prediction of rolling bed motion in rotating cylinders. **Aiche Journal**, New York, v. 50, n. 11, p. 2783–2793, 2004.

MITCHELL, D. A.; VON MEIEN, O. F.; LUZ JR., L. F. L.; KRIEGER, N. Evaluation of productivity of Zymotis solid-state bioreactor based on total reactor volume. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 40, n. 2, p. 135 – 144, 2002.

MISHIMA, D.; TATEDA, M.; IKE, M.; FUJITA, M. Comparative study on chemical pretreatments to accelerate enzymatic hydrolysis of aquatic macrophyte biomass used in water purification processes. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 16, p. 2166 – 2172, 2006.

MOO-YOUNG, M.; MOREIRA, A. R.; TENGEDY, R. P. Principles of solid-substrate fermentation. In: SMITH, J. E.; BERRY, D. R.; KRISTIANSEN, B. (Ed.). **The Filamentous Fungi**, v. 4, London: Edward Arnold, 1983. p. 117 – 144.

MORETI, M. Produção de ligno-hemi-celulases por fermentação em estado sólido e avaliação dos efeitos da aplicação das enzimas na composição química e estrutura do bagaço de cana, 2013. 129 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2013.

MUZZIO, F.J.; GOODRIDGE, C. L.; ALEXANDER, A.; ARRATIA, P.; YANG, H.; SUDAH, O.; MERGEN, G. Sampling and characterization of pharmaceutical powders and granular blends. **International Journal of Pharmaceutics**, London, v. 250, p. 51 – 64, 2003.

NAGEL, F. J. Process control of solid-state fermentation: simultaneous control of temperature and moisture content. 2002. 192 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Wageningen Universiteit, Wageningen, 2002.

NAGEL, F. J. I.; TRAMPER, J.; BAKKER, M. S. N.; RINZEMA, A. Model for on-line moisture content control during solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 72, p. 231 – 243, 2001.

NG, T. B.; CHEUNG, R. C. F. Cellulase: types, actions, mechanisms and uses. In: GOLAN, A. E. **Cellulase: types, actions, mechanisms and uses**. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2011. p. 251-264.

ORPE, A. V.; KHAKHAR, D. V. Scaling relations for granular flow in quasi-two-dimensional rotating cylinders. **Physical Review E: Statistical, Nonlinear and Soft Matter Physics**, New York, v. 64, n. 3, p. 1 – 13, 2001.

PANDEY, A. Recent process developments in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 27, n. 2, p. 109 – 117, 1992.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, London, v. 35, n. 10, p. 1153 – 1169, 2000.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGAM, P. **Solid – State Fermentation in Biotechnology: fundamentals and applications**. New Delhi: Asiatech Publishers, 2001. 221 p.

PATHANIA, S.; SHARMA, N.; VERMA, S. K. Optimization of cellulase-free xylanase produced by a potential *Thermoalkalophilic paenibacillus* sp. n1 isolated from hot springs of northern Himalayas in India. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, Nitra, v. 2, n. 1, p. 1 – 24, 2012.

PUYVELDE, D. R. V.; YOUNG, B. R.; WILSON, M. A.; SCHMIDT, S. J. Experimental determination of transverse mixing kinetics in a rolling drum by image analysis. **Powder Technology**, Lausanne, v. 106, p. 183 – 191, 1999.

Bibliografia

PUYVELDE, D. R. V. Simulating the mixing and segregation of solids in the transverse section of a rotating kiln. **Powder Technology**, Lausanne, v. 164, p. 1 – 12, 2006.

RABELO, S. C. Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. 2007. 150 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGHANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, p. 127 – 135, 2002.

RANI, R.; KUMAR, A.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 44, p. 13–18, 2009.

REESE, E. T. History of the cellulase program at the US Army Natick development center. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, New Jersey, v. 6, p. 9 – 20, 1976.

REESE, E. T.; MANDELS, M. Rolling with the time: production and applications of *Trichoderma reesei* cellulase. **Annual Reports of Fermentation Processes**, Orlando, v. 7, p. 1 – 20, 1984.

RIEDEL, K.; RITTER, J.; BRONNENMEIER, K. Synergistic interaction of the *Clostridium stercorarium* cellulases Avicelase I (Cel Z) and Avicelase II (Cel Y) in the degradation cellulose. **FEMS Microbiology Letters**, Birmingham, v. 147, p. 239 – 243, 1997.

RODRIGUEZ-JASSO, R. M.; MUSSATTO, S. I.; SEPÚLVEDA, L.; AGRASAR, A. T.; PASTRANA, L.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Fungal fucoidanase production by solid-state fermentation in a rotating drum bioreactor using algal biomass as substrate. **Food and bioproducts processing**, Christchurch, v. 91, p. 587 – 594, 2013.

RODRIGUEZ, S.; LOPEZ, E.; SANROMAN, M. Utilisation of grape seeds for laccase production in solid-state fermentors. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 74, p.263–267, 2006.

Bibliografía

RODRIGUEZ, S.; SAROMÁN, M. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 22, p. 211 – 219, 2005.

RODRIGUEZ, S.; SANROMAN, M. Application of solid-state fermentation to food industry: a review. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 76, n. 3, p. 291 – 302, 2006.

ROGERS, R. S. C.; GARDNER, R. P. A Monte Carlo method for simulating dispersion and transport through horizontal rotating cylinders. **Powder Technology**, Lausanne, v. 23, p. 159 – 167, 1979.

SALAR, R. K.; ANEJA, K. R. Thermophilic fungi: taxonomy and biogeography. **Journal of Agricultural Technology**, Tehran, v. 3, n. 1, p. 77 – 107, 2007.

SANTOMASO, A. C.; DING, D. L.; LICKISS, J. R.; YORK, D. W. Investigation of the granular behavior in a rotating drum operated over a wide range of rotational speed. **Transactions of the Institution of Chemical Engineers**, London, v. 81, p. 936 – 945, 2003.

SANTOMASO, A.; OLIVI, M.; CANU, P. Mechanisms of mixing of granular materials in drum mixers under rolling regime. **Chemical Engineering Science**, New York, v. 59, p. 3269 – 3280, 2004.

SANTOS, D. A.; PETRI, I. J.; DUARTE, C. R.; BARROZO, M. A. S. Experimental and CFD study of the hydrodynamic behavior in a rotating drum. **Powder Technology**, Lausanne, v. 250, p. 52 – 62, 2013a.

SANTOS, F. A.; QUEIROZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; MANFREDI, M.; QUEIROZ, M. E.; CALDAS, C. S.; SOARES, F. E. F. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 56 – 62, 2014.

SATO, K.; SUDO, S. Small-scale solid-state fermentations. In: DEMAIN, A. L.; DAVIES, J. E. (Ed.). **Manual of industrial microbiology and biotechnology**. 2nd ed. Washington DC: ASM Press, 1999. p. 61 - 79.

Bibliografia

SCHUTYSER, M. WEBER, F.; BRIELS, W.; BOOM, R.; RINZEMA, A. Three dimensional simulation of grain mixing in three different rotating drum designs for solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 79, n. 3, p. 284 – 294, 2002.

SCHUTYSER, M.; WEBER, F.; BRIELS, W.; BOOM, R.; RINZEMA, A. Heat and water transfer in a rotating drum containing solid substrate particles. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 82, n. 5, p. 552 – 563, 2003.

SHERITT, R. G.; CHAOUKI, J.; MEHROTRAC, A. K.; BEHIEC, L. A. Axial dispersion in the three-dimensional mixing of particles in a rotating drum reactor. **Chemical Engineering Science**, Saint Lucia, v. 58, p. 401 – 415, 2003.

SHIOTA, V. M. Secagem de celulases de origem fúngica por spray-dryer, 2013. 90 f. Dissertação (Qualificação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2013.

SILVA, V. L. M. M.; GOMES, W. C.; ALSINA, O. L. S. Utilização do bagaço de cana de açúcar como biomassa adsorvente na adsorção de poluentes orgânicos. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 2, p. 27 – 32, 2007.

SIMSEK, E.; SUDBROCK, F.; WIRTZ, S.; SCHERER, V. Influence of particle diameter and material properties on mixing of monodisperse spheres on a grate: Experiments and discrete element simulation. **Powder Technology**, Lausanne, v. 221, p. 144 – 154, 2012.

SINGHANIAA, R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation, **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 44, p. 13 – 18, 2009.

SOARES, P. A.; ROSELL, C. E. V. **Conversão da celulose pela tecnologia Organosolv**. São Paulo:Nova Série, 2009. p. 29.

SONI, R.; NAZIR, A.; CHADHA B. S.; SAINI, H. S. Novel sources of fungal cellulases for efficient deinking of composite paper wast, **Bioresource Technology**, Essex, v. 3, n. 1, p. 234 – 246, 2008.

SPIEGEL, M. **Fourier analysis with applications to boundary value problems**. New York: McGraw – Hill, 1974, 271 p.

Bibliografia

TALLON, S.; DAVIES, C. In-situ monitoring of axial particle mixing in a rotating drum using bulk density measurements. **Powder Technology**, Lausanne, v. 186, p. 22 – 30, 2008.

UHLIG, H. **Industrial enzymes and their applications**. New York: John Wiley and Sons, 1998. 435 p.

UMSZA-GUEZ, M. A. Produção de poligalacturonase em fermentação em estado sólido pelo fungo *Thermomucor indicae – seudaticae* № 31 em escala de frascos e biorreator de leito fixo. 2009. 106 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.

UNICA. Área plantada com cana de açúcar. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/historico-de-area-ibge.php?idMn=33&tipoHistorico=5&acao=visualizar&idTabela=1360&produto=%C3%81rea+Plantada&anoIni=2011&anoFim=2011&estado=RS%2CSC%2CPR%2CSP%2CRJ%2CMG%2CES%2CMS%2CMT%2CGO%2CDF%2CBA%2CSE%2CAL%2CPE%2CPB%2CRN%2CCE%2CPI%2CMA%2CTO%2CPA%2CAP%2CRO%2CAM%2CAC%2CRR>>. Acesso em: 10 outubro 2013.

WES, G.; DRINKENBURG, A.; STEMERDING, S. Heat transfer in a horizontal rotary drum reactor. **Powder Technology**, Lausanne, v. 13, p. 185 – 192, 1976a.

WES, G.; DRINKENBURG, A.; STEMERDING, S. Solids mixing and residence time distribution in a horizontal rotary drum reactor. **Powder Technology**, Lausanne, v. 13, p. 177 – 184, 1976b.

WILLIAMS, J. C.; KHAN, M. I. The mixing and segregation of particulate solids of different particle size. **Chemical Engineering**, London, v. 269, p.19 – 25, 1973.

ZANELATO, A. I. Produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido em biorreator de leito fixo. 2011. 116 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2011.

Bibliografia

ZANELATO, A. I.; SHIOTA, V. M.; GOMES, E.; DA SILVA, R.; THOMEO, J. C. Endoglucanase production with the newly isolated *Myceliophthora* sp. I-1D3b in a packed bed solid state fermentor. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, p. 1536 – 1544, 2012.

ZANPHORLIN, L. M.; Facchini, F. D. A.; Vasconcelos, F.; Bonugli-Santos, R. C.; Rodrigues, A.; Sette, L. D.; Gomes, E.; Bonilla-Rodriguez, G. O. Production, partial characterization, and immobilization in alginate beads of an alkaline protease from a new thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **The Journal of microbiology**, Daejeon, v. 48, n. 3, p. 331 – 336, 2010.

Apêndice

Apêndice A

Solução analítica da equação do modelo de dispersão axial

A dispersão axial das partículas em um tambor rotativo que opera em batelada é representada pela Equação da Difusão (HIROSUE, 1980; MARSH et al., 2000). Portanto:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} , \quad \text{A1}$$

onde C é a concentração de traçador (porcentagem),

t é o tempo (minutos),

D é o coeficiente de dispersão axial (cm^2/min),

z é a posição axial (cm).

As condições de contorno da Figura A1, são descritas matematicamente por:

$$z = 0 : \quad \frac{dC}{dz} = 0 ,$$

$$z = L : \quad \frac{dC}{dz} = 0 .$$

Para o traçador, as condições iniciais são:

$$t = 0 : \quad \begin{array}{ll} z < l , & C = C_0 . \\ z \geq l , & C = 0 . \end{array}$$

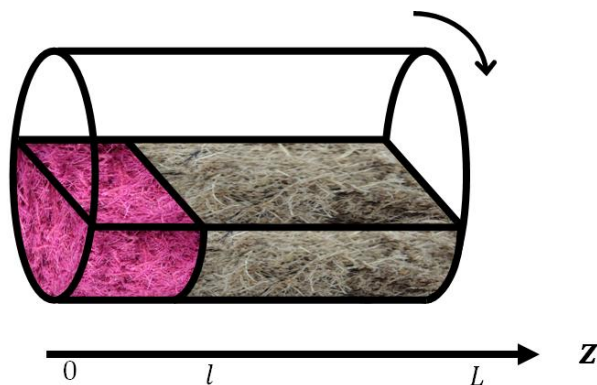


Figura A1. Esquema das condições iniciais e de contorno.

Para resolver a Equação A1 usa-se o método de separação de variáveis, isto é,

$$C(z, t) = F(z) \times G(t) . \quad \text{A2}$$

Desta forma,

Apêndice

$$F \frac{\partial G}{\partial t} = D G \frac{\partial^2 F}{\partial z^2} .$$

Como F e G são funções de variáveis independentes, z e t , respectivamente, resulta:

$$\frac{1}{D G} \frac{\partial G}{\partial t} = \frac{1}{F} \frac{\partial^2 F}{\partial z^2} = -\gamma^2 ,$$

onde γ é uma constante real.

A solução para a equação que depende do tempo, t , calcula-se

$$\begin{aligned} \frac{1}{D G} \frac{dG}{dt} &= -\gamma^2 & \rightarrow & \quad \frac{1}{G} dG = -\gamma^2 D dt \\ & & \rightarrow & \quad G(t) = C_1 \exp(-\gamma^2 D t) . \end{aligned} \quad \text{A3}$$

A solução para a equação que depende da posição, z , calcula-se

$$\begin{aligned} \frac{1}{F} \frac{\partial^2 F}{\partial z^2} &= -\gamma^2 & \rightarrow & \quad \frac{\partial^2 F}{\partial z^2} + \gamma^2 F = 0 \\ & & \rightarrow & \quad F(z) = C_2 \cos(\gamma z) + C_3 \sin(\gamma z) . \end{aligned} \quad \text{A4}$$

Aplicando as condições de contorno,

$$z = 0 : \quad \frac{dC}{dz} = 0 \quad \wedge \quad \frac{dF}{dz} = 0 .$$

$$z = L : \quad \frac{dC}{dz} = 0 \quad \wedge \quad \frac{dF}{dz} = 0 .$$

Assim,

$$\left. \frac{dF}{dz} \right|_{z=0} = -\gamma C_2 \sin(\gamma z) + \gamma C_3 \cos(\gamma z) = 0 \quad \rightarrow \quad C_3 = 0 .$$

$$\left. \frac{dF}{dz} \right|_{z=L} = -\gamma C_2 \sin(\gamma L) = 0 \quad \rightarrow \quad C_2 \neq 0 .$$

$$\sin(\gamma L) = 0 \quad \rightarrow \quad \gamma L = n\pi , \quad n = 0, 1, 2, \dots$$

$$\gamma = \frac{n\pi}{L} \quad n = 0, 1, 2, \dots \quad \text{A5}$$

$$F(z) = C_{2,n} \cos\left(\frac{n\pi}{L} z\right) . \quad \text{A6}$$

Substituindo a Equação A5 na Equação A3:

$$G(t) = C_1 \exp\left(-\frac{n^2 \pi^2}{L^2} D t\right) . \quad \text{A7}$$

Apêndice

Substituindo as Equações A6 e A7 na Equação A2:

$$C_n(z, t) = C_1 \exp\left(-\frac{n^2\pi^2}{L^2} D t\right) \times C_{2,n} \cos\left(\frac{n\pi}{L} z\right).$$

Rearranjando:

$$C_n(z, t) = a_n \cos\left(\frac{n\pi}{L} z\right) \exp\left(-\frac{n^2\pi^2}{L^2} D t\right), \quad \text{A8}$$

onde $a_n = C_1 \times C_{2,n}$. Note-se a dependência da solução com respeito à variável n .

O princípio de superposição (SPIEGEL, 1974), diz que a combinação linear das soluções também é solução, assim:

$$C(z, t) = \sum_{n=0} B_n \times C_n(z, t),$$

$$C(z, t) = \sum_{n=0} A_n \cos\left(\frac{n\pi}{L} z\right) \exp\left(-\frac{n^2\pi^2}{L^2} D t\right), \quad \text{A9}$$

onde $A_n = a_n \times B_n$. Equivalentemente,

$$C(z, t) = A_0 + \sum_{n=1} A_n \cos\left(\frac{n\pi}{L} z\right) \exp\left(-\frac{n^2\pi^2}{L^2} D t\right) \quad \text{A10}$$

Determinação do A_0 :

Para $t = 0$, e integrando a Equação A10 para o comprimento do tambor, o qual esta entre 0 e L :

$$\int_0^L C(z, 0) dz = \int_0^L A_0 dz + \sum_{n=1} A_n \int_0^L \cos\left(\frac{n\pi}{L} z\right) dz. \quad \text{A11}$$

Pode-se ver que:

$$\begin{aligned} \int_0^L \cos\left(\frac{n\pi}{L} z\right) dz &= \frac{L}{n\pi} \int_0^L \cos\left(\frac{n\pi}{L} z\right) d\left(\frac{n\pi z}{L}\right) \\ &= \frac{L}{n\pi} \left\{ \sin\left(\frac{n\pi}{L} z\right) \Big|_0^L \right\} \\ &= \frac{L}{n\pi} \left\{ \sin\left(\frac{n\pi}{L} L\right) - \sin(0) \right\} = 0. \end{aligned}$$

Substituindo este resultado na Equação A11:

$$A_0 = \frac{1}{L} \int_0^L C(z, 0) dz \quad \text{A12}$$

Apêndice

Aplicando as condições iniciais na Equação A12:

$$\begin{aligned}
 A_0 &= \frac{1}{L} \left\{ \int_0^L C(z, 0) dz + \int_l^L C(z, 0) dz \right\} \\
 &= \frac{1}{L} \left\{ \int_0^L C_0 dz + 0 \right\} \\
 &= \frac{C_0 l}{L}
 \end{aligned}
 \tag{A13}$$

Determinação de A_n :

Da teoria da ortogonalidade (SPIEGEL, 1974), sabe-se:

$$\int_0^L \cos\left(\frac{n\pi}{L}z\right) \cos\left(\frac{m\pi}{L}z\right) dz = \begin{cases} 0, & n \neq m \\ L/2, & n = m \end{cases}$$

Para $t = 0$, multiplicando a Equação A10 por $\cos\left(\frac{m\pi}{L}z\right)$ e integrando entre 0 e L :

$$\begin{aligned}
 \int_0^L C(z, 0) \cos\left(\frac{m\pi}{L}z\right) dz \\
 = A_0 \int_0^L \cos\left(\frac{m\pi}{L}z\right) dz + \sum_{n=1}^{\infty} A_n \int_0^L \cos\left(\frac{n\pi}{L}z\right) \cos\left(\frac{m\pi}{L}z\right) dz.
 \end{aligned}$$

Sabe-se que $\int_0^L \cos\left(\frac{m\pi}{L}z\right) dz = 0$, assim:

$$\int_0^L C(z, 0) \cos\left(\frac{m\pi}{L}z\right) dz = \sum_{n=1}^{\infty} A_n \int_0^L \cos\left(\frac{n\pi}{L}z\right) \cos\left(\frac{m\pi}{L}z\right) dz.$$

Desenvolvendo a somatória,

$$\begin{aligned}
 \int_0^L C(z, 0) \cos\left(\frac{m\pi}{L}z\right) dz \\
 = A_1 \int_0^L \cos\left(\frac{\pi}{L}z\right) \cos\left(\frac{m\pi}{L}z\right) dz + \dots + A_m \int_0^L \cos\left(\frac{m\pi}{L}z\right) \cos\left(\frac{m\pi}{L}z\right) dz + \dots
 \end{aligned}$$

Aplicando a ortogonalidade na equação anterior, resulta:

$$\begin{aligned}
 \int_0^L C(z, 0) \cos\left(\frac{m\pi}{L}z\right) dz &= A_m \frac{L}{2} \\
 A_m &= \frac{2}{L} \int_0^L C(z, 0) \cos\left(\frac{m\pi}{L}z\right) dz
 \end{aligned}
 \tag{A14}$$

Aplicando as condições iniciais na Equação A14:

Apêndice

$$\begin{aligned}
 A_m &= \frac{2}{L} \left\{ \int_0^l C(z, 0) \cos \left(\frac{m\pi}{L} z \right) dz + \int_l^L C(z, 0) \cos \left(\frac{m\pi}{L} z \right) dz \right\} \\
 &= \frac{2}{L} \left\{ \int_0^l C_0 \cos \left(\frac{m\pi}{L} z \right) dz + 0 \right\} \\
 &= \frac{2 C_0}{L} \int_0^l \cos \left(\frac{m\pi}{L} z \right) dz \\
 &= \frac{2 C_0}{L} \left(\frac{L}{m\pi} \right) \int_0^l \cos \left(\frac{m\pi}{L} z \right) d \left(\frac{m\pi z}{L} \right) \\
 &= \frac{2 C_0}{m \pi} \left. \sin \left(\frac{m\pi z}{L} \right) \right|_0^l \\
 &= \frac{2 C_0}{m \pi} \sin \left(\frac{m\pi l}{L} \right)
 \end{aligned}$$

Equivalentemente,

$$A_n = \frac{2 C_0}{n \pi} \sin \left(\frac{n\pi l}{L} \right) \quad \text{A15}$$

Substituindo as Equações A13 e A15 na Equação A10:

$$C(z, t) = \frac{C_0 l}{L} + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2 C_0}{n \pi} \sin \left(\frac{n\pi l}{L} \right) \cos \left(\frac{n\pi}{L} z \right) \exp \left(-\frac{n^2 \pi^2}{L^2} D t \right)$$

Rearranjando:

$$\boxed{\frac{C}{C_0} = \frac{l}{L} + \frac{2}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n} \sin \left(\frac{n\pi l}{L} \right) \cos \left(\frac{n\pi z}{L} \right) \exp \left(-\frac{n^2 \pi^2}{L^2} D t \right)} \quad \text{A16}$$

Apêndice B**Programa para a simulação da mistura axial de partículas em tambor rotativo****Modelo:**

```

function dC = modelo(t,C,D,dz,N)                                %Método de
                                                                Diferenças finitas semi-discreta (só em z)
dC = [2*D*( C(2) - C(1) )/(dz^2);                               %Nó 1 (z = 0):
                                                                i=1
D*( C(3:N) - 2*C(2:N-1) + C(1:N-2) )/(dz^2);                 %Nós internos:
i=2:N-1
2*D*( C(N-1) - C(N) )/(dz^2)];                                %Nó N (z = L):
                                                                i=N

```

Solução do modelo:

```

clc, clear all, close all

l = 18; %cm
L = 60; %cm
N = 60; %Número de partições
D = 2.34; %cm^2/min varia para cada carga e frequência de rotação
Cinicial = 100; % Concentração inicial do traçador

dz = L/N;
z = (0:N)*dz;
C0 = zeros(N+1,1);
for i = 1:N+1
    if z(i) <= l
        C0(i) = Cinicial;
    end
end

t = 0:600; %Tempos requeridos [min] 0:600; %[0:10:100 120:20:200
250:50:600];%

[t,C]=ode45(@modelo,t,C0,[],D,dz,N+1); %[] opções de integração

tt =0:15:600;% 0:15:45 %; %Tempos requeridos [min]
[tt,CC]=ode15s(@modelo,tt,C0,[],D,dz,N+1); %[] opções de integração

```

Apêndice

%Concentrações em varias regiões de "z"

```
xlswrite('ConcentraçõesSimuladas.xlsx',{'Tempo (min)'},1,'A2')
xlswrite('ConcentraçõesSimuladas.xlsx',{'z=0cm '},1,'B2')
xlswrite('ConcentraçõesSimuladas.xlsx',{'z=7,5cm '},1,'C2')
xlswrite('ConcentraçõesSimuladas.xlsx',{'z=17,5cm '},1,'D2')
xlswrite('ConcentraçõesSimuladas.xlsx',{'z=29,5cm '},1,'E2')
xlswrite('ConcentraçõesSimuladas.xlsx',{'z=43cm '},1,'F2')
xlswrite('ConcentraçõesSimuladas.xlsx',{'z=52,5cm '},1,'G2')
xlswrite('ConcentraçõesSimuladas.xlsx',[tt CC(:,1) mean(CC(:,1:16))'
mean(CC(:,11:26))' mean(CC(:,23:38))' mean(CC(:,36:51))'
mean(CC(:,46:61))'],1,'A3')
```

%Cria um documento no Excel e coloca todos os valores solicitados de concentração de traçador simulados

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 20 de Fevereiro de 2014

Assinatura

Lina María Grajales Agudelo