

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

**NATHÁLIA FELIPE CAMPAGNARO PERUCH**

**Estudo da capacidade de transferência de oxigênio de um biorreator não  
convencional empregando o método de oxidação de sulfito**

Lorena  
2022

NATHÁLIA FELIPE CAMPAGNARO PERUCH

**Estudo da capacidade de transferência de oxigênio de um biorreator não  
convencional empregando o método de oxidação de sulfito**

Monografia de conclusão de curso  
apresentado à Escola de Engenharia  
de Lorena - Universidade de São Paulo  
como requisito legal para a conclusão  
de graduação no curso de Engenharia  
Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Márcio  
Ramalho Prata

Lorena

2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado  
da Escola de Engenharia de Lorena,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Peruch, Nathália Felipe Campagnaro  
Estudo da capacidade de transferência de oxigênio  
de um biorreator não convencional empregando o  
método de oxidação de sulfito / Nathália Felipe  
Campagnaro Peruch; orientador Arnaldo Márcio Ramalho  
Prata. - Lorena, 2022.  
54 p.

Monografia apresentada como requisito parcial  
para a conclusão de Graduação do Curso de Engenharia  
Bioquímica - Escola de Engenharia de Lorena da  
Universidade de São Paulo. 2022

1. Biorreator não convencional. 2. Transferência  
de oxigênio. 3. Kla. 4. Oxidação de sulfito de sódio.  
I. Título. II. Prata, Arnaldo Márcio Ramalho, orient.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DO TRABALHO DE  
CONCLUSÃO DE CURSO DO ALUNO Nathália Felipe Campagnaro Peruch,  
ORIENTADO PELO PROF. Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata



---

ASSINATURA DO ORIENTADOR

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Eliane e Marco, minhas irmãs, Kamila e  
Mariane, meus avós e meus amigos,  
por toda paciência, compreensão e  
apoio nesta trajetória.*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Eliane e Marco, minhas irmãs, Kamila e Mariane, por estarem sempre ao meu lado nos momentos bons e ruins. Aos meus avós, pelos aprendizados ao longo dos anos. Obrigada por terem me apoiado a ir para Lorena, por sempre me acolherem e por me fazer acreditar em mim mesma.

Aos meus amigos de Itabatan, que me impulsionaram a ser uma pessoa cada vez melhor. Obrigada por acreditarem em mim e por se fazerem presentes mesmo na distância.

Às amizades que construí ao longo dessa trajetória. Aos amigos que passaram por Lorena e, em especial, as amizades construídas na república. Por todos os momentos de angústia e de alegria que vivemos juntas. Obrigada por sempre me motivarem e por serem a minha segunda família. Por todo o aprendizado e por terem deixado suas marcas em minha vida.

Ao Projeto Criança Feliz, à Teatreria Clube da Lua e ao Centro Acadêmico que fizeram parte do meu caminho e contribuíram para meu crescimento e desenvolvimento pessoal. Obrigada por tantos momentos juntos.

A todos os professores do curso, que desempenharam com dedicação e competência a sua profissão, contribuindo com minha vida acadêmica e profissional.

Dedico especial agradecimento ao meu orientador Prof. Dr. Arnaldo Márcio, pela dedicação, paciência e atenção na orientação deste trabalho. Obrigada por todo o apoio nos obstáculos que surgiram ao longo da execução dos testes.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram com meu desenvolvimento pessoal e profissional e para a realização e conclusão deste trabalho, que encerra mais um ciclo da minha vida.

## RESUMO

PERUCH, Nathália Felipe Campagnaro. **Estudo da capacidade de transferência de oxigênio de um biorreator não convencional empregando o método de oxidação de sulfito.** 2022. Monografia (Trabalho de conclusão de curso em Engenharia Bioquímica) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2022.

A transferência de oxigênio é um parâmetro importante para os processos biotecnológicos podendo ser a chave para uma melhor eficiência destes. Dessa maneira, diversos estudos abordam extensivas investigações sobre o  $k_{La}$ , sendo o parâmetro que representa a transferência de oxigênio, sendo essencial para ampliação de escala da maioria dos bioprocessos. Porém, são pesquisas voltadas para reatores convencionais como o reator tipo tanque agitado (STR). Diante de limitações nos processos fermentativos, como adesão e cisalhamento de células, é necessária a busca por novas alternativas. O biorreator não convencional, denominado biorreator agitado e aerado de baixo cisalhamento (BAABC), foi criado para melhorar os processos fermentativos com fungos filamentosos, incluindo o uso para demais células sensíveis ao cisalhamento. Com os resultados promissores nos estudos realizados com BAABC, outras possibilidades de aplicação ainda precisarão ser compreendidas. Portanto, neste trabalho pretendeu-se determinar a capacidade de transferência de oxigênio em função da agitação e aeração no biorreator não convencional BAABC, comparando-o com o biorreator STR. O método utilizado foi o da oxidação do sulfito, tendo em vista a impossibilidade de se empregar uma sonda de oxigênio dissolvido no BAABC. Verificou-se que o método empregado fornece valores superestimados de  $k_{La}$  quando comparado com o método dinâmico. Os resultados mostraram que a transferência de oxigênio no BAABC é inferior que no STR. Houve dificuldade para se estabelecer uma correlação entre os reatores STR e BAABC em termos de transferência de oxigênio devido à perda de linearidade dos valores de  $k_{La}$  em elevadas velocidades de agitação e aeração. Há questões sobre a aplicabilidade do método em biorreatores que ainda precisam ser averiguadas.

Palavras-chave: Biorreator não convencional. Transferência de oxigênio.  $k_{La}$ . Oxidação de sulfito de sódio.

## ABSTRACT

PERUCH, Nathália Felipe Campagnaro. **Study of the oxygen transfer capacity of an unconventional bioreactor using the sulfite oxidation method.** 2022. Monografia (Trabalho de conclusão de curso em Engenharia Bioquímica) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2022.

Oxygen transfer is an important parameter for biotechnological processes and may be the key to better efficiency. Thus, several studies approach extensive investigations on  $k_{La}$ , which is the parameter that represents the transfer of oxygen, being essential for scaling up most bioprocesses. However, research is focused on conventional reactors such as the stirred tank reactor (STR). Faced with limitations in fermentation processes, such as cell adhesion and shear, it is necessary to search for new alternatives. The unconventional bioreactor, called low-shear agitated and aerated bioreactor (LSAAB), was created to improve fermentative processes with filamentous fungi, including use for other shear-sensitive cells. With the promising results in the studies carried out with LSAAB, other application possibilities still need to be understood. Therefore, this work aimed to determine the oxygen transfer capacity as a function of agitation and aeration in the unconventional LSAAB bioreactor, comparing it with the STR bioreactor. The method used was sulfite oxidation, given the impossibility of using a dissolved oxygen probe in the LSAAB. It was found that the method used provides overestimated values of  $k_{La}$  when compared with the dynamic method. The results showed that the oxygen transfer in LSAAB is lower than in STR. It was difficult to establish a correlation between the STR and LSAAB reactors in terms of oxygen transfer due to the loss of linearity of  $k_{La}$  values at high speeds of agitation and aeration. There are questions about the applicability of the method in bioreactors that still need to be investigated.

Keywords: Unconventional Bioreactor. Oxygen transfer.  $k_{La}$ . Sodium sulphite oxidation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de um típico Stirred Tank Reactor.....	24
Figura 2 - Diagrama esquemático do Biorreator Agitado e Aerado de Baixo Cisalhamento.....	26
Figura 3 - Resultados do ensaio realizado em frasco agitado.....	35
Figura 4 - Resultados obtidos nos ensaios realizados no reator de tanque agitado (STR).....	37
Figura 5 - Variação do $k_{La}$ encontrado para cada condição no ensaio realizado com reator de tanque agitado (STR).....	38
Figura 6 - Resultados obtidos nos ensaios realizados no biorreator não convencional (BAABC).....	40
Figura 7 - Variação do $k_{La}$ encontrado para cada condição no ensaio realizado com biorreator não convencional (BAABC).....	41
Figura 8 - Correlação dos valores de $k_{La}$ calculados para os reatores STR e BAABC em cada condição testada.....	43
Figura 9 - Resultados $k_{La}$ obtidos nos reatores STR e BAABC pelo Método de oxidação do sulfito.....	45
Figura 10 - Comparativo entre os dois ensaios realizados no reator STR para agitação de 250 rpm.....	46
Figura 11 - Comparativo entre o segundo ensaio realizado sob 300 rpm de agitação no reator STR, para as aerações de 0,4 e 1,0 vvm.....	47
Figura 12 - Resultados obtidos no ensaio com 370 rpm de agitação e 0,2 vvm de aeração no biorreator convencional (STR).....	48

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Relação entre os valores de aeração e os valores das vazões de ar indicados no rotâmetro, para o biorreator BAABC. ....	30
Tabela 2 - Resultados obtidos no ensaio com sulfito 0,2 M no reator STR, sob agitação de 150 rpm e aeração de 0,4 vvm. ....	31
Tabela 3 - Condições utilizadas para a determinação de $k_{La}$ pela técnica de oxidação de sulfito. ....	32
Tabela 4 - Valores de pH utilizados em estudos sobre método sulfito. ....	34
Tabela 5 - Coeficiente volumétrico de oxigênio calculado a partir dos ensaios realizados em frasco para diferentes agitações. ....	36
Tabela 6 - Resultados de $k_{La}$ para reator STR e BAABC pelo método do sulfito. ....	42
Tabela 7 - Valores de $k_{La}$ obtidos com a sonda de oxigênio e método sulfito. ....	49

## LISTA DE ABREVIAÇÕES

BAABC	Biorreator Agitado e Aerado de Baixo Cisalhamento
C	Concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida
$C_s$	Concentração de saturação de oxigênio na fase líquida
$dC/dt$	Taxa de variação da concentração de oxigênio
H	Constante de Henry
$k_{La}$	Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio
$k_v$	Coeficiente de absorção
$N_{O_2}$	Velocidade de transferência de oxigênio
OD	Oxigênio dissolvido
OTR	Taxa de transferência de oxigênio
$p_g$	Pressão parcial de oxigênio no meio gasoso
STR	<i>Stirred Tank Reactor</i>
t	Tempo
V	Volume

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	12
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Objetivo geral.....	14
2.2	Objetivos específicos .....	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1	Bioprocessos .....	15
3.2	Transferência de oxigênio em bioprocessos .....	16
3.2.1	Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio .....	17
3.2.2	Métodos para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ) .....	18
3.2.2.1	Método de oxidação do sulfito de sódio .....	19
3.2.2.2	Método dinâmico tradicional .....	20
3.3	Biorreatores convencionais .....	21
3.3.1	Impelidores .....	22
3.3.2	Reator tipo Tanque Agitado ( <i>Stirred Tank Reactor, STR</i> ).....	23
3.3.3	Biorreator não convencional - BAABC.....	25
4	METODOLOGIA .....	27
4.1	Biorreatores .....	27
4.1.1	STR.....	27
4.1.2	BAABC .....	27
4.2	Método de oxidação do sulfito .....	28
4.4	Sequência experimental .....	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30

5.1 Ensaio para determinação das condições experimentais.....	30
5.2 Ensaio em frasco.....	34
5.3 Ensaio no biorreator STR .....	37
5.4 Ensaio no BAABC .....	39
5.5 Comparativo da capacidade de transferência de oxigênio .....	42
6 CONCLUSÃO .....	50
REFERÊNCIAS.....	51

## 1 INTRODUÇÃO

Os bioprocessos são caracterizados por manipular e fazer uso dos ciclos biológicos, em que os processos desenvolvidos pelos seres humanos possibilitam a obtenção dos produtos desejados e importantes para a sociedade. Os mais diversos processos biotecnológicos são empregados para obtenção de medicamentos, vacinas, alimentos, bebidas e biomateriais. Seja por modificações de microrganismos, plantas, do ambiente em que encontram ou por conversão química direta (SHIJE LIU, 2012).

Para realização dos bioprocessos, o reator se torna o principal equipamento utilizado, sendo referido por Shije Liu (2012) como o coração de qualquer processo químico e/ou bioquímico. Os biorreatores são equipamentos em que é possível garantir as condições ideais para realização do processo de interesse, possibilitando que as características do meio se mantenham constantes e que se tenha um processo eficiente. Isto se deve ao fato de que neste equipamento diferentes parâmetros podem ser controlados como temperatura, esterilização, pH, agitação e aeração, dentre outros.

Quando se trata dos processos aeróbicos, manter a concentração adequada de oxigênio no meio de cultivo é de extrema importância. Para isso torna-se importante o estudo da transferência de oxigênio ( $O_2$ ), a qual consiste na passagem do  $O_2$  da fase gasosa para a fase líquida, correspondendo à sua dissolução. Uma forma de garantir a homogeneização e aeração é através da modificação de parâmetros de operação. Como exemplos, tem-se a frequência de rotação do agitador, a vazão da alimentação de ar e até mesmo o enriquecimento com oxigênio puro (ROLLINS et al., 1998; GAVRILESCU; ROMAN; EFIMOV, 1993).

A transferência de massa do oxigênio entre as fases gás-líquido pode se tornar uma etapa limitante da taxa geral de um processo. Por isso, entender e conhecer o coeficiente de transferência de oxigênio ( $k_{L}a$ ) nos biorreatores é de extrema importância quando se pensa em desenvolver ou aumentar a escala de um processo.

Este parâmetro é fundamental para a produtividade dos bioprocessos aeróbicos, que representa uma parcela significativa na indústria. Muitos estudos já foram conduzidos por pesquisadores, com extensivas investigações sobre o  $k_{La}$ , porém em sua maioria voltados para reatores convencionais. Na literatura, podem-se encontrar pesquisas que buscaram entender melhor os diferentes aspectos envolvidos no transporte de oxigênio (CLAKER; CORREIA, 2008; KILONZO; MARGARITIS, 2004).

Diferentes biorreatores podem ser empregados nos processos, sendo classificados conforme alguns parâmetros que os compõe. Os biorreatores convencionais podem ser agrupados quanto à forma de agitação: mecânica, pneumática ou de leito fluidizado (BADINO JUNIOR; SCHMIDELL, 2021). Estes biorreatores apresentam diversas possibilidades de aplicação, conforme o interesse da indústria e o produto desejado. Entretanto, ainda há muitas limitações a serem superadas nos processos biotecnológicos.

Dessa forma, novos biorreatores são desenvolvidos para suprir as limitações encontradas nos modelos convencionais. O biorreator não convencional denominado Biorreator Agitado e Aerado de Baixo Cisalhamento (BAABC), que é o objeto deste estudo, foi desenvolvido por Prata et al. (2011) diante de uma limitação encontrada em um processo fermentativo com fungo filamentoso. Ao realizar o crescimento do basidiomiceto *Ceriporiopsis subvermispora* no STR, deparou-se com a formação de grumos e adesão das células nas pás das turbinas. Além disso, foi observado que ocorria cisalhamento das células devido agitação mecânica do meio (DOMINGOS et al., 2017).

Este biorreator não convencional se mostrou promissor nos estudos realizados por Domingos et al. (2017) e Tabuchi et al. (2020), principalmente quanto ao cultivo de biomassa a partir de fungos. Mas ainda há outras possibilidades de aplicação para serem exploradas. Consequentemente, torna-se importante analisar o comportamento da transferência de oxigênio no BAABC e determinar o  $k_{La}$  em função da agitação e da aeração.

Na estrutura deste biorreator não convencional, não há como introduzir a sonda para medir a concentração de oxigênio dissolvido (OD) sendo utilizada no método dinâmico tradicional para determinação do  $k_{La}$ . Dessa forma, foi realizado o método de titulação para determinar o coeficiente de transferência de oxigênio no BAABC, que consiste no método de oxidação do sulfito. Esta metodologia foi descrita no trabalho publicado por Cooper, Fernstrom e Miller (1944). Com o uso deste método, será possível conhecer a faixa de  $k_{La}$  que o biorreator não convencional abrange e as possibilidades de utilização nos processos biotecnológicos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade de transferência de oxigênio em função da agitação e da aeração em um biorreator não convencional (Biorreator Agitado e Aerado de Baixo Cisalhamento) empregando o método de oxidação do sulfito.

### 2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Estabelecer a sistemática de execução do método de oxidação do sulfito para determinação do  $k_{La}$  em água;
- Determinar a capacidade de transferência de oxigênio no STR para diferentes condições de agitação e aeração, empregando o método de oxidação do sulfito;
- Determinar a capacidade de transferência de oxigênio no Biorreator Agitado e Aerado de Baixo Cisalhamento para diferentes condições de agitação e aeração, empregando o método do sulfito;

- Estabelecer uma correlação entre a transferência de oxigênio no STR e BAABC em função da agitação e da aeração, visando a ampliação de escala;
- Realizar um estudo comparativo entre o BAABC e o STR quanto à capacidade de transferência de oxigênio em função das condições de agitação e aeração.

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Bioprocessos**

Os bioprocessos foram desenvolvidos para se obter produtos desejados através da manipulação dos ciclos biológicos que ocorrem nos microrganismos. Para isso, diferentes reatores foram criados para possibilitar processos de transformação de materiais de baixo custo, como carboidratos, em produtos com alto valor agregado (SHIJE LIU, 2012).

De acordo com Shije Liu (2012), apesar de não ser limitado a somente os dois pontos, referem-se a bioprocessos como:

- I. Conversão biológica de “produtos químicos” ou materiais baratos em produtos químicos ou materiais valiosos;
- II. Manipulação de organismos biológicos como “catalisadores” para conversão ou produção de produtos de que o ser humano necessita.

Na indústria, os processos biotecnológicos são caracterizados por uma vasta aplicação. Produtos biológicos como proteínas recombinantes, medicamentos, vacinas, alimentos, biomateriais e combustível são alguns exemplos da grande contribuição destes processos para as necessidades do ser humano (SHIJE LIU, 2012).

Muitos destes produtos são obtidos pela ação de células microbianas, que crescem e se reproduzem em reatores. Nesse equipamento controlam-se diferentes parâmetros como temperatura, esterilização, pH, agitação e aeração, dentre outros. A agitação e a aeração são dois parâmetros importantes ao lidar com processos aeróbios, em que o oxigênio atua como acceptor final de elétrons.

Os processos aeróbios constituem uma larga parcela dos processos industriais, como para produção de enzimas, antibióticos, fermentos, vitaminas, inoculantes, hormônios e cultivo de células animais, dentre outros (BADINO JUNIOR; SCHMIDELL, 2021).

Estes microrganismos aeróbicos necessitam de uma disponibilidade ilimitada de oxigênio dissolvido para se ter crescimento celular e produção de metabólicos. Nos bioprocessos, essa necessidade é suprida pela dissolução do oxigênio contido na fase gasosa na fase líquida. Dessa maneira se encontrará livre para ser consumido pelas células presentes no meio através da respiração. Sabe-se que se essa condição não for atendida, ou seja, quando há baixa disponibilidade, o desempenho do processo será afetado negativamente (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009). Por isso, torna-se importante o estudo da transferência de oxigênio e como esta ocorre durante os bioprocessos.

### **3.2 Transferência de oxigênio em bioprocessos**

Nos processos biotecnológicos envolvendo cultivo de células aeróbias ou aeróbias facultativas, é exigido um dimensionamento adequado quanto ao sistema de transferência de oxigênio (BADINO JUNIOR; SCHMIDELL, 2021). A transferência de oxigênio consiste na operação de dissolução do oxigênio da fase gasosa na fase líquida.

A agitação e a aeração são extremamente necessárias no meio de cultivo, para ocorrer o processo aeróbio. Isso pode se confirmado devido à necessidade do oxigênio na cadeia respiratória, já que este tem como papel aceitar elétrons e então ser reduzido para formar água. Com isso, permite que seja realizado o armazenamento de energia através das moléculas de trifosfato de adenosina (ATP). Estas são essenciais para a ocorrência de reações de síntese de moléculas, tanto para sobrevivência quanto para surgimento de novas células (BADINO JUNIOR; SCHMIDELL, 2021).

Dessa forma para que processo aeróbio seja eficiente, ou seja, ocorra um crescimento de células de forma rápida, há a necessidade da existência de oxigênio dissolvido no meio de cultivo em quantidade adequada.

Devido à característica de baixa solubilidade do oxigênio, ter o controle dos níveis de oxigênio dissolvido no meio durante todo o processo se torna necessário. Na saturação, a concentração de O<sub>2</sub> se dá apenas na ordem de 7 ppm (7 mg/L), borbulhando-se ar atmosférico na pressão de 1 atm e 35 °C (BADINO JUNIOR; SCHMIDELL, 2021).

### **3.2.1 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio**

A transferência de massa entre as fases gás-líquido pode, muitas vezes, se tornar uma etapa limitante da taxa geral do processo. Para esses casos, se existe a vontade de realizar um projeto ou um aumento de escala de biorreatores, deve-se conhecer o coeficiente de transferência volumétrica de oxigênio (k<sub>La</sub>) (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 1998).

Na fase líquida bem misturada, na ausência de biomassa ou com células que não respiram, quando as reações bioquímicas não ocorrem, o balanço de massa para o oxigênio dissolvido pode ser determinado pela Equação 1:

$$\frac{dc}{dt} = k_L a \cdot (C_S - C) \quad (1)$$

Onde  $dC/dt$  é a taxa de acúmulo de oxigênio, C é a concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida e  $C_s$  é a concentração de saturação de oxigênio na fase líquida. Ao realizar um balanço de massa para o  $O_2$  na fase líquida em um sistema agitado e aerado onde não há consumo de oxigênio, a taxa de acúmulo de oxigênio é igual à velocidade de transferência do  $O_2$  ( $N_{O_2}$ ).

$$\frac{dC}{dt} = N_{O_2} = k_L a \cdot (C_s - C) \quad (2)$$

A Equação 2 permite a compreensão das formas de que se dispõe para controle de concentração OD em meio líquido, apesar da sua simplicidade (BADINO JUNIOR; SCHMIDELL, 2021). A relação foi utilizada como base para alguns métodos de medição do  $k_L a$ , onde se utilizam diferentes técnicas para medir a concentração de oxigênio dissolvido.

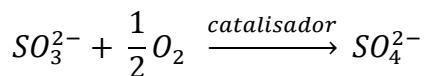
### **3.2.2 Métodos para determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_L a$ )**

Determinar o  $k_L a$  nos biorreatores é essencial, visto que ao se estabelecer a eficiência da aeração e quantificar os efeitos das variáveis de operação envolvidas no fornecimento de oxigênio para o meio contribui-se para um processo com maior desempenho. E para controle da taxa de transferência de oxigênio nos biorreatores podem ser realizados testes, não sendo realizados necessariamente durante uma fermentação.

Diversos métodos de determinação do coeficiente de transferência de oxigênio foram desenvolvidos ao longo dos anos e, ao se escolher qual será usado, devem-se levar em conta algumas considerações. No trabalho de Novak e Klerkner (1988), são mencionados aspectos como: o tipo de biorreator e seu design mecânico, a composição do meio fermentativo, o sistema de aeração e, também, o possível efeito que a presença do microrganismo pode gerar.

### 3.2.2.1 Método de oxidação do sulfito de sódio

Cooper, Fernstrom e Miller (1944) propuseram o método de sulfito de sódio para determinar a capacidade de transferência de oxigênio de reatores. O método tem como base a rápida reação do sulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ), considerado um agente redutor. Na presença do oxigênio dissolvido no meio reage e forma o sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Essa reação necessita de diversos íons metálicos como catalisadores, que usualmente trata-se do cobre ou cobalto (MAIER et al., 2001). A reação de oxidação do sulfito é representada por:



A oxidação de sulfito é utilizada com frequência como um modelo de reação cinética para se determinar com mais precisão como ocorre a transferência de massa em absorvedores de gás-líquido (LINEK E VACEK, 1981).

Como a reação geral gera  $\text{H}^+$ , o controle de pH é necessário durante a realização do método. Com a queda do pH em aproximadamente uma unidade pode ocorrer uma diminuição da taxa de oxidação em até dez vezes (VANZARA, 2013). O pH da solução de sulfito influencia na taxa da reação de oxidação do sulfito, sendo relatado em pesquisas que ocorre mais rapidamente em meio neutro ou ligeiramente alcalino.

Outro ponto é que se deve manter uma concentração de sulfito significativamente alta, na ordem de um  $\text{kmol/m}^3$ , para que assim a taxa de oxidação se torne independente da quantidade de sulfito presente. Em conjunto com uma concentração de oxigênio no líquido igual ou próximo a zero, ou seja, na ausência de oxigênio dissolvido, o  $k_{La}$  desta oxidação é praticamente igual ao  $k_{La}$  para absorção física. Assim, pode-se desconsiderar qualquer aumento da transferência de massa devido à reação química (VANZARA, 2013).

Neste método, é colocada no reator uma solução de sulfito de sódio e estabelecida a aeração desejada. Depois, em um dado instante é colhida uma amostra

e determinada a concentração de sulfito por iodometria, onde se adiciona uma solução de iodo e titula-se a amostra utilizando solução de tiosulfato. Passando um intervalo de tempo, com as condições mantidas constantes, é retirada uma nova amostra e determinada a concentração de sulfito novamente.

Por estequiometria da reação de oxidação do sulfito e considerando que o oxigênio dissolvido reage instantaneamente, é possível saber a massa total de oxigênio que foi transferido no intervalo de tempo entre as duas amostras por um volume total de reação (BADINO JUNIOR; SCHMIDELL, 2021). Com esses dados, tem-se a velocidade de transferência do oxigênio ( $N_{O_2}$ ), obtida pela Equação 3:

$$N_{O_2} = k_L a \cdot H \cdot p_g = k_V \cdot p_g \quad (3)$$

Onde:

$N_{O_2}$  = velocidade de transferência de oxigênio ( $g_{O_2}/m^3h$ )

$k_L a$  = coeficiente de transferência de oxigênio ( $h^{-1}$ )

$H$  = constante de Henry ( $g_{O_2}/(m^3atm)$ )

$p_g$  = pressão parcial de oxigênio no meio gasoso ( $atm$ )

$k_V$  = coeficiente de absorção ( $g_{O_2}/(m^3 \cdot h \cdot atm)$ )

### 3.2.2.2 Método dinâmico tradicional

A estratégia do método dinâmico consiste em utilizar um eletrodo imerso no líquido que será submetido à aeração e agitação. Inicialmente é realizado o borbulhamento de nitrogênio ( $N_2$ ) no meio líquido para eliminar todo o oxigênio dissolvido, até o momento em que a sonda indicar o valor de zero. Depois, em um dado instante, a agitação e a aeração são iniciadas e é registrado o sinal da sonda. Este

sairá do zero e aumentará até indicar o ponto de saturação, momento em que a sonda indicará o valor de 100%.

Com a Equação 4 e conhecendo a condição inicial, esta é integrada sendo possível separar as variáveis.

$$\frac{dc}{dt} = k_L a (C_s - C) \quad (4)$$

Integrando, tem-se:

$$\ln\left(1 - \frac{c}{C_s}\right) = -k_L a \cdot t \quad (4.1)$$

Rearranjando:

$$\frac{c}{C_s} = 1 - e^{-k_L a \cdot t} \quad (4.2)$$

A partir da equação integrada e utilizando os dados experimentais, com o gráfico de  $\ln(1 - C/C_s)$  em função do tempo é possível determinar o  $k_L a$ , a partir do coeficiente angular da reta. Neste caso, não é necessário conhecer o valor absoluto da concentração de saturação de oxigênio, apenas as frações ( $C/C_s$ ) que são obtidas através do sinal da sonda previamente calibrada (BADINO JUNIOR; SCHMIDELL, 2021).

### 3.3 Biorreatores convencionais

Biorreatores são definidos como equipamentos empregados em processos biotecnológicos, podem ser classificados em dois grandes grupos. Um é constituído pelos biorreatores em que não há células vivas no processo de transformação, e o outro biorreatores em que as transformações ocorrem com a presença de células vivas (BADINO JUNIOR; SCHMIDELL, 2021). Esse equipamento é utilizado para proporcionar condições adequadas para os processos, mantendo um ambiente mais

estável em relação a temperatura, pH, substrato, vitaminas, minerais e oxigênio, por exemplo.

Um ponto a se destacar é que, dependendo do cultivo utilizado, os biorreatores podem ter características muito diferentes com relação aos fenômenos de transporte que ocorrem (BADINO JUNIOR; SCHMIDELL, 2021).

Os biorreatores podem ser classificados seguindo diferentes parâmetros: se usam células ou enzimas, se as células/enzimas são imobilizadas ou não, ou quanto à forma de agitação no reator (KLEINSTREUR, 1987). Quanto a este último parâmetro, têm-se os reatores agitados mecanicamente, pneumáticamente (agitação por borbulhamento de um gás) e de fluxo fluidizado.

### 3.3.1 Impelidores

Empregam-se diferentes impelidores com a finalidade de aumentar a eficiência na agitação e aeração do meio de cultivo. Com o uso dos impelidores é buscado manter as condições hidrodinâmicas apropriadas para transferência de massas e dispersão de gás (GOGATE; BEENACKERS; PANDIT, 2000).

Existem diversos impelidores, cada um com sua geometria, desenvolvidos com intuito de incrementar melhorias nos processos. As diferentes geometrias influenciam no coeficiente volumétrico de oxigênio, no tempo de mistura e na retenção gasosa (JUNKER et al., 1998). Porém, o uso destas turbinas pode acabar gerando forças de cisalhamento e rupturas das células. Diante deste fato, entender quais configurações especiais serão demandadas para garantir a integridade das células se torna muito importante (NAJAFPOUR, 2007).

Diferentes correntes de fluxo são geradas dependendo do impelidor usado, se este, por exemplo, é composto por pás planas ou inclinadas. O impelidor *pitched blade*, de pás restas inclinadas, gera fluxos tanto na direção axial quanto radial, devido ao

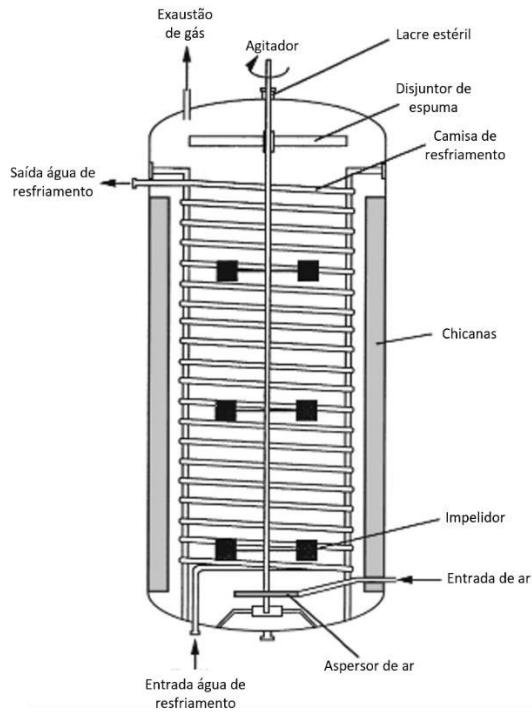
ângulo de inclinação que possui. Trata-se de um impelidor muito eficaz para aplicações de mistura (DORAN, 2013). Outro tipo de impelidor é o de Rushton, composto por 6 pás planas, gera um fluxo radial. No estudo de Sardeing et al. (2004) com biorreator convencional, comparando a turbina de Rushton com a *pitched blade*, foi concluído que ao se utilizar os impelidores de pás planas houve um incremento na transferência de massa. Dessa maneira, dissipam mais potência do que outros impelidores. Seu uso também contribui para melhor efeito de turbulência no meio e melhor quebra das bolhas de ar.

### 3.3.2 Reator tipo Tanque Agitado (*Stirred Tank Reactor, STR*)

O STR é o biorreator mais importante nas aplicações industriais, sendo vantajoso pelo seu baixo capital e custos operacionais (NAJAFPOUR, 2007). De acordo com Badino Junior e Schmidell (2021), este reator corresponde a cerca de 90% do total de reatores utilizados na indústria. Este biorreator consiste em um tanque cilíndrico com agitação e aeração mecânica. Normalmente equipado com chicanas, que contribuem para não formação de vórtice devido à agitação do meio. O agitador fica em um eixo central, podendo ter uma série de turbinas ao longo de sua altura (NAJAFPOUR, 2007). Pode contar também com a presença de serpentinas nesses biorreatores tem como finalidade controlar a temperatura, sendo estas responsáveis pelo resfriamento do meio (DORAN, 2013).

Na Figura 1 tem-se um esquema indicando as características do STR.

Figura 1 - Esquema de um típico Stirred Tank Reactor.



Fonte: Adaptado de Doran (2013).

Nessa conformação de reator a relação entre altura:diâmetro pode variar de 2:1 a 6:1, dependendo da quantidade de calor que se deseja remover. Com relação ao número de agitadores, determina-se que se a altura do vaso for igual ao diâmetro, uma turbina é suficiente. Se a altura do vaso for duas vezes ou mais o diâmetro, utilizam-se conjuntos adicionais de turbinas no eixo (NAJAFPOUR, 2007).

Essa combinação de turbinas no eixo central do STR possibilita melhora na mistura do meio, favorecendo a homogeneidade e a transferência de massa. A turbina mais utilizada é a de pás-planas, também denominada turbina de Rushton.

### **3.3.3 Biorreator não convencional - BAABC**

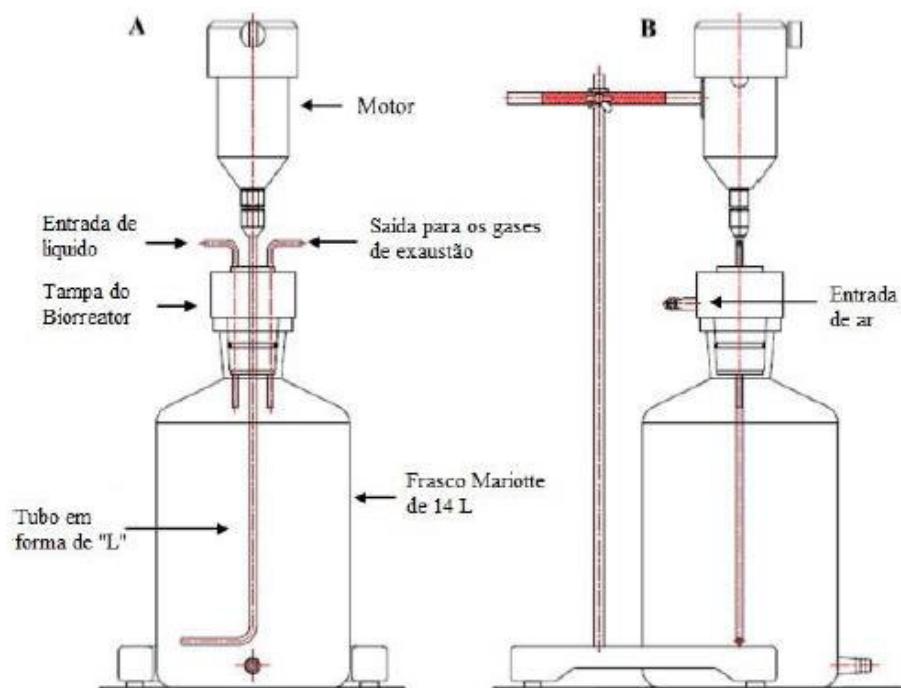
Diante do desafio na produção de determinados produtos no biorreator convencional STR, foi enxergada a oportunidade de desenvolver um biorreator que auxiliasse a reduzir os problemas existentes. Como, por exemplo tem-se a fermentação com fungos filamentosos, sendo microrganismos que acabam formando grumos e aderindo às pás das turbinas e a outras partes internas do biorreator convencional.

Assim, Prata et al. (2011) desenvolveram o Biorreator Agitado e Aerado de Baixo Cisalhamento (BAABC). Este biorreator possui um sistema de aeração rotatória, sendo a areação e agitação do meio realizada de forma simultânea. Essa conformação evita obstrução da saída de ar, já que se encontra em movimentação e apresenta um maior diâmetro comparado aos difusores de ar dos convencionais (DOMINGOS et al., 2017).

O BAABC corresponde a um frasco de Mariotte de 14 L com uma saída (oliva de vidro) localizada no fundo, para retirada de amostras. Quanto à tampa deste biorreator, esta desempenha diversas funções: fecha a entrada principal do frasco, fornece um tubo de exaustão de gás, um tubo para entrada de líquido, um tubo para entrada de ar com conexão a câmera de ar central e manter fixo o tubo de aço inoxidável na forma de L. Sendo este tubo responsável pela agitação e aeração do meio de cultivo (DOMINGOS et al., 2017).

No esquema da Figura 2, usada por Domingos et al. (2017), é possível identificar todas as estruturas que constituem o Biorreator Agitado e Aerado de Baixo Cisalhamento.

Figura 2 - Diagrama esquemático do Biorreator Agitado e Aerado de Baixo Cisalhamento.



Fonte: Adaptado de Domingos et al. (2017).

O uso desse novo biorreator no cultivo de fungos filamentosos se mostrou extremamente promissor. No cultivo do basidiomiceto *Ceriporiopsis subvermispora* por Domingos et al. (2017), foi verificado a funcionalidade do BAABC. Realizou-se a fermentação também no STR para fins de comparação. Foram encontradas altas produtividades de biomassa obtidas pela cultura utilizada no BAABC e também foi observada alta homogeneidade do meio. Dessa maneira, pode-se afirmar que se trata de um biorreator promissor para cultivo de fungos filamentosos.

Já quanto à produtividade, em Domingos et al. (2017) foi relatado que as culturas realizadas no BAABC foram cerca de duas vezes mais produtivas que no STR ao longo dos primeiros 9 dias. O cultivo no novo biorreator proporcionou um crescimento mais intenso do fungo com estresse mínimo nas culturas.

No trabalho de Tabuchi et al. (2020), diversos ensaios foram realizados e no processo fermentativo com *Lasiodiplodia theobromae* no BAABC foi observado que os meios permaneceram homogêneos e sem formação de aglomerados. Mostrando que este novo biorreator é realmente apropriado para cultivo de células sensíveis e com facilidade de adesão nas partes internas dos biorreatores convencionais. Além disso, nas condições estudadas, houve um aumento significativo na produção de exopolissacarídeos no BAABC em meio com glicose, quando comparado com o STR.

Diante das características verificadas durante os estudos já realizados com este biorreator, percebe-se que há outras aplicações para serem exploradas, como o cultivo de células animais que são sensíveis a danos de cisalhamento quando cultivadas nos biorreatores convencionais.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Biorreatores

#### 4.1.1 STR

Foi utilizado um equipamento BIOFLO III (New Brunswick New Brunswick Scientific Co. Inc.) com volume útil de 1,25 L, de fundo arredondado que possui um diâmetro de 12 cm. Com agitador turbina com seis pás planas de diâmetro 5,4 cm e quatro chicanas opostas diametralmente. Quanto ao aspersor de ar, foi utilizado o de anel de aço inox com quatro orifícios (1 mm de diâmetro cada), e que fica localizado na base do biorreator.

#### 4.1.2 BAABC

Foi utilizado o biorreator com capacidade total de 14 L e que opera com volume útil de 10 L. Consiste em um tanque de vidro em forma cilíndrica. Possui 42 cm de

altura e 23 cm de diâmetro. É composto por um eixo central rotacional e oco, de aço inoxidável 316, na forma de “L” com a parte horizontal medindo 8,5 cm. A entrada de ar é conectada ao eixo rotacional em “L” e o tanque possui uma oliva de vidro na parte inferior para retirada de amostra.

#### **4.2 Método de oxidação do sulfito**

Para este método, colocou-se no biorreator em estudo uma solução de sulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) e adicionou-se o sulfato de cobalto ( $\text{CoSO}_4$ ). Posteriormente, se estabeleceu a agitação e aeração desejada para o teste.

No instante em que se dispara o cronômetro colheu-se uma amostra. Depois de um intervalo de tempo, mantendo os parâmetros constantes, outra amostra foi colhida. Para se determinar a quantidade de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  foi utilizada a titulação por iodometria. Nessa técnica adiciona-se uma solução de iodo na amostra que oxida o  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  a  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , depois se titula o iodo em excesso com uma solução de tiosulfato.

Para cada amostra retirada foi realizada a titulação para se determinar a concentração de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  restante no meio. Com esses dados e utilizando a estequiometria da reação de oxidação de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  a  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , considere-se que todo o oxigênio dissolvido é consumido no mesmo instante e assim determinou-se a velocidade de dissolução do oxigênio ( $\text{N}_{\text{O}_2}$ ) e o  $k_{\text{La}}$ .

O cálculo do  $k_{\text{La}}$  foi realizado empregando-se a expressão apresentada por Deepa:

$$k_{\text{La}} = \frac{C_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \cdot \Delta V_{\text{tiosulfato}}}{V_{\text{amostra}} \cdot \Delta t} \cdot \frac{1000 \cdot 60}{4 \cdot 0,20} \text{ h}^{-1} \quad (5)$$

Onde o volume da solução de tiossulfato de sódio pelo tempo foi substituído pela inclinação da reta do volume de tiossulfato de sódio gasto na titulação em função do tempo transcorrido até a retirada de cada amostra. O valor de 0,20 mmol/L corresponde a solubilidade do oxigênio a 25°C – 30°C.

#### **4.4 Sequência experimental**

Para determinar a capacidade de transferência de oxigênio, foram realizados ensaios nos biorreatores STR e BAABC. No biorreator convencional, a partir do método de oxidação de sulfito, foi determinado o  $k_{La}$  com uso da aeração de 0,4 vvm, 0,7 vvm e 1 vvm. Cada valor de aeração foi testado com agitações de 200 rpm, 250 rpm e 300 rpm.

No biorreator não convencional, também foi realizado o método de oxidação de sulfito. Os ensaios foram realizados para aerações de 0,4 vvm, 0,7 vvm e 1 vvm, sendo cada aeração testada com agitações de 200 rpm, 250 rpm e 300 rpm, para determinação da capacidade de transferência de oxigênio no BAABC.

Para o biorreator não convencional foi utilizado a correlação da Tabela 1 para ajuste das vazões de ar para cada aeração testada neste trabalho.

Tabela 1 - Relação entre os valores de aeração e os valores das vazões de ar indicados no rotâmetro, para o biorreator BAABC.

Aeração (vvm)	Rotâmetro (L/min)
0,1	1,06
0,2	1,84
0,3	2,62
0,4	3,40
0,5	4,18
0,6	4,96
0,7	5,75
0,8	6,53
0,9	7,31
1,0	8,09

Fonte: Próprio Autor.

Para cada ensaio, as amostras foram coletadas a cada 20 minutos transcorridos. Assim que a amostra era retirada, adicionava-se a uma solução de iodo (10 g de KI e 5 g de I<sub>2</sub> em 100 mL de água) recém-pipetada na presença de bicarbonato de sódio em pó. Após 10 minutos, adicionou-se ácido acético ao meio e realizou-se a titulação com tiosulfato de sódio 0,05 mol/L utilizando como indicador o amido.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Ensaio para determinação das condições experimentais

Iniciou-se com o estudo e investigação do método sulfito, partindo das contribuições de Cooper, Fernstrom e Miller (1944) que propuseram o método para

determinação da transferência de oxigênio. Utilizou-se como catalisador o sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) em concentração  $10^{-4}$  mol/L.

Quanto à solução de sulfito, em princípio foi definida em 0,5 M devido ao volume de solução que seria necessário para biorreator de 10 L, sendo esta compreendida na faixa de concentrações apresentada nos estudos de Márquez et al. (1994) e Jerome e Elmer (1956), sendo entre 0,015 e 1,0 M. Os resultados obtidos nas titulações não demonstraram consumo de oxigênio pela reação, mesmo após já terem sido realizados ensaios para diferentes concentrações de tiossulfato, de sulfito e realizado ajustes de pH.

Como mostrado na Tabela 2, os primeiros ensaios não foram condizentes com o esperado. Nesta rodada foi realizado o método para uma solução de 0,2 M de sulfito de sódio, submetida a uma agitação de 150 rpm e aeração de 0,4 vvm no reator convencional (STR). Após os intervalos de 30 e 60 min, as amostras foram tituladas com tiossulfato de sódio 0,02 mol/L. Foram encontrados volumes menores de consumo de tiossulfato na titulação com o decorrer do tempo, sendo justamente o contrário do esperado com a aplicação do método. Deve ser ressaltado que neste ensaio já estava sendo feito o ajuste do pH para 7,68, visto que a reação de sulfito depende de um pH neutro como indicado por Cooper, Fernstrom e Miller (1944).

Tabela 2 - Resultados obtidos no ensaio com sulfito 0,2 M no reator STR, sob agitação de 150 rpm e aeração de 0,4 vvm.

Tempo (min)	Volume <sub>Tiossulfato</sub> (mL)
0	2,5
30	3,5
60	2,8

Fonte: Próprio Autor.

Seguindo as mesmas condições, outro resultado que foi obtido no estudo foi a não variação de volume gasto de tiossulfato decorridos 30 min sob aeração e agitação. Com mais essa evidência, foi repensado o catalisador que estava sendo usado já que a não variação de volume indicava que não estava ocorrendo a reação entre oxigênio e sulfito.

Como próximo passo, foi optado por alterar o catalisador para sulfato de cobalto ( $\text{CoSO}_4$ ) e a partir do estudo de Jerome e Elmer (1956) e Linek e Vacek (1981) foram redefinidas as concentrações das soluções que seriam utilizadas. Além disso, neste momento foi realizada uma nova investigação com relação aos estudos já realizados sobre método de sulfito e o controle do pH nos procedimentos utilizados pelos pesquisadores.

Após mais alguns ensaios em diferentes concentrações e ajustes de pH com base nos estudos já publicados, foram definidas, para dar sequência neste trabalho, as condições listadas na Tabela 3, levando em conta os controles dos parâmetros que precisariam ser mantidos no biorreator de 10 L.

Tabela 3 - Condições utilizadas para a determinação de  $k_{LA}$  pela técnica de oxidação de sulfito.

Parâmetro	Valor	Unidade
$\text{Na}_2\text{SO}_3$	0,4	mol/L
$\text{CoSO}_4$	$10^{-4}$	mol/L
pH*	7,60 – 7,67	-
Temperatura	30,0 – 31,0	°C

\*Valor inicial.

Fonte: Próprio Autor.

Foi utilizada uma solução de sulfito de concentração 0,4 mol/L, com base na faixa de concentração sugerida por Márquez et al. (1994), na presença do catalisador de  $\text{CoSO}_4$  em uma concentração de  $10^{-4}$  M, como descrito por Jerome e Elmer (1956). Em

relação ao pH, o estudo de Linek e Vacek (1981) traz a dependência da constante de velocidade de reação em relação aos parâmetros de temperatura e pH. Assim, para este estudo foi adotado a faixa de pH entre 7,60 e 7,67, levando-se em conta os artigos que relatam a relação deste parâmetro com oxidação do sulfito.

Para a titulação com tiossulfato de sódio foi seguida a orientação de adicionar a amostra em uma solução de iodo recém-pipetada, na presença de bicarbonato de sódio em pó, de forma a se atingir o pH 8,0. Este ajuste de pH é necessário para manter a solução de iodo alcalina, de forma que a taxa de oxidação do íon iodeto em iodo seja lenta.

Decorridos 10 minutos após a mistura do iodo com a amostra, intervalo sugerido para ser completada a oxidação do sulfito a sulfato pelo iodo, foi adicionado ácido acético ao meio. A titulação com tiossulfato de sódio deve ser realizada em solução ácida e foi titulada até o ponto final tendo como indicador o amido (Jerome e Gaden, 1956), colocado na forma de solução a 1% (3 gotas).

Um parâmetro que pode ter gerado interferências no estudo é em relação ao pH ideal para reação do oxigênio com sulfito. Na Tabela 4 foram listados os valores de pH de estudos já realizados para o método. Como citado anteriormente, foi optado por manter a faixa de 7,60 — 7,67 para este estudo, sendo condizente com os artigos de Linek e Vacek (1981) e Lewis e Roberts (2005) que relatam uso do catalizador de cobalto.

Tabela 4 - Valores de pH utilizados em estudos sobre método sulfito.

Referência	pH utilizado
Cooper, Fernstrom e Miller (1944)	neutro
Jerome e Elmer (1956)	6,8
Linek e Vacek (1981)	6,55 - 7,8
Márquez et al (1994)	8,5
Maier et al (2001)	8,0
Lewis e Roberts (2005)	7,5 - 8,5

Fonte: Próprio Autor.

Jerome e Elmer (1956) indicam que a velocidade de absorção é independente da concentração de sulfito quanto está entre 0,015 M e 1,0 M. Neste estudo foi mantida essa característica nas soluções de sulfito utilizadas, terminando os ensaios sem que a concentração estivesse valores abaixo de 0,015 M. A menor concentração alcançada de sulfito ao fim de uma batelada de experimentos, foi de 0,026 M, estando superior ao limite inferior citado. Dessa forma, trata-se de mais um parâmetro de atenção que se manteve dentro do esperado, não sendo um fator para as divergências tratadas no decorrer deste trabalho.

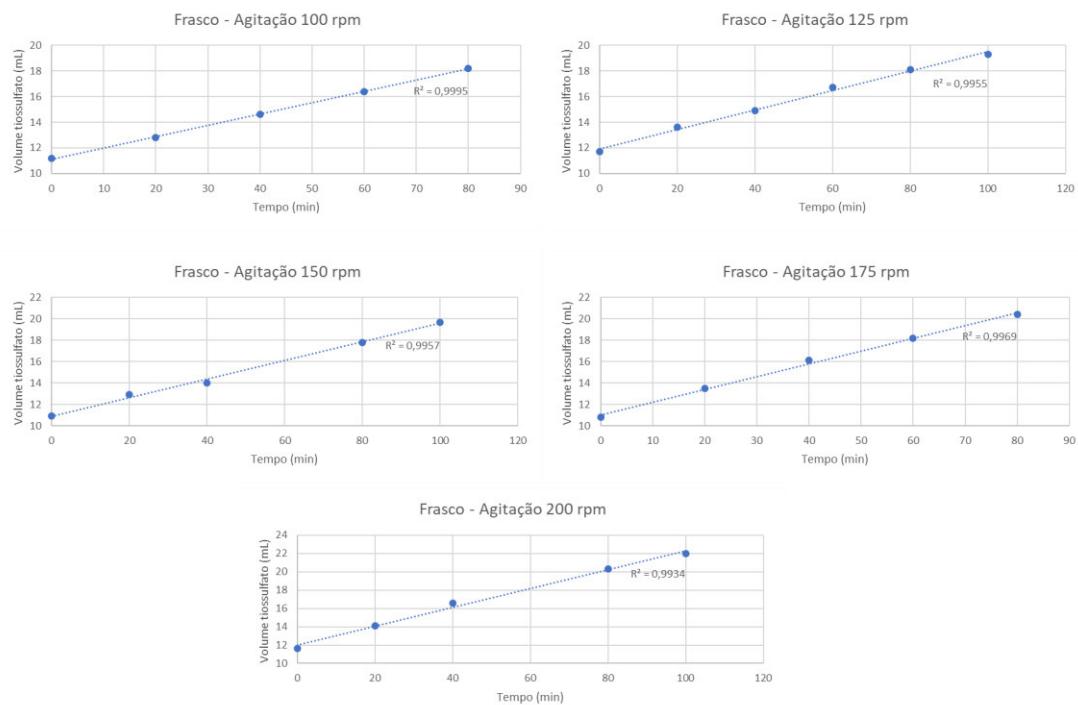
Foram encontradas dificuldades nas definições das concentrações e volumes para que o procedimento fosse realizado corretamente, visto que na literatura disponível não foi possível encontrar melhor detalhamento com relação aos parâmetros analíticos para a reprodução da metodologia de forma mais assertiva. Isto porque para cada estudo têm-se características específicas para o tipo de equipamento usado e para as condições definidas pelos pesquisadores em seus ensaios.

## 5.2 Ensaio em frasco

Utilizando um frasco de 1 L foram realizados ensaios com 200 mL de solução de sulfito para as agitações: 100, 125, 150, 175 e 200 rpm, em incubadora agitadora de

movimento circular. Para este ensaio, foram obtidos os perfis de volume de tiossulfato gasto conforme ilustrado nos gráficos da Figura 3.

Figura 3 - Resultados do ensaio realizado em frasco agitado.



Fonte: Próprio Autor.

Nos ensaios realizados em frasco observou-se uma consistência entre as amostragens tituladas, com uma menor dispersão dos volumes de tiossulfato de sódio ao se realizar as linearizações. Como pode-se notar foram obtidos valores de correlação ( $R^2$ ) acima de 0,99 (Figura 3). Este fato sugere que o método sulfito, executado com a estratégia estabelecida no presente trabalho, é adequada para a determinação do  $k_L a$  em água.

Quanto aos valores de  $k_{LA}$  experimentais, presentes na Tabela 5, para a agitação de 125 rpm foi calculado um valor 14 pontos percentuais abaixo do obtido quando a agitação estava em 100 rpm. Para o ensaio com 200 rpm houve também uma queda do coeficiente de transferência de oxigênio, após ter ocorrido aumento nos valores de agitação 150 e 175 rpm. Essas quedas são inesperadas, tendo em vista que com maior agitação deveria ocorrer maior transferência de oxigênio. Assim, atribui-se esse fato a causas desconhecidas, que levam à necessidade de novas investigações.

Tabela 5 - Coeficiente volumétrico de oxigênio calculado a partir dos ensaios realizados em frasco para diferentes agitações.

Agitação (rpm)	$k_{LA} (h^{-1})$
100	330,00
125	285,38
150	325,88
175	448,13
200	386,63

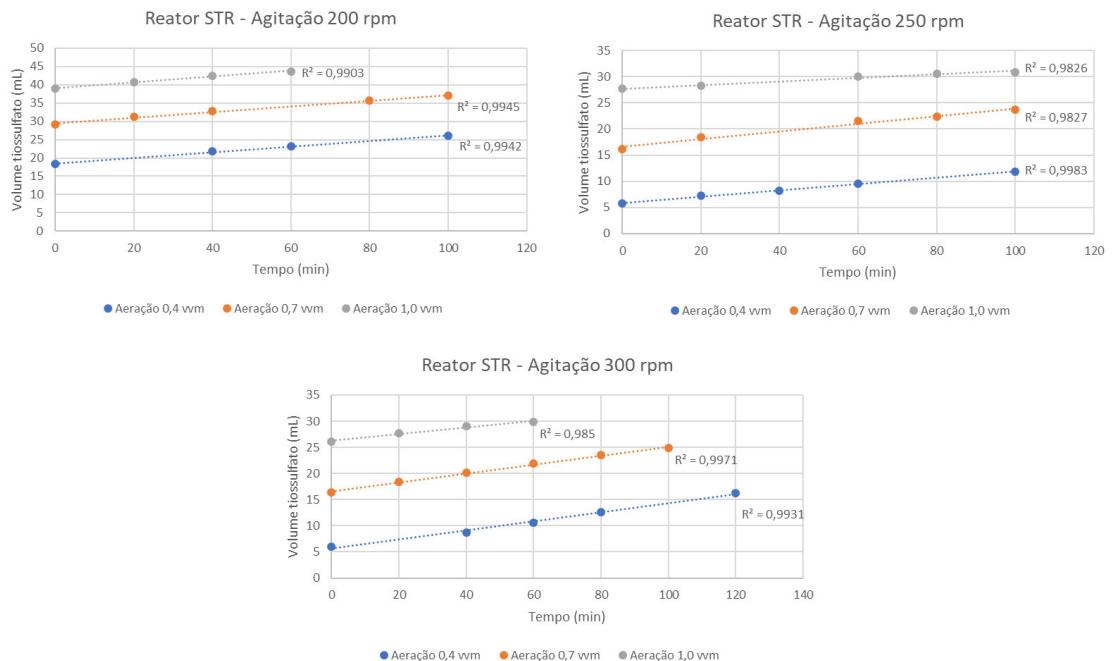
Fonte: Próprio Autor.

No ensaio em frasco, ao realizar os cálculos do  $k_{LA}$ , pode ser notado um valor bastante elevado em relação ao que se espera, em condições semelhantes, quando realizada a medição empregando o método dinâmico com sonda de oxigênio dissolvido. Alves (2021) obteve valores de  $k_{LA}$  da ordem de  $23\text{ h}^{-1}$  quando aplicou o método dinâmico em frasco de 1 L com 200 mL de água, a 180 rpm. Ou seja, o método da oxidação do sulfito superestima consideravelmente o valor do  $k_{LA}$  para condições semelhantes de transferência de oxigênio.

### 5.3 Ensaio no biorreator STR

A partir dos ensaios em cada uma das condições realizou-se a linearização dos dados e obteve-se os gráficos apresentados na Figura 4. Têm-se os volumes de tiossulfato consumidos em função do tempo, em relação a cada velocidade do agitador e valores de aeração utilizados.

Figura 4 - Resultados obtidos nos ensaios realizados no reator de tanque agitado (STR).

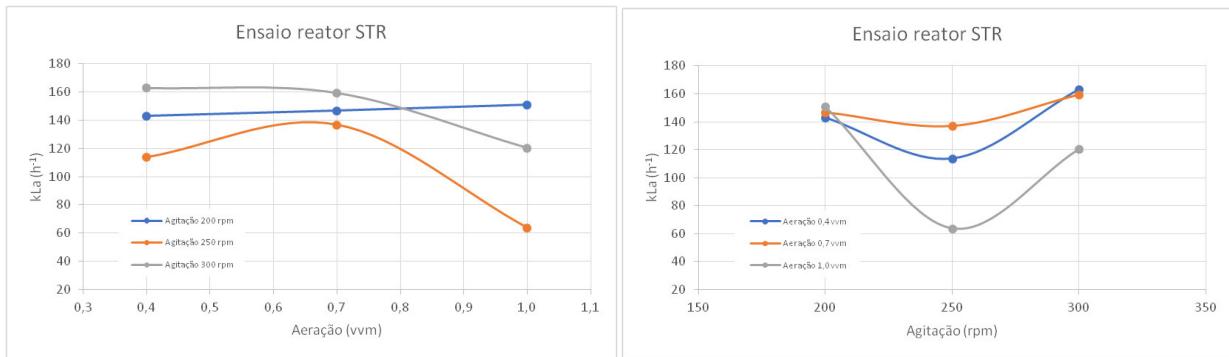


Fonte: Próprio Autor.

Destaca-se, novamente, a adequação do método para a obtenção dos valores propriamente ditos, com valores de  $R^2$  acima de 0,98. Com as linearizações foram calculados os coeficientes de transferência de oxigênio  $k_{La}$  para as condições de agitação e aeração no reator de tanque agitado, que se encontram ilustrados na Figura 5. Percebe-se que houve uma queda no valor do  $k_{La}$  encontrado durante a aeração de 1,0 vvm para as agitações de 250 rpm e 300 rpm. Seria necessário realizar

outros ensaios para estas condições, a fim de entender o comportamento da transferência de oxigênio no sistema e nas condições empregadas.

Figura 5 - Variação do  $k_{La}$  encontrado para cada condição no ensaio realizado com reator de tanque agitado (STR).



Fonte: Próprio Autor.

Para a condição de aeração 200 rpm, percebe-se no gráfico à direita que não houve uma grande mudança nos valores de  $k_{La}$  encontrados para a variação de aeração estudada, sendo um reflexo da influência da agitação para uma melhor dispersão do oxigênio na solução.

Levando em conta os estudos de Linek e Vacek (1981) e Márquez et al. (1994) que trazem a questão da influência do pH na reação de redução de sulfito, ao final do ensaio, para cada condição media-se o pH e encontrou-se para estes dois casos pH em torno de 7,26.

Dessa forma, a diminuição da transferência de oxigênio pode ter sido influenciada pela diminuição do pH no decorrer do tempo levando a um menor coeficiente de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ) calculado ao final dos ensaios no STR. Uma vez que, como relatado por Vanzara (2013), a queda em cerca de uma unidade do pH pode ocasionar a diminuição em até dez vezes da taxa de oxidação. Para futuras

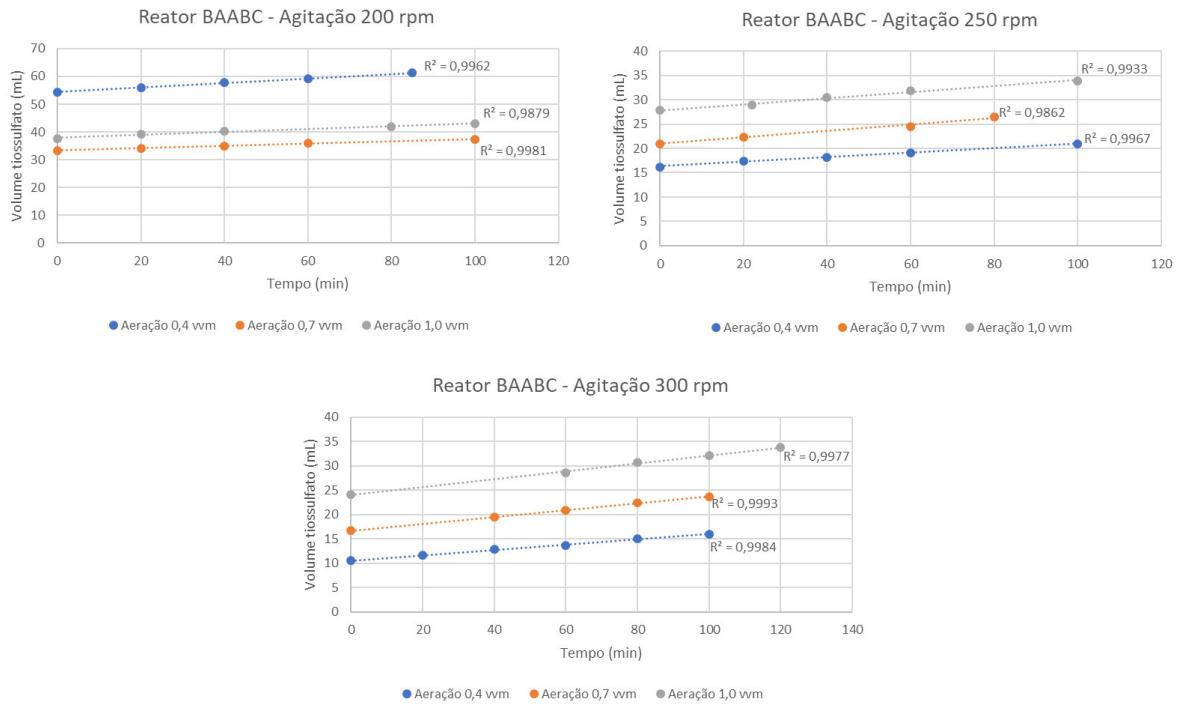
investigações recomenda-se a realização de ensaios com um controle constante do pH, sendo possível observar como se comporta a queda desse parâmetro durante o período de retirada das amostras.

Uma ressalva que deve ser pontuada é que mesmo o pH apresentando esta queda, o valor ainda estaria na faixa estipulada por Linek e Vacek (1981) em seu estudo. Assim, trata-se de mais uma evidência de que a reprodução do método de sulfito não aparenta ser tão trivial, fazendo com que seja reavaliado seu uso para se obter resultados mais consistentes da transferência de oxigênio nos reatores objetos do presente estudo.

#### **5.4 Ensaio no BAABC**

Para o biorreator não convencional (BAABC) foram realizados os ensaios com as mesmas condições do STR em relação às concentrações de sulfito e de catalizador, valores iniciais de temperatura e pH, como listados na Tabela 1. As linearizações obtidas nestes ensaios estão ilustradas na Figura 6, através da relação entre volume de tiosulfato de sódio e tempo de agitação e aeração. Também foram obtidas correlações significativas, sendo o  $R^2$  de todas as condições acima de 0,98.

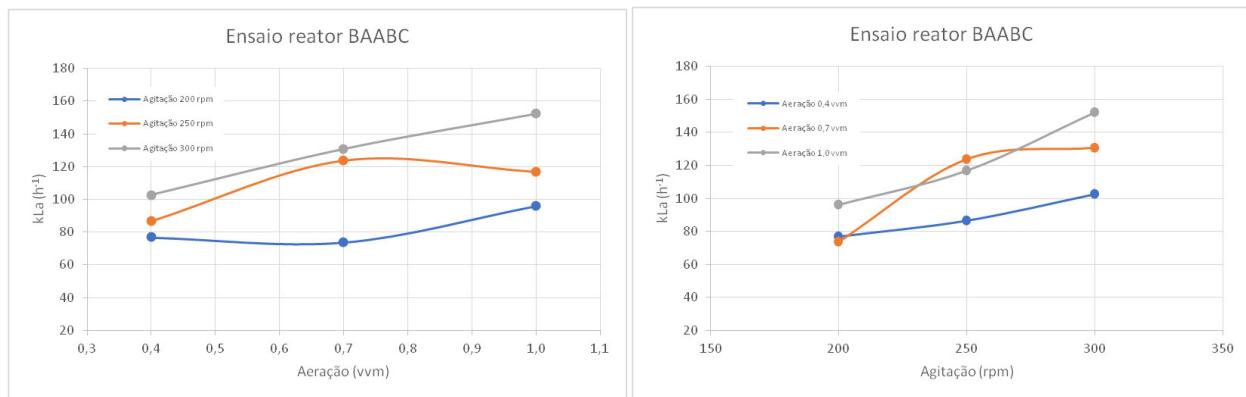
Figura 6 - Resultados obtidos nos ensaios realizados no biorreator não convencional (BAABC).



Fonte: Próprio Autor.

Assim como realizado para o reator STR, foram calculados os coeficientes de transferência de oxigênio  $k_{La}$  para as condições de agitação e aeração no reator BAABC, que se encontram ilustrados na Figura 7.

Figura 7 - Variação do  $k_{La}$  encontrado para cada condição no ensaio realizado com biorreator não convencional (BAABC).



Fonte: Próprio Autor.

Para o biorreator não convencional já se obteve um perfil de comportamento dos valores  $k_{La}$  mais próximos do esperado, ou seja, com o aumento da agitação maiores foram os valores de  $k_{La}$  encontrados. Pelo fato de tratar-se de um volume de 10 L de solução de sulfito, pode não ter tido tanta influência da variação de pH como no caso do ensaio em 1,25 L de solução no reator STR. Assim como o fato de o consumo de oxigênio ter sido menor no biorreator BAABC, ou seja, menor liberação de  $H^+$  pela reação, quando comparados os valores de  $k_{La}$  obtidos para os dois reatores testados, não ocorrendo uma queda de pH tão acentuada como no reator convencional.

De Waal e Ockeson (1996) sugerem que o pH seja mantido constante durante os experimentos, para ser minimizada a mudança na taxa de oxidação sendo produto do efeito do pH sobre a atividade do catalisador. Assim como pontuado para os ensaios no reator convencional, recomenda-se que o parâmetro de pH seja controlado durante o período em que são retiradas as amostras nos ensaios.

## 5.5 Comparativo da capacidade de transferência de oxigênio

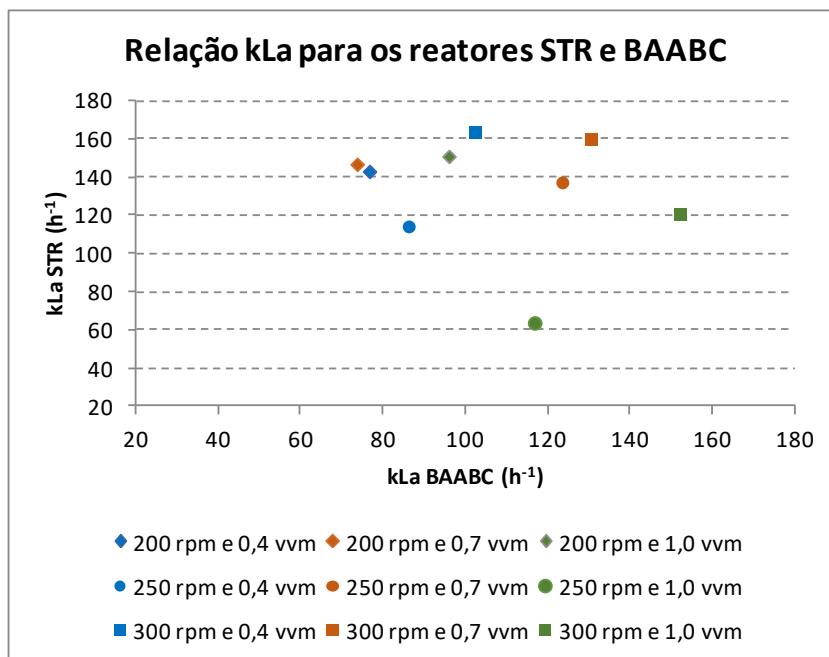
Com os resultados dos ensaios para o reator convencional e não convencional, foi realizado um comparativo destes valores como observado na Tabela 6 e no gráfico da Figura 8. Principalmente pelo do gráfico é possível perceber que não houve uma tendência entre os valores, sendo um reflexo dos pontos listados ao longo deste trabalho que não resultaram em dados mais consistentes.

Tabela 6 - Resultados de  $k_{La}$  para reator STR e BAABC pelo método do sulfito.

Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	STR		BAABC	
		Variação volume tiosulfato (mL)	$k_{La}$ (h <sup>-1</sup> )	Variação volume tiosulfato (mL)	$k_{La}$ (h <sup>-1</sup> )
200	0,4	1,526	143,06	1,636	76,69
200	0,7	1,566	146,81	0,786	73,69
200	1,0	1,610	150,94	1,024	96,00
250	0,4	1,214	113,81	0,922	86,44
250	0,7	1,460	136,88	1,320	123,75
250	1,0	0,680	63,75	1,246	116,81
300	0,4	1,740	163,13	1,094	102,56
300	0,7	1,702	159,56	1,394	130,69
300	1,0	1,284	120,38	1,624	152,25

Fonte: Próprio Autor.

Figura 8 - Correlação dos valores de  $k_{La}$  calculados para os reatores STR e BAABC em cada condição testada.



Fonte: Próprio Autor.

A respeito da ordem de grandeza dos valores de  $k_{La}$  encontrados, o reator STR (convencional) apresentou maior transferência de oxigênio que o BAABC (reator não convencional). Isso corrobora o fato do agitador tipo turbina, utilizado no reator convencional possibilita maior dispersão do ar, contribuindo para uma maior difusão do oxigênio na solução de sulfito. Apenas para o ensaio com agitação de 250 rpm e aeração de 1,0 vvm que este comportamento não prevaleceu. Entretanto, o valor de  $k_{La}$  encontrado para o STR nesta condição não representa o esperado que seria acima dos  $100\text{ h}^{-1}$  conforme o perfil dos valores calculados para as demais condições.

Como relatado nos estudos de Cerri (2005), percebe-se altos valores de  $k_{La}$  para as condições testadas, o que possivelmente trata-se de quantidades superestimadas de oxigênio transferido para o meio. Na literatura observa-se que estudos que compararam resultados experimentais entre o método oxidação do sulfito e outros métodos

disponíveis (Método Dinâmico ou Método da Pressão) foi relatado o comportamento acima, ou seja, os valores de  $k_{La}$  obtidos com o método sulfito eram superiores aos encontrados quando aplicado um método diferente.

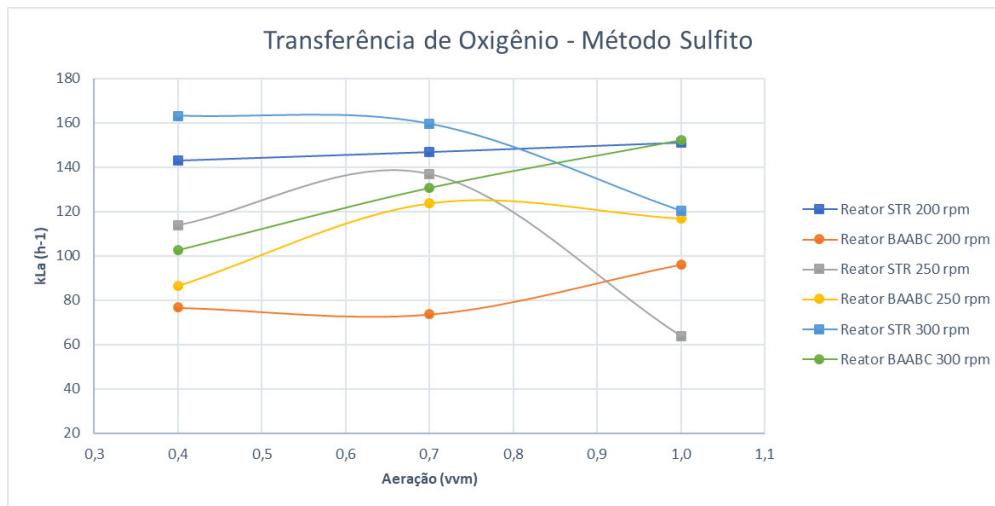
No estudo realizado com água destilada e meio de cultivo por Heinen (2018), foram encontrados valores maiores de  $k_{La}$  para os ensaios em meio de cultivo. Pela avaliação do estudo, foi constatado que este aumento se deve à presença de certos compostos no meio de cultivo e sua salinidade.

Como a salinidade afeta a tensão superficial do meio, apresenta maior influência na transferência de massa (YAHAYA et al., 2001), contribuindo para a diminuição do tamanho das bolhas de ar e levando a um aumento da transferência de oxigênio. Assim, como o método de sulfito é um meio também com maior salinidade, trata-se de uma característica que pode contribuir para os elevados coeficientes de transferência encontrados neste estudo.

Sendo assim, para fins de comparação e para escalar o processo o método da oxidação do sulfito pode constituir uma opção viável. Porém, os valores absolutos não podem ser considerados como representativos com relação à quantidade de oxigênio que está sendo transferido para o meio fermentativo.

Para os reatores testados neste trabalho, percebe-se que não foram encontrados valores de  $k_{La}$  maiores no BAABC, que se mostra uma opção favorável para fermentações que apresentam formação de grumos e são afetados pelo cisalhamento. Isso se explica pelo fato de nesse biorreator o ar entra por apenas um orifício, sendo este de elevado diâmetro (6 mm), proporcionando reduzida área de transferência comparada com o STR. Porém, deve-se ressaltar que as características da solução de sulfito utilizada no método se diferem do meio fermentativo. Assim, apesar de ter sido encontrada maior transferência de oxigênio nos ensaios realizados no reator STR, como mostra o gráfico da Figura 12, este perfil pode não se repetir quando analisado um meio fermentativo mais viscoso.

Figura 9 - Resultados  $k_{La}$  obtidos nos reatores STR e BAABC pelo Método de oxidação do sulfito.



Fonte: Próprio Autor.

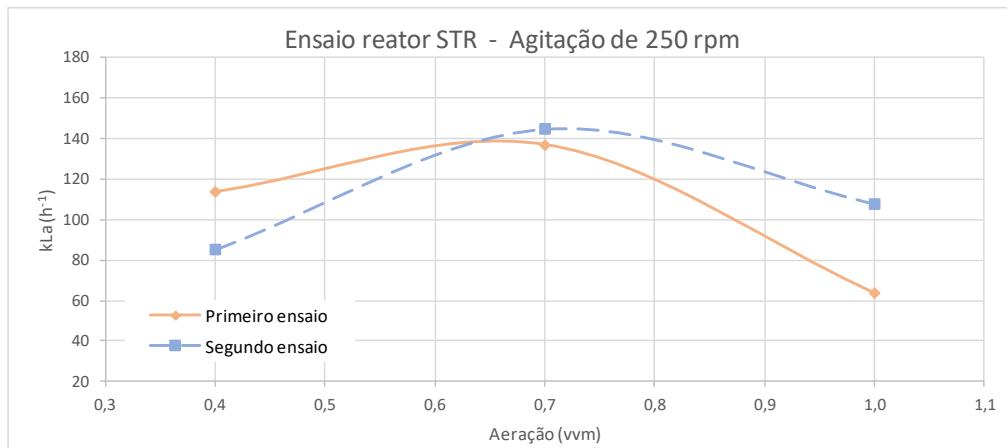
Como o perfil obtido para o ensaio com 250 rpm de agitação no STR apresentou uma queda significativa na última condição (linha em cinza na Figura 12) em que se esperava um aumento devido ao incremento na aeração do meio, foi realizada uma nova rodada nas mesmas condições anteriores.

Realizaram-se os ensaios para as aerações de 0,4, 0,7 e 1,0 vvm com agitação constante de 250 rpm. Sendo que para cada aeração, as amostras foram retiradas a cada 30 minutos e tituladas logo em seguida conforme a metodologia utilizada no primeiro ensaio para esta mesma agitação.

Os valores de  $k_{La}$  calculados no segundo ensaio estão ilustrados no gráfico da Figura 13, sendo possível observar o comparativo com o primeiro ensaio (linha na cor laranja). Obteve-se um aumento no coeficiente de transferência na alteração da aeração de 0,4 vvm para 0,7 vvm. Porém, mais uma vez observou-se uma queda na condição com maior aeração (1,0 vvm), assim como relatado no primeiro ensaio. Diante

desse comportamento de queda do  $k_{La}$  para maior aeração, levanta-se a hipótese se por ocorrer um maior aumento na concentração de O<sub>2</sub> na solução alcance uma concentração crítica para o método sulfito. Dessa forma, geraria dados com baixa confiabilidade para condições com maior taxa de transferência de oxigênio.

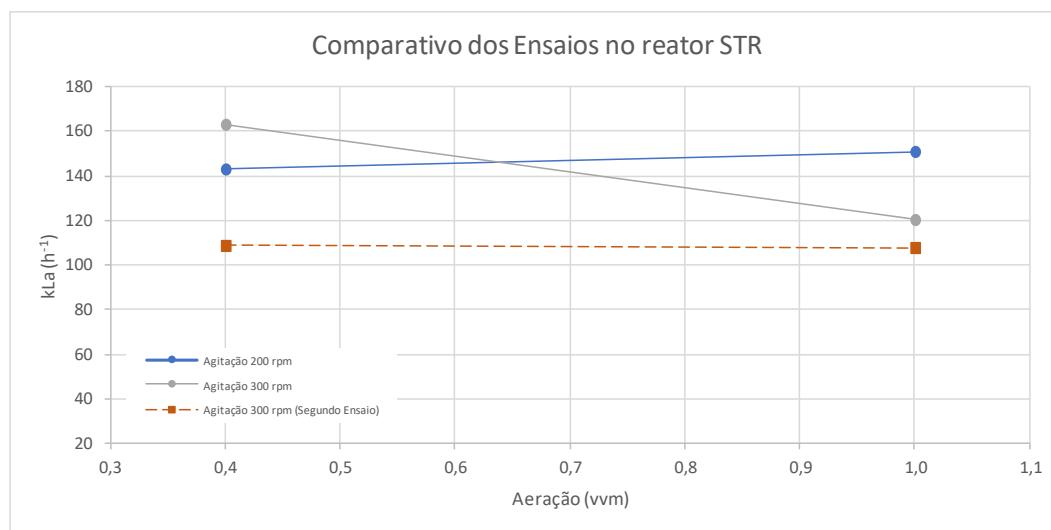
Figura 10 - Comparativo entre os dois ensaios realizados no reator STR para agitação de 250 rpm.



Fonte: Próprio Autor.

Também foi realizado uma segunda testagem no STR com a agitação de 300 rpm para as aerações de 0,4 e 1,0 vvm, seguindo a mesma metodologia. Neste caso se obteve valores até 28,6% menor do que os valores de  $k_{La}$  calculados para a testagem em 200 rpm. E não houve um aumento tão grande de uma condição de aeração para outra neste segundo ensaio, sendo que seria esperado uma máxima transferência de oxigênio para 1,0 vvm e 300 rpm. Assim como, foram obtidas transferências menores do que no primeiro ensaio para essa mesma agitação, como mostra a linha cinza na Figura 14. Mais uma vez têm-se evidências que não corroboram com o esperado pela visão teórica com relação à influência positiva da agitação e aeração no coeficiente de transferência de oxigênio.

Figura 11 - Comparativo entre o segundo ensaio realizado sob 300 rpm de agitação no reator STR, para as aerações de 0,4 e 1,0 vvm.



Fonte: Próprio Autor.

Com mais essa evidência, sugere-se preparar uma nova solução a cada par de condição testada, ou seja, para cada aumento de aeração iniciar os testes como uma nova solução, ao invés de mudar a solução apenas no fim das testagens das três aerações para uma agitação, como foi a proposta neste estudo.

Devido aos pontos relatados acima, principalmente com relação à discrepância entre os valores de  $k_{La}$  calculados a partir do método sulfito e valores de estudos que utilizaram diferentes métodos, foi realizado um ensaio nas condições de 0,2 vvm e 370 rpm no reator STR. O objetivo foi comparar o resultado que seria obtido a partir do método de sulfito com o da sonda de oxigênio dissolvido, já que para esta condição conhecia-se o valor de  $k_{La}$  ( $22,98 \text{ h}^{-1}$ ), obtido por Alves (2021).

Pela Figura 13 nota-se que houve uma ótima correlação entre os valores de volume de tiosulfato gasto ao decorrer do tempo, evidenciando a transferência de oxigênio para solução de sulfito.

Figura 12 - Resultados obtidos no ensaio com 370 rpm de agitação e 0,2 vvm de aeração no biorreator convencional (STR).



Fonte: Próprio Autor.

Porém, quando é feita a comparação do valor de  $k_{La}$  calculado para este ensaio ( $110,8 \text{ h}^{-1}$ ) com o valor obtido através da medição por sonda de oxigênio (Tabela 7) tem-se um  $k_{La}$  4,82 vezes maior. Assim, tem-se mais uma evidência de que o valor absoluto de  $k_{La}$  que se obtém empregando o método de sulfito não condiz com o real, sendo um valor superestimado.

Tabela 7 - Valores de  $k_{La}$  obtidos com a sonda de oxigênio e método sulfito.

	$k_{La}$ sonda	$k_{La}$ sulfito
Reator STR*	22,98 h <sup>-1</sup>	110,8 h <sup>-1</sup>

\*Agitação 370 rpm e Aeração 0,2 vvm

Fonte: Próprio Autor.

Portanto, a partir das evidências relatadas ao longo deste estudo, percebe-se que apesar de terem sido controlados os principais parâmetros relatados em artigos já publicados, se obtiveram números superestimados e sequências não coerentes com o esperado. Com isso, é questionado se o método de sulfito com quantificação através da iodometria deve ser uma opção para o estudo da transferência de oxigênio em reatores.

## 6 CONCLUSÃO

Após a realização do estudo, tornou-se possível concluir que apesar de o método sulfito ser amplamente conhecido como forma de calcular a transferência de oxigênio em reatores, ainda há aspectos que precisam ser melhor explorados para guiar a correta execução do método em diferentes reatores e condições.

Foi possível concluir que os valores obtidos para o coeficiente de transferência de oxigênio ( $k_{La}$ ) nas diferentes condições estão superestimados. Dessa forma, levanta-se o questionamento de que o método sulfito com a determinação da concentração da solução dada por iodometria precisaria ser melhor compreendido em relação aos parâmetros de interferência para seu uso na determinação do  $k_{La}$ .

Embora o estudo sobre a reação entre oxigênio e sulfito tenha sido realizado sistematicamente neste trabalho e alguns resultados úteis foram obtidos, há também alguns outros aspectos que necessitam ser melhor explorados. Para futuros trabalhos, recomenda-se ter maior atenção com a variação de pH e a realização de mais ensaios para entender com maior profundidade a interferência dos fatores como concentração de sulfito, catalisador de cobalto, temperatura e pH na aplicação do método sulfito para o reator não convencional.

Contudo, acredita-se que, resolvendo-se a questão da linearidade para condições de transferência crescentes, o método da oxidação do sulfito pode ser uma ferramenta útil para a ampliação de escala de processos fermentativos aeróbios quando não é possível empregar o método dinâmico com sonda de oxigênio dissolvido.

## REFERÊNCIAS

ALVES, S. C. **Evaluation of the production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella oxytoca* under different pH conditions in stirred flasks.** 2021. 97 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2021.

BADINO, JNR, Alberto Coli; SCHMIDELL, Willibaldo. Agitação e Aeração em Bioprocessos. In: Schmidell, W. (Organizador do volume), **Coleção Biotecnologia Industrial**, Engenharia Bioquímica, vol. 2. Edgard Blücher Ltda, São Paulo, pp. 241–310. 2021.

BUSTAMANTE, M. C. C. **Transferência de Oxigênio e Condições de Cisalhamento em Biorreator Convencional com Impelidores Orelha de Elefante.** 2013. 197 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2013.

CERRI, M. O. **Avaliação de transferências de calor e massa em biorreator Airlift de bancada para a produção de ácido clavulânico.** 2005. 116 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2005.

COOPER, C. M.; FERNSTROM, G. A.; MILLER, S. A.. Performance of Agitated Gas-Liquid Contactors. **Industrial & Engineering Chemistry**, [S.L.], v. 36, n. 6, p. 504-509, jun. 1944.

DEEPA, S. Assessment of  $k_{LA}$  (Oxygen Transfer Coefficient) – 6 Methods. (<https://www.biologydiscussion.com/cell-biology/assessment-of-kla-oxygen-transfer-coefficient-6-methods/7681>). Acesso em 01/2/2022.

DE WAAL, K. J. A.; OKESON, J. C. The Oxidation of Aqueous Sodium Sulphite Solutions. **Chem. Eng. Sci.**, v. 21, p. 559-572, 1966.

DOMINGOS, Marcelo. **Estudo do crescimento de Ceriporiopsis subvermispora em culturas submersas para a produção de inóculos destinados ao processo de biopolpação.** 2009. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia Industrial, Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo. Lorena, 2009.

DOMINGOS, Marcelo; SOUZA-CRUZ, Priscila Brasil de; FERRAZ, André; PRATA, Arnaldo Márcio Ramalho. A new bioreactor design for culturing basidiomycetes: mycelial biomass production in submerged cultures of ceriporiopsis subvermispora. **Chemical Engineering Science**, [S.L.], v. 170, p. 670-676, out. 2017.

DORAN, Pauline M. Chapter 8 - Mixing. In: DORAN, Pauline M.. **Bioprocess Engineering Principles**. 2. ed. Academic Press, United Kingdom, Cap. 8, p. 255-332. 2013.

GARCIA-OCHOA, Felix; GOMEZ, Emilio. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. **Biotechnology Advances**, [S.L.], v. 27, n. 2, p. 153-176, mar. 2009.

GARCÍA-OCHOA, Félix; GÓMEZ, Emilio. Mass transfer coefficient in stirred tank reactors for xanthan gum solutions. **Biochemical Engineering Journal**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 1-10, jan. 1998.

GOGATE, Parag R; BEENACKERS, Anthony A.C.M; PANDIT, Aniruddha B. Multiple-impeller systems with a special emphasis on bioreactors: a critical review. **Biochemical Engineering Journal**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 109-144, out. 2000.

HEINEN, K. F. **Caracterização da transferência de oxigênio em sistema aerado e agitado para aplicação na produção de biossurfactante**. 2018. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Pós Graduação em Engenharia Química - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2018.

JUNKER, B. H.; STANIK, M.; BARNA, C.; SALMON, P.; PAUL, E.; BUCKLAND, B. C.. Influence of impeller type on power input in fermentation vessels. **Bioprocess Engineering**, [S.L.], v. 18, n. 6, p. 401, 1998.

KLEINSTREUR, C. Analysis of biological reactors. In: BUNGA Y, H.R.; BELFORT, G. **Advanced Biochemical Engineering**. 1. ed. John Wiley & Sons, Inc., Nova York, Cap. 3, p. 33-78. 1987.

LINEK, V.; VACEK, V.. Chemical engineering use of catalyzed sulfite oxidation kinetics for the determination of mass transfer characteristics of gas—liquid contactors. **Chemical Engineering Science**, [S.L.], v. 36, n. 11, p. 1747-1768, 1981.

LIU, Shijie. Chapter 1 - Introduction. In: LIU, Shijie. **Bioprocess Engineering**. Elsevier Science, New York, Cap. 1, p. 1-20. 2013.

MAIER, B.; DIETRICH, C.; BÜCHS, J. Correct Application of the Sulphite Oxidation Methodology of Measuring the Volumetric Mass Transfer Coefficient  $k_{LA}$  Under Non-Pressurized and Pressurized Conditions. **Food And Bioproducts Processing**, [S.L.], v. 79, n. 2, p. 107-113, jun. 2001.

MÁRQUEZ, A. L.; WILD, G.; MIDOUX, N. A review of recent chemical techniques for the determination of the volumetric mass-transfer coefficient  $k_{LA}$  in gas—liquid

reactors. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 33, p. 247–260, 1994.

NAJAFPOUR, G. D. CHAPTER 6 - Bioreactor Design. In: D.NAJAFPOUR, Ghasem. **Biochemical Engineering and Biotechnology**. Elsevier Science, Amsterdam, Cap. 6, p. 142-169. 2007.

NOVÁK, M.; KLEKNER, V. Comparison of various methods of  $k_{LA}$  estimation in cultures of filamentous microorganisms. **Biotechnology Techniques**, [S.L.], v. 2, n. 4, p. 243-248, dez. 1988.

PRATA, A. M. R. et al. **Biorreatore com sistema de agitação e aeração específico para cultivo de células aderentes e/ou sensíveis ao cisalhamento.** BR n. PI 1003119-7. Depósito: 17 ago. 2010. Concessão: 24 abr. 2012.

SATHYAMURTHY, N. et al. Absorção de oxigênio por soluções aquosas de sulfito de sódio. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 57, n. 2, p. 145-149, 1979.

SCHULTZ, J. S.; GADEN, E. L. Sulfite Oxidation as a Measure of Aeration Effectiveness. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 48, n. 2, p. 2209–2212, 1956.

TABUCHI, S. C. T. et al. Kinetic Study of Lasiodiplodan Production by Lasiodiplodia theobromae MMPI in a Low-Shear Aerated and Agitated Bioreactor. **Journal Of Polymers And The Environment**, [S.L.], v. 29, n. 1, p. 89-102, 18 ago. 2020.

VANZARA, Piyush B. **Investigation on hydrodynamic and mass transfer behavior of draft tube bubble columns.** 2014. 212 f. Thesis (Doctorate) - Doctor Of Philosophy In Chemical Engineering, Department Of Chemical Engineering, The Maharaja Sayajirao University Of Baroda, Vadodara, 2013.

YAHAYA, GO et al. Comportamento da solução de copolímeros em bloco solúveis em água hidrofobicamente associados de acrilamida e N-benzilacrilamida. **Polímero**, v. 42, n. 8, p. 3363-3372, 2001.