

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA POLITÉCNICA DA ESCOLA DE SÃO PAULO**

**Modelagem matemática do processo de fermentação alcoólica em
batelada com alta densidade celular: Efeito da concentração de substrato,
células e temperatura nos parâmetros cinéticos**

SÃO PAULO

2020

LUCAS G. CARNEIRO
ANDRÉ G. BOVOLINI

Modelagem matemática do processo de fermentação alcoólica
em batelada com alta densidade celular: Efeito da concentração
de substrato, células e temperatura nos parâmetros cinéticos

**Trabalho de Conclusão de Curso submetido
à Universidade de São Paulo, como requisito
necessário para obtenção do grau de Bacha-
rel em Engenharia Química**

Área de Concentração: Engenharia Química

**Orientador: Reinaldo Giudici
Co-Orientador: Kevy Pontes Eliodório**

São Paulo, Abril de 2020

Autorizamos 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.

RESUMO

CARNEIRO, Lucas Grober; BOVOLINI, André Gandelman. **Modelagem matemática do processo de fermentação alcoólica em batelada com alta densidade celular: Efeito da concentração de substrato, células e temperatura nos parâmetros cinéticos**. Orientador: Reinaldo Giudici e Kevy Pontes Eliodório. 2020. 48 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O objetivo deste projeto é o desenvolvimento de um modelo matemático para o processo de fermentação alcoólica em um biorreator em batelada, considerando-se os efeitos térmicos, da concentração inicial de células e substrato nos parâmetros cinéticos. O modelo cinético é baseado em balanços macroscópicos de massa para cada um dos componentes, bem como da cinética aparente das transformações presentes.

Experimentalmente, manipulou-se as condições iniciais das células, do substrato e da temperatura, visando obter condições mais próximas possíveis às encontradas pelas leveduras em ambiente industrial na produção de etanol, como alta pressão osmótica, alta concentração de nutrientes e inibidores. Um design experimental do tipo Box-Benkhen foi utilizado com as três variáveis avaliadas em três níveis, visando encontrar seus efeitos nos rendimentos e nos parâmetros cinéticos.

Com os dados experimentais obtidos no design, realizou-se a estimativa dos parâmetros cinéticos por meio do software matemático MATLAB®, aplicando-se um método de mínimos quadrados não linear e o algoritmo de Newton “trust-region reflective” por meio da função lsqcurvefit. Os dados obtidos foram correlacionados com as variáveis de entrada por meio do software Minitab®, a partir do qual se obteve a regressão para um modelo de segunda ordem.

Assim, espera-se, com os resultados, que o modelo proposto complemente a literatura com o efeito da temperatura e outras variáveis nos parâmetros cinéticos. E, além disso, apresente uma representação mais precisa dos reatores operando em escala industrial, em que as células enfrentam bruscas variações devido à dificuldade de controle de temperatura e condições de processo.

Palavras-chave: Modelagem matemática. Fermentação alcoólica. Otimização de parâmetros. Cinéticas de crescimento celular. Planejamento experimental Box-Benkhen.

ABSTRACT

CARNEIRO, Lucas Grober; BOVOLINI, André Gandelman. **Modelagem matemática do processo de fermentação alcoólica em batelada com alta densidade celular: Efeito da concentração de substrato, células e temperatura nos parâmetros cinéticos**. Orientador: Reinaldo Giudici e Kevy Pontes Eliodório. 2020. 48 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

The objective of this project is to develop a mathematical model regarding the alcoholic fermentation process in a batch bioreactor, considering thermal effects, and those of initial concentration of cells and substrates in kinetic parameters. The kinetic model is based on macroscopic mass balances for each component, as well as apparent kinetic transformations present within them.

Experimentally, initial cell conditions, the substrate and temperature were manipulated, aiming to achieve the closest conditions to one that the yeast has in an ethanol-industrial environment, such as high osmotic pressure, high concentration of nutrients, and chemical inhibitors. A Box-Benken experiment design was used, considering three variables observed in three levels, aiming to find their effects on the yield and the kinetic parameters.

With the experimental data obtained, a kinetic parameter estimate was made, using the mathematical software MATLAB®, making use of the method of non-linear least squares and Newton's "trust-region reflective" algorithm with the lsqcurvefit function. The obtained data was correlated with entry variables using the Minitab® software, by means of which a second order regression model was made.

Thus, it's desired that these results, combined with the proposed model, strengthen the existent literature with data on temperature and other kinetic parameters. And, along with that, to bring in a more precise representation of the reactors operating in industrial scale, in which cells face abrupt environmental variations, due to the difficulty in controlling temperature and process conditions.

Keywords: Mathematic modeling. Alcoholic fermentation. Parameter optimization. Kinetics on cell growth. Box-Bekhen experimental planning.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1	Produção de etanol no Brasil	10
2.2	Fermentação do etanol	10
2.3	Processo de fermentação	12
2.3.1	Processo em batelada	12
2.3.2	Processo em batelada alimentada	12
2.3.3	Processo contínuo	13
2.4	Bioquímica da fermentação alcoólica	14
2.5	Fatores que influenciam	16
2.5.1	Temperatura	16
2.5.2	Concentração de açúcares	16
2.5.3	Concentração de células	16
2.6	Cinéticas da fermentação	17
2.7	Cinéticas de crescimento celular	18
2.8	Cinéticas de formação de produto e consumo de substrato	19
3	MATERIAIS E METODOLOGIAS	21
3.1	Fermentação alcoólica	21
3.1.1	Propagação e armazenamento dos microrganismos	21
3.1.2	Preparo do inóculo	21
3.1.3	Preparo dos meios para cinética	21
3.1.4	Preparação das cinéticas	21
3.1.5	Amostragem	22
3.1.6	Preparação das amostras de vinho para análise	23
3.1.7	Determinação da concentração dos metabólitos	23
3.1.8	Medidas de massa seca	23
4	RESULTADOS	24
4.1	Planejamento experimental Box-Benkhen	24
4.2	Resultados	25
5	DESENVOLVIMENTO	27
5.1	Modelagem matemática	27
5.1.1	Balanços de massa	27

5.1.2	Fatores de conversão	28
5.1.3	Regimes de operação em biorreatores	28
5.2	Reator isotérmico	29
5.2.1	Balanços de massa	29
5.2.2	Determinação dos parâmetros cinéticos	31
5.2.2.1	Estimativa dos Parâmetros	31
5.2.2.2	Resultados	31
6	CONCLUSÃO	42
7	CRONOGRAMA FINAL	43
	APÊNDICE A – CÓDIGO DO MATLAB	44
A.0.1	Código base	44
A.0.2	Função ode45	45
A.0.3	Função de Modelagem	46
	REFERÊNCIAS	47

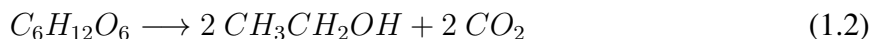
1 Introdução

O interesse em produção de bioetanol tem crescido ao longo das décadas, tendo como principal motivo reduzir os problemas ocasionados pela excessiva produção de gases de efeito estufa (GEE), oriundos principalmente de combustíveis fósseis. Além da parte ambiental, esse biocombustível tem se tornado atrativo economicamente, uma vez que o Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo [ANP, 2019] (27,24 bilhões de litros em 2018 [CONAB, 2019]) e o mercado a ser explorado é amplo. Para o setor sucroenergético, tem-se que o valor bruto anual movimentado supera US\$ 100 bilhões [UNICA, 2016]. Sendo responsável, além disso, por 17% da matriz energética e por 41% da energia renovável ofertada no Brasil [UNICA, 2016].

O bioetanol é produzido por microrganismos, sendo o mais utilizado a levedura *Saccharomyces cerevisiae* [CARDONA; SANCHEZ; GUTIERREZ, 2009][ELIODÓRIO et al., 2019], amplamente empregada na produção de pães, cervejas e vinhos. Desta forma, o processo faz uso do metabolismo da levedura, que converte os açúcares para sua multiplicação celular. Os principais produtos metabólicos são o etanol e o gás carbônico CO_2 , que fazem parte do metabolismo energético em anaerobiose, gerando energia necessária para a manutenção de viabilidade e produção de mais células, em uma reação que pode ser simplificada expressa por:



Em que S é o substrato limitante, normalmente a fonte de carbono, usualmente encontrado na forma de sacarose, glicose e frutose (Figura 1). A sacarose é um dissacarídeo que quando hidrolisado gera uma molécula de glicose e frutose, seus monossacarídeos constituintes. O substrato é metabolizado, em condições anaeróbicas, produzindo mais leveduras e aumentando a concentração de células (X), etanol (P) e CO_2 — processo que tem como uma de suas etapas a via metabólica de Embden-Meyerhof-Parnas [OLIVEIRA et al., 2017]. A estequiometria da fermentação de etanol, a partir de sacarose, é descrita, de maneira simplificada, por:



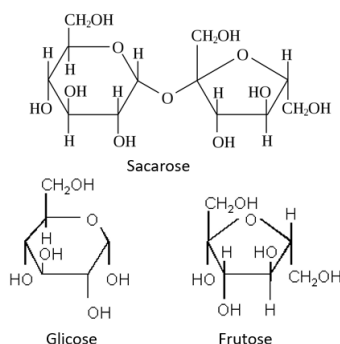
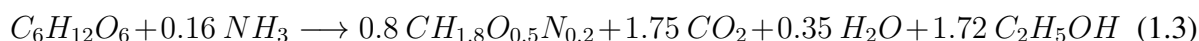


Figura 1 – Estruturas moleculares da sacarose, glicose e frutose

Fonte: Autor

Para a *Saccharomyces cerevisiae*, de acordo com Doran (1995), a reação simplificada começa com açúcares fermentáveis, principalmente os de seis carbonos, sendo reduzidos em reações metabólicas para a produção de mais células (composição média $CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$), etanol ($C_6H_{12}O_6$) e CO_2 , em condições anaeróbicas [ELIODORIO; GIUDICI, 2019]. Para a produção de mais células é necessário que exista uma fonte de nitrogênio [DORAN, 1995]— representada aqui pela amônia (NH_3). Desta forma, a reação pode ser expressa mais detalhadamente por [DORAN, 1995]:



O desenvolvimento de parâmetros eficientes no controle de processos de fermentação de etanol requer modelos representativos consistentes, visto que demonstram a necessidade de controle de pH, temperatura do meio, oxigênio dissolvido, concentração de substrato, leveduras e de etanol [OLIVEIRA et al., 2017]. Os biorreatores utilizados precisam ser estudados por modelos matemáticos, com o intuito de melhora no *design* e na otimização do processo, além do estudo cinético das leveduras ao decorrer do tempo, principalmente em relação ao consumo do substrato, crescimento da população celular e produção de etanol [CARDONA; SANCHEZ; GUTIERREZ, 2009].

O estudo deste trabalho, portanto, consiste em modelar matematicamente um biorreator em batelada, não adiabático e não isotérmico. A análise de eficiência dos dados do modelo utilizado e dos parâmetros cinéticos serão comparados com os dados obtidos experimentalmente para validação do modelo.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Produção de etanol no Brasil

Desde sua invenção, os automóveis com motores à combustão eram projetados para utilizar o etanol como principal combustível. Entretanto, durante o início do século XX, a descoberta de petróleo em abundância fez com que seu preço diminuísse muito, tornando a gasolina o principal combustível utilizado (Amorim e Lopes [2005]).

A produção de etanol no Brasil ocorre desde a década de 1920, sendo principalmente utilizado domesticamente e como matéria prima para algumas indústrias químicas. A partir da década de 1930, o governo brasileiro passou a implementar uma série de políticas para incrementar o consumo de álcool-motor no país, acarretando elevado crescimento do setor entre os anos de 1950 e 1970 (Bray, Ferreira e Ruas [2000]).

Porém, a utilização do etanol como combustível apenas se tornou expressiva após o Primeiro Choque do Petróleo, em 1973, que incitou a busca por fontes alternativas de combustíveis por todo o mundo. Diante desse cenário, o governo brasileiro iniciou, em 1975, o Programa Nacional do Álcool (Próalcohol). Aliado a isso, o desenvolvimento de motores automotivos que podiam ser movidos totalmente a álcool, com conteúdo de 94% de etanol hidratado, contribuiu para a ampliação do programa, que recebeu empréstimos do Banco Mundial para garantir sua viabilidade (Nitsch [1991]).

Com o avanço de tendências mundiais para a substituição do uso de combustíveis fósseis por fontes de energias renováveis e a queda do preço do açúcar no mercado mundial, o Brasil retomou o programa de incentivo à produção do etanol no início do século XXI, impulsionado, também, pelo desenvolvimento de motores com a tecnologia flex-fuel, movidos à gasolina, etanol ou uma mistura dos dois. Desde então os brasileiros podem fazer a escolha de acordo com o preço do combustível e o uso do etanol vem crescendo ano após ano (Kohlhepp [2010]).

Na atualidade a indústria sucroalcooleira brasileira vem operando de maneira sustentável e positiva, uma vez que o etanol produzido é considerado ecologicamente correto por não afetar a camada de ozônio e ser proveniente de fontes sustentáveis. O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo. A estimativa é que a safra de 2019/20 de cana-de-açúcar atinja 642,7 milhões de toneladas, colhidas em 8,48 milhões de hectares, proporcionando uma produção de 30,1 milhões de toneladas de açúcar e 33,8 bilhões de litros de etanol. (CONAB [2019]).

2.2 Fermentação do etanol

A indústria de etanol brasileira utiliza a cana de açúcar como principal matéria prima, , tanto por sua grande disponibilidade, quanto por vantagens relacionadas ao processo produtivo.

Uma delas é o fato de o balanço energético da produção de etanol através da cana-de-açúcar ser extremamente favorável em comparação com outras matérias primas, como o milho, cuja produtividade chega à metade do valor obtido com a cana. Além disso, mesmo com alta eficiência, há a geração de um resíduo sólido durante a extração, a fibra de cana, também conhecida como bagaço, que pode ser utilizado para a produção de energia nas plantas sucroalcooleiras, tornando a grande maioria delas autossuficiente em termo de utilização de energia e, em alguns casos, parte desta energia chega a ser comercializada (Xavier [2007]). Atualmente, o resíduo lignocelulósico também pode ser direcionado para a produção do etanol de segunda geração (2G), aumentando ainda mais a produção deste combustível (Cola et al. [2020]).

Tendo em vista a utilização da cana-de-açúcar como matéria prima para a produção do etanol, o setor sucroalcooleiro conta com uma predominância de processo integrado de produção de açúcar e etanol. Cerca de 70% das destilarias o adotam (Hendler [2011]), no qual a produção pode ser direcionada para um dos produtos de acordo com os preços deste no mercado (Xavier [2007]), com adoção por cerca de 70% das destilarias (Hendler [2011]).

O processo de produção do etanol se inicia com a colheita da cana-de-açúcar e sua posterior limpeza, de modo a retirar eventuais impurezas que possam prejudicar o processo de fermentação, mesmo que haja uma perda de cerca de 2% dos açúcares. Em seguida, é realizada a extração do açúcar através de moendas, nas quais a cana é comprimida para obtenção do caldo cru e do bagaço (Dias [2008]).

Uma vez extraído, o caldo precisa passar por um tratamento para a recuperação da sacarose com a menor quantidade de impurezas possível, também chamado de caldo clarificado. Ele se inicia com uma etapa física, através de peneiras e ciclones, seguida por uma etapa de tratamento químico para a redução de impurezas e, por fim, passa por uma etapa que envolve a passagem por tanques tipo flash, a decantação de impurezas presentes no caldo e a filtração destas impurezas para a recuperação de parte do açúcar perdido. Parte deste caldo é concentrado através de evaporadores e misturada com o restante para que a concentração final de açúcares seja de aproximadamente 22% Brix (maior do que a concentração de 15% Brix do caldo clarificado), e em seguida este é esterilizado a altas temperaturas. O caldo concentrado e esterilizado é conhecido mosto, que é enviado às unidades de fermentação da indústria (Dias [2008]).

O mosto passa pelo processo de fermentação, que ocorre de duas maneiras na indústria brasileira: processo em batelada alimentada com reciclo de células e processo contínuo (Dias [2008]), com distribuição de 85% e 15% respectivamente (Godoy et al. [2008]). O período de fermentação é, geralmente, de 6 a 12 horas, sendo realizada em múltiplas dornas com alta concentração celular, resultando numa concentração de etanol no caldo entre 7 e 11% em volume, e os níveis residuais de açúcar estão em torno de 0,1% (Amorim et al. [2011]).

O resultado do processo de fermentação é chamado de vinho. Após a remoção das leveduras, este é levado para a destilação (Amorim et al. [2011]). A solução de leveduras separada do vinho é então tratada através da adição de água e de ácido sulfúrico, que regula o pH do meio para níveis nos quais não haja a proliferação de bactérias: entre 2 e 2,5 (Amorim et al. [2011]),

obtendo-se uma concentração final de 28% em volume de células (Dias [2008]).

Após isso, o vinho, já sem as leveduras, passa por um processo de destilação convencional, no qual o etanol é separado dos demais componentes da mistura através dos diferentes pontos de ebulição (Manocchio et al. [2017]), com o objetivo da concentração deste até teores alcoólicos próximos ao azeotrópo. Nesse processo, é produzido o álcool etílico hidratado carburante (AEHC), com teor de etanol variando entre 92,6 e 93,8% em massa. Já para a utilização do etanol em mistura com a gasolina, o teor alcoólico deve ser superior a 99,3% em massa, o que não é possível através da destilação, de modo que são utilizados métodos alternativos, como destilação extrativa e peneiras moleculares (Dias [2008]).

2.3 Processo de fermentação

Os processos de fermentação industriais podem ser operados em três regimes distintos de operação: batelada, batelada alimentada (conhecido como Melle-Boinot) e contínuo. Atualmente a grande maioria das indústrias utiliza o processo em batelada alimentada, herança de adaptações de plantas já existentes durante o período do Pró-álcool, porém aos poucos vem ocorrendo uma migração para processos contínuos (Tosetto [2008]).

2.3.1 Processo em batelada

O processo de fermentação em batelada, também conhecido como descontínuo simples, ocorre através da preparação do reator com um meio de cultura (no nosso caso, o mosto), e um inóculo. Assim que o volume do reator é preenchido, inicia-se o processo de fermentação, que pode ser operado de duas maneiras: através de uma cultura pura, no qual o volume do reator é totalmente preenchido com mosto e aguarda-se até o final da fermentação, ou através do sistema de cortes (Tosetto [2008]), em que a primeira fermentação é seguida da divisão do mosto em outros dois tanques que são totalmente preenchidos, e a fermentação corre até que ocorra o total consumo do substrato (Sato [2001]).

Por mais que este processo seja considerado lento em comparação aos outros, uma vez que é preciso preparar o reator antes de cada batelada, isto também faz com que seja mais seguro em termos de manutenção das condições de assepsia, visto que o reator pode ser limpo e esterilizado a cada ciclo, assim evitando a presença de micro-organismos indesejados.

2.3.2 Processo em batelada alimentada

O processo em batelada alimentada, também conhecido como Melle-Boinot, difere do processo de batelada convencional pelo volume do reator não ser constante durante sua operação, pois a vazão e o regime de alimentação podem ser controlados e variados ao longo do tempo, de modo que é possível controlar a concentração de substrato no reator e assim direcionar o

metabolismo dos micro-organismos para a via de produção de um determinado produto desejado e reduzir os efeitos da inibição por substrato.

Além disso, após a finalização do processo, as células são separadas do vinho através de centrifugação e sedimentação, de modo a não serem enviadas para a coluna de destilação. Assim, o fermento pode ser reciclado para outras bateladas, não apenas reduzindo o custo de produção, como também aumentando a eficiência de produção. A figura 2 abaixo representa de maneira simplificada o processo de fermentação em batelada alimentada com reciclo de células.

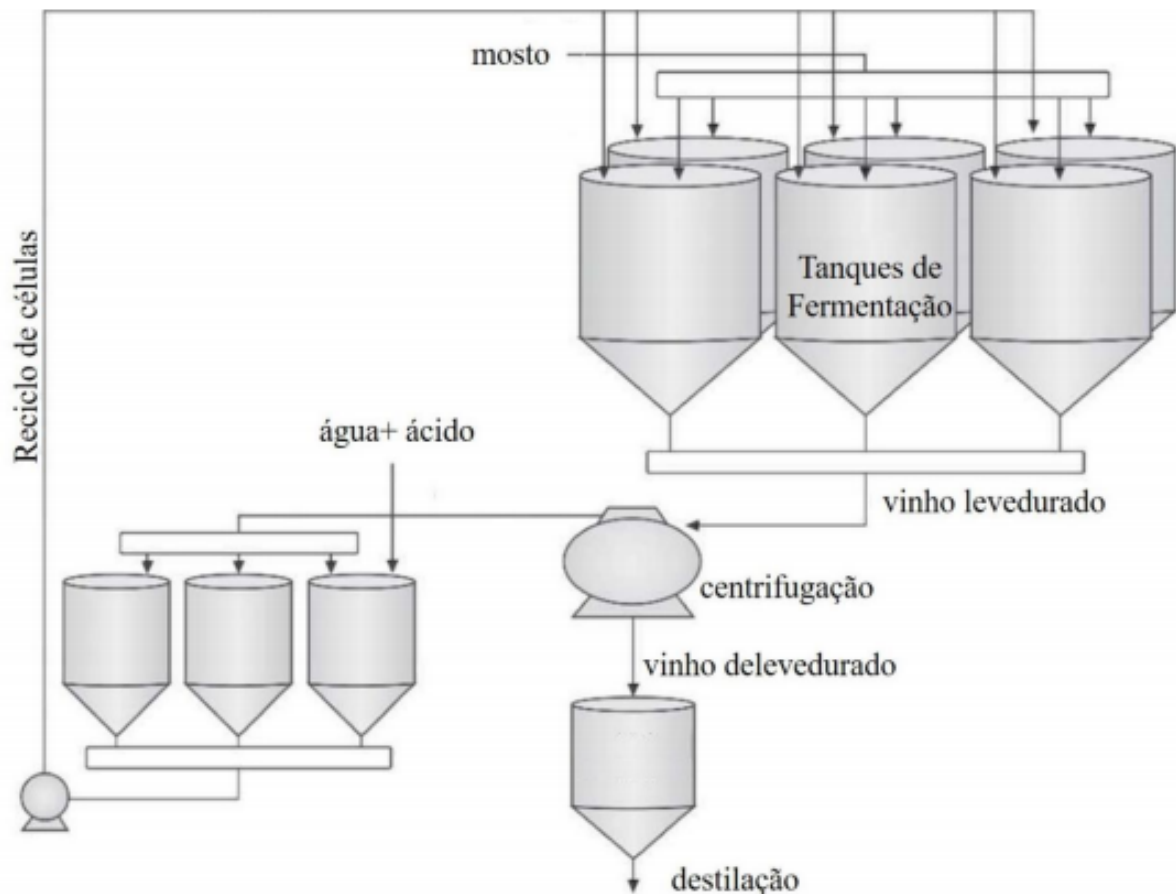


Figura 2 – Processo de produção de etanol em batelada alimentada

Fonte: Adaptado Lopes et al. [2016]

2.3.3 Processo contínuo

O processo contínuo é caracterizado por ser um processo aberto e sem interrupções, ao contrário dos mencionados anteriormente. A vazão de alimentação de meio de cultura é constante e igual à vazão de saída de caldo fermentado, de modo que o volume da reação é mantido constante, bem como as concentrações de substrato, células e produto. Geralmente indústrias que adotam este tipo de processo utilizam entre 3 e 5 reatores do tipo CSTR ligados em série (Facciotti [2001]).

A implementação correta do processo contínuo vem trazendo ótimos resultados para a indústria sucroalcooleira, como redução do tempo não produtivo, uma vez que não é necessário esvaziar, limpar e reabastecer o reator, redução da utilização de insumos, aumento da produtividade, operação em condições ótimas no estado estacionário e redução de gastos com mão-de-obra, visto que este tipo de operação facilita a adoção de equipamentos de controle. Entretanto, por se tratar de um processo aberto este possui algumas desvantagens do ponto de vista da assepsia, pois o risco de contaminação é mais elevado e podem acontecer mutações genéticas que venham a gerar microorganismos menos produtivos, além de problemas que podem surgir durante a operação em estado estacionário, como acúmulo e crescimento de microorganismos nas instalações (Facciotti [2001]).

Ainda assim, esse processo vem sendo cada vez mais aprimorado e aplicado em indústrias de produção de etanol, cuja representação simplificada é apresentada na figura 3.

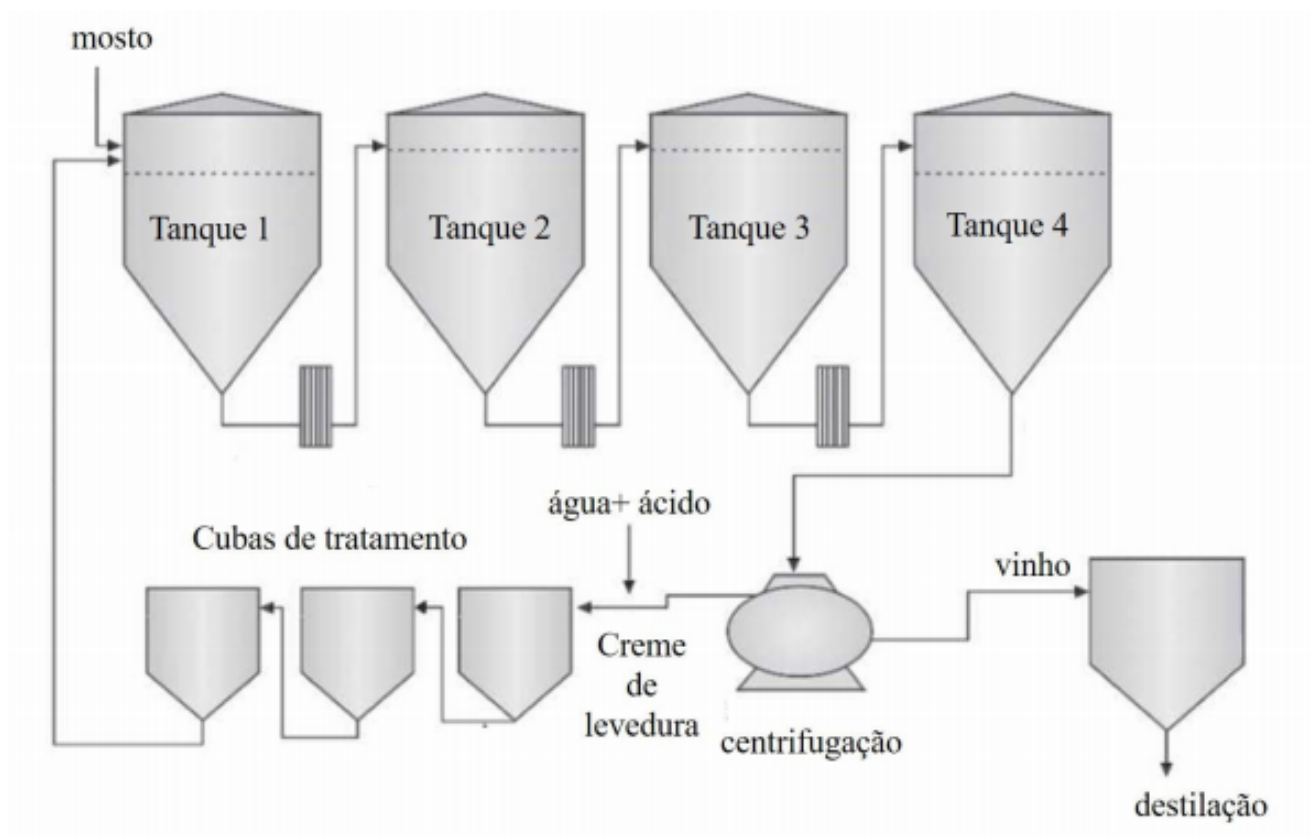


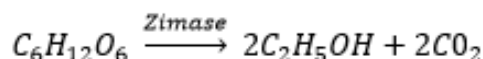
Figura 3 – Processo contínuo de produção de etanol

Fonte: Adaptado Lopes et al. [2016]

2.4 Bioquímica da fermentação alcoólica

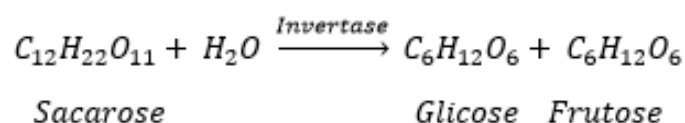
O processo fermentação alcoólica consiste, essencialmente, em uma série de reações químicas catalisadas por micro-organismos, como as leveduras (Lopes, Gabriel e Borges [2011]). No caso das indústrias brasileiras são empregadas as leveduras do tipo *Saccharomyces cerevisiae*.

De maneira simplificada a fermentação é a oxidação incompleta de açúcares fermentescíveis gerando um composto orgânico oxidável, podendo ser representado pela equação abaixo:

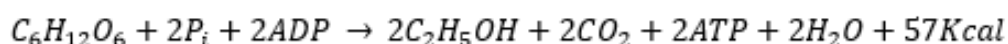


Esta transformação se dá através de uma sequência de 12 reações anaeróbicas ordenadas que ocorrem no citoplasma da células, uma vez que nesta região se encontram as enzimas necessárias para catalisá-las. O etanol e o CO₂ são apenas subprodutos deste ciclo, cujo principal objetivo para a célula é obtenção de ATP sem a presença de um aceptor externo de elétrons (O₂). Além do etanol, uma parte dos açúcares metabolizados pela célula é utilizado para obtenção de outros compostos essenciais, por exemplo o glicerol (Lima, Basso e Amorim [2001]).

Na fermentação industrial, cujo açúcar predominantemente fermentado é a sacarose existe um processo inicial de inversão da sacarose, no qual esta é transformada pela enzima invertase nas hexoses glicose e frutose (Lopes, Gabriel e Borges [2011]):



Após este processo as hexoses são submetidas ao processo da glicólise, no qual as moléculas de glicose passam por uma série de reações até serem transformadas em ácido pirúvico. Para a obtenção do etanol é necessário que o processo seja realizado na ausência de oxigênio, de modo a estimular a ação das enzimas piruvato-descarboxilase e álcool-desidrogenase (Eq.1). Caso contrário, o ácido pirúvico é deslocado para o Ciclo de Krebs, cujo produto é apenas CO₂ e água (Tosetto [2008]).



Através da reação global da glicólise é possível calcular o rendimento teórico da produção do etanol ($Y_{P/S}$): 1 mol de glicose (180g) produz dois mols de etanol (92g), 2 mols de CO₂ (88g) e 57 Kcal, de modo que o rendimento máximo teórico é $Y_{P/S} = 0,511$ (Tosetto [2008]). Apesar de atingir rendimentos muito altos, o máximo teórico não é observado na prática, pois há a utilização de parte das hexoses para a produção de outros compostos essenciais para manutenção da levedura e para a síntese de material celular (Sonego [2016]).

2.5 Fatores que influenciam

As condições de um meio são fatores determinantes tanto em condições naturais como durante o processo de fermentação, uma vez que estas provocam diferentes condições de estresse nas células, afetando a maneira como seu metabolismo funciona (Folch-Mallol et al. [2004]). Elas podem ser físicas, como temperatura e pressão osmótica; químicos, como pH e inibidores; e microbiológicos, como concentração de levedura e contaminação bacteriana do meio. Geralmente, a estequiometria do processo é afetada, de modo que mais produtos secundários são produzidos (Lima, Basso e Amorim [2001]).

2.5.1 Temperatura

A temperatura ideal para a realização da fermentação alcoólica por leveduras é entre 26°C e 35°C. O aumento da temperatura, por mais que aumente a velocidade da fermentação, facilita a contaminação bacteriana do meio e torna as leveduras mais sensíveis ao etanol. Além disso, a perda de etanol por evaporação aumenta com temperaturas elevadas, o que acaba por diminuir o teor alcoólico do vinho e assim a etapa de destilação possui um maior gasto energético, tornando o processo mais custoso (Dias [2008]).

2.5.2 Concentração de açúcares

O aumento da concentração de açúcares do meio pode, por um lado, aumentar a velocidade e a produtividade da fermentação, acarretando um menor crescimento do fermento e menor produção de glicerol, aumentando a conversão do processo. Entretanto, concentrações muito elevadas de açúcares, e consequentemente de outros compostos presentes no meio, podem acarretar um estresse osmótico muito elevado nas células, uma vez que é gerada uma perturbação na pressão osmótica na membrana plasmática, causando a água a ser transportada para fora da célula (Lima, Basso e Amorim [2001]). Isto faz com que haja uma redução do tamanho do micro-organismo, gerando um efeito potencialmente nocivo ele, e aumentando a necessidade de energia para sua preservação, uma vez que mais energia é dedicada para manter concentração intracelular de eletrólitos constante (Helle et al. [2014]).

2.5.3 Concentração de células

Uma maior concentração de células no meio pode trazer benefícios para o processo de fermentação, como aumento da velocidade e da produtividade, além de maior controle sobre as bactérias e diminuição do crescimento das próprias leveduras. Entretanto, a utilização de maiores concentrações de leveduras implica em um maior consumo de açúcares para manutenção devido ao próprio estresse gerado pela alta densidade celular, além de uma maior competitividade

pelos nutrientes do meio, que muitas vezes estão em baixa quantidade, reduzindo a viabilidade celular (Lima, Basso e Amorim [2001]).

2.6 Cinéticas da fermentação

O processo de fermentação alcoólica envolve uma série de reações, nas quais são produzidos diferentes compostos através do consumo de um substrato, além do crescimento celular. Assim, para que seja possível realizar um projeto de modelagem, é necessário determinar a forma como as concentrações destes componentes variam, como a taxa de produção de etanol e outros subprodutos e a taxa de consumo de substrato e a taxa de crescimento celular. Também é necessário analisar a influência de parâmetros sobre essas taxas, como por exemplo pH do meio, a temperatura, a concentração de substrato, dentre outros (Viegas [2003]).

Os valores experimentais da concentração de microorganismos, produtos e substratos (X , P e S respectivamente) são representados em função do tempo para a obtenção das curvas de ajuste para a determinação das taxas de produção e consumo destes. Escolhe-se o produto de interesse econômico e o substrato limitante para esta representação. A figura 4 apresenta curvas de ajuste para os resultados obtidos através de uma fermentação em batelada (Hiss [2001]).

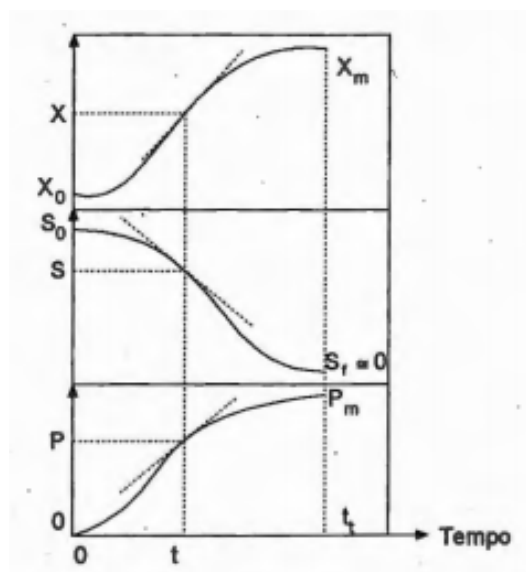


Figura 4 – Cinéticas da fermentação

Fonte: Hiss [2001]

Através dos dados utilizados para a elaboração dos gráficos anteriores é possível determinar as velocidades instantâneas de crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto (r_X , r_S e r_P , respectivamente). Entretanto é preciso considerar o fato de que a concentração microbiana aumenta durante um processo de fermentação em batelada. Logo, pode-se considerar que o complexo enzimático responsável pela produção do produto e consumo etanol também aumenta. Assim analisa-se o valor das velocidades instantâneas de crescimento em função da

concentração microbiana, denominadas velocidades específicas, apresentadas nas equações 6, 7 e 8.

$$\mu_X = \mu = \frac{r_X}{X} = \frac{1}{X} \cdot \frac{\partial X}{\partial t} \quad (2.1)$$

$$\mu_S = \frac{r_S}{X} = \frac{1}{X} \cdot \frac{\partial S}{\partial t} \quad (2.2)$$

$$\mu_P = \frac{r_P}{X} = \frac{1}{X} \cdot \frac{\partial P}{\partial t} \quad (2.3)$$

2.7 Cinéticas de crescimento celular

A velocidade de crescimento celular em processo de fermentação depende de uma série de condições na qual o processo está ocorrendo; Os modelos podem ser classificados como estruturados ou não estruturados e segregados e não segregados, de acordo com o grau de complexidade e esforço computacional requeridos (Bonomi e Schmidell [2001]).

- Modelos não estruturados: micro-organismos são representados através de uma única variável, como massa celular ou número de células, de modo que a variação de componentes intracelulares não é considerada
- Modelos estruturados: As células são detalhadas através de medidas como a de componentes celulares, medindo o estado das células e sua adaptação ao meio
- Modelos não segregados: a população de micro-organismos é considerada homogênea
- Modelos segregados: os micro-organismos são considerados discretos e adota-se uma distribuição de idade, tamanho e propriedades celulares

Na maioria dos casos, a complexidade da utilização de modelos estruturados e segregados não justifica os resultados obtidos. Disso resulta que modelos não estruturados e não segregados sejam mais empregados, uma vez que podem ser usados de maneira mais genérica (Bonomi e Schmidell [2001]).

A equação empírica de Monod é geralmente utilizada para demonstrar a relação entre a taxa específica de crescimento celular e a concentração do Substrato limitante S no meio, e pode ser descrita pela equação 2.4

$$\mu_X = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_S + S} \quad (2.4)$$

Na qual μ_{max} representa a velocidade máxima de crescimento celular, S a concentração de substrato limitante e K_S é a constante de Monod (valor de S no qual a taxa de crescimento é metade de seu valor máximo).

A equação de Monod considera apenas a relação de crescimento por substrato e que apenas as variações na concentração deste componente afetariam o crescimento celular, uma vez que todos os outros componentes do meio estão presentes em altas concentrações e não afetam o valor de μ_X . Desse modo, a equação de Monod não é válida em situações com presença de inibidores no meio de cultura, o que é geralmente observado durante o processo de fermentação. (Viegas [2003])

No processo de fermentação alcoólica, além da inibição por substrato também ocorre a inibição por produto, no caso o etanol. Segundo (Phisalaphong, Srirattana e Tanthapanichakoon [2006]), os efeitos destes dois inibidores podem ser descritos segundo a equação 2.5.

$$\mu_X = \mu_{max} \left(\frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_{SS}}} \right) \left(1 - \frac{P}{P_m} \right) \quad (2.5)$$

Em que K_S é a constante de saturação, K_{SS} o termo de inibição por substrato e P_m o termo de inibição por etanol.

Já Herrera et al. [2016] propuseram um modelo no qual, além da inibição pelo substrato e pelo produto o crescimento celular também sofre o efeito da inibição causada pela alta concentração de células, descrito pela equação 2.6

$$\mu_X = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_S}} \left(1 - \frac{P}{P_m} \right) \left(1 - \frac{X}{X_m} \right) X \quad (2.6)$$

Foram realizado experimentos com *S. cerevisiae* e descreveram os efeitos da inibição por substrato, produto e concentração de células através da equação 2.7 (Evaluation... [2006]).

$$\mu_X = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \exp(-K_i S) \left(1 - \frac{X}{X_m} \right)^m \left(1 - \frac{P}{P_m} \right)^n X \quad (2.7)$$

2.8 Cinéticas de formação de produto e consumo de substrato

A formação de um dado produto durante a fermentação alcoólica pode estar diretamente associada ao crescimento celular, uma vez determinados metabólitos podem ser apenas produzidos quando ocorre o crescimento. Devido a isso, a cinética de formação de produtos pode ser descrita através dos três tipos de inter-relação entre produção e crescimentos: produção associada ao crescimento, produção parcialmente associada ao crescimento e produção dissociada do crescimento, ilustrados na figura 5.

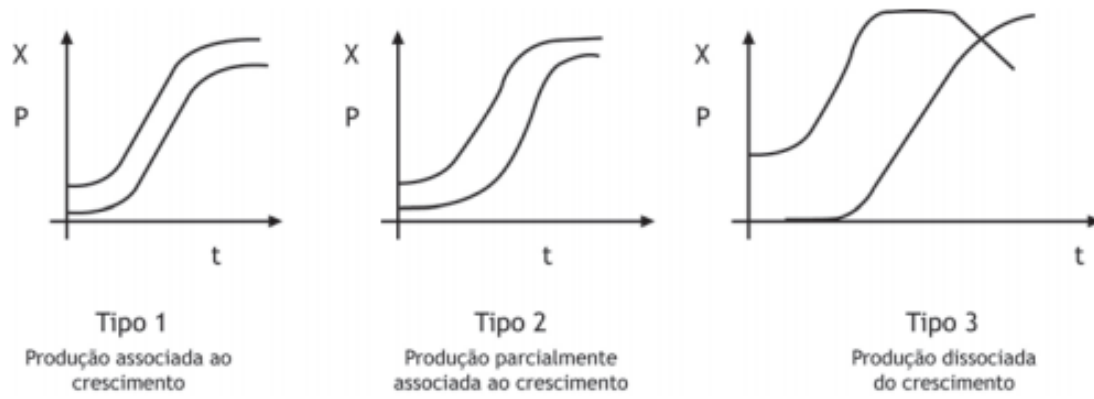


Figura 5 – Cinéticas de formação de produto

Fonte: Bastos [2010]

Assim o seguinte modelo de formação de produto foi proposto por Luedeking e Piret [1959a]:

$$\mu_P = \alpha\mu + \beta X \quad (2.8)$$

Na qual $\alpha\mu$ é o termo que representa a produção associada ao crescimento e βX é o termo associado apenas à massa celular presente. Assim os três tipos de crescimento descritos na figura 5 podem ser representados por (Bastos [2010]):

- Tipo 1: $\mu_P = \alpha\mu = Y_{P/X}\mu$
- Tipo 2: $\mu_P = \alpha\mu + \beta$
- Tipo 3: $\mu_P = \beta$

3 Materiais e Metodologias

3.1 Fermentação alcoólica

3.1.1 Propagação e armazenamento dos microrganismos

Para o estudo em questão foi selecionado a linhagem industrial de levedura PE-2 (Basso et al. [2008]), amplamente estudada na literatura. A linhagem foi crescida em meio YPD (10 g extrato de levedura. L^{-1} , 20 g peptona. L^{-1} e 20 g glicose. L^{-1}) *overnight* a 30°C e 200 rpm. Após o crescimento, 20% (v/v) de glicerol foi adicionado e alíquotas de 1 mL foram armazenadas a -80°C (Cola et al. [2020]).

3.1.2 Preparo do inóculo

Os inóculos para os estudos cinéticos foram preparados em erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL em meio adaptado baseado em YP (10 g extrato de levedura. L^{-1} , 20 g peptona. L^{-1}) contendo 100 g de sacarose. L^{-1} em que foram adicionados uma alíquota de 1 mL dos tubos previamente preparados e armazenados em -80°C. Devido à grande quantidade de células necessárias, diversos inóculos foram preparados. Os inóculos cresceram *overnight* a 30°C e 200 rpm.

3.1.3 Preparo dos meios para cinética

Os meios utilizados na etapa de avaliação cinética foram preparados a partir de melaço concentrado (60% w/w ART) provenientes de indústria sucroalcooleira. Primeiramente, o melaço concentrado foi diluído para uma composição aproximada de 200 g. L^{-1} com base na concentração do estoque de melaço. A solução 200 g. L^{-1} teve sua composição medida por cromatografia líquida de alta-performance e, posteriormente, sua composição foi ajustada para as concentrações de 20, 60 e 100 g. L^{-1} de açúcares redutores totais utilizando-se água destilada.

3.1.4 Preparação das cinéticas

A primeira etapa da preparação das cinéticas consistiu na determinação da concentração de células do inóculo. Recolheu-se um volume conhecido da solução previamente agitada de células e este foi colocado em um *falcon* de 50 mL de massa conhecida, que em seguida foi centrifugado a uma rotação de 5060 rpm e uma temperatura de 4°C durante um tempo de 10 minutos. Com isso havia a formação de um *pellet* de células, de modo que foi possível descartar o líquido e obter a massa úmida de células presente naquele volume de solução, determinando-se

assim a concentração. Previamente, a relação entre massa seca e massa úmida foi realizada, fornecendo, portanto, a concentração em massa seca do inóculo.

Uma vez determinada a concentração de células na solução foi possível calcular o volume necessário para cada um dos ensaios, de acordo com a concentração necessária. O volume foi então distribuído em *falcon* de 50 mL previamente pesados e estes eram centrifugados nas mesmas condições da etapa anterior, para que fosse possível separar as células da solução. Entretanto, como a concentração de células poderia não ser homogênea em toda a solução, determinou-se a massa de células em cada um dos *falcon*. Com a massa total de células disponíveis para a realização das cinéticas calculou-se o volume de melaço que seria necessário para obter as condições desejadas para o ensaio.

O melaço foi então adicionado aos *falcon* que continham células e estes eram vortexados até que todo o *pellet* fosse dissolvido. A partir deste momento iniciava-se o cronômetro para medição do tempo de cada amostra. O meio foi posteriormente distribuído nos *falcons* de 15 mL, cuja quantidade variava com o número de pontos da cinética que se desejava obter. A partir disso, os *falcons* foram parcialmente fechados para que houvessem trocas de gases com a atmosfera e levados a uma incubadora na qual, além de ficarem em temperatura constante determinado pelo ensaio realizado, eram agitados a 150 rpm durante todo o ensaio.

3.1.5 Amostragem

O processo de amostragem iniciou-se pela retirada do *falcon* da estufa, mantendo o registro do tempo no qual isto ocorreu. Em seguida este era imediatamente centrifugado a uma rotação de 5060 rpm e numa temperatura de 4°C por um tempo de 5 minutos, não apenas para que houvesse a formação de um *pellet*, permitindo que o vinho fosse separado da massa de células, como para fazer com que a atividade celular cessasse devido à baixa temperatura, interrompendo a cinética.

Após este processo, foi possível remover o vinho do *falcon* sem que houvesse perda da massa de células. Porém havia a possibilidade de que algumas impurezas presentes no melaço estivessem dentro do *pellet*, o que seria uma fonte de erro para as medidas de massa seca. Assim, com o objetivo de mitigá-la era realizada uma lavagem. Adicionou-se 3 mL de água destilada dentro do *falcon*, que foi vortexado para que o *pellet* fosse parcialmente rompido, e em seguida centrifugado novamente nas mesmas condições citadas anteriormente por mais 5 minutos.

Por fim, a água utilizada para lavagem foi descartada e o *falcon* colocado em uma estufa a 80°C até massa constante, de modo que toda a umidade presente vaporizasse e a massa restante fosse constituída apenas de células. O vinho que fora retirado do *falcon* anteriormente foi então transferido para um microtubo e armazenado em um congelador, a uma temperatura de -20°C.

3.1.6 Preparação das amostras de vinho para análise

As amostras de vinho retiradas anteriormente precisavam ser preparadas antes de que fossem analisadas para remover qualquer impureza que poderia danificar a coluna da cromatografia líquida. Devido a isso as amostras foram inicialmente diluídas dez vezes, e em seguida, centrifugadas a 10000 rpm por um tempo de 10 minutos. Após o processo, foi retirada uma alíquota de 1 mL da parte superior do microtubo e esta era colocada em um vial numerado, que em seguida foi levado para análise.

3.1.7 Determinação da concentração dos metabólitos

A concentração dos metabólitos principais (sacarose, glicose, frutose, glicerol e etanol) foi determinada usando cromatografia líquida de alta-performance (HPLC) com detector de índice de refração utilizando uma coluna de exclusão de íons HPX-87C, isocraticamente eluída a 85°C com água ultra pura em vazão de $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ como fase móvel. Todas as amostras foram previamente centrifugadas (10000rpm, 10 min, 10°C), diluídas dez vezes e filtradas utilizando-se filtros $0.22 \mu\text{m}$ antes de serem injetadas no equipamento.

3.1.8 Medidas de massa seca

Após a total secagem da umidade presente no *falcon*, o que ocorreu após pelo menos 24 horas, estes foram individualmente pesados em uma balança de precisão. Como estes haviam sido pesados antes do início da experiência, foi possível determinar a massa de células presente e a concentração de acordo com cada tempo.

4 Resultados

4.1 Planejamento experimental Box-Benkhen

O planejamento experimental foi baseado no design Box-Behnken, no qual os fatores são variados em apenas 3 níveis. Por mais que este design seja uma fatorial de três níveis incompleta, os pontos experimentais são escolhidos de maneira que seja possível estimar de maneira eficiente os parâmetros de um modelo de segunda ordem, permitindo avaliar o efeito individual de cada variável e as interações de segunda ordem entre essas variáveis. A matriz abaixo apresenta um exemplo de design Box-Behnken para 3 fatores:

$$\begin{bmatrix} \pm 1 & \pm 1 & 0 \\ \pm 1 & 0 & \pm 1 \\ 0 & \pm 1 & \pm 1 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

Os 3 fatores teóricos utilizados para a elaboração do modelo foram a temperatura (T), a concentração inicial de células (X) e a concentração inicial de substrato (S), cujos valores escolhidos são apresentados na tabela abaixo:

Fator	- 1	0	+ 1
Temperatura (°C)	28	31	34
Concentração de células (g/L)	25	37,5	50
Concentração de substrato (g/L)	20	60	100

Tabela 1 – Valores utilizados para os 3 fatores

A tabela 2 apresenta os 16 ensaios realizados. O ponto central (0,0,0) foi realizado em quadruplicata para determinação do erro puro associado às medidas e operação. O ensaio 13 foi descartado devido a problemas relacionados às medidas tomadas.

Ensaio	Temperatura (°C)	Concentração de Substrato (g/L)	Concentração de Células (g/L)
1	34	100	50
2	28	100	37,5
3	28	20	37,5
4	34	20	37,5
5	34	60	37,5
6	34	60	25
7	28	60	25
8	28	60	50
9	31	100	50
10	31	100	25
11	31	20	25
12	31	20	50
13	31	60	37,5
14	31	60	37,5
15	31	60	37,5
16	31	60	37,5

Tabela 2 – Relação dos ensaios realizados

4.2 Resultados

A tabela 3 apresenta as reais concentrações iniciais de substrato e células presentes nos meio

Ensaio	Concentração de Substrato (g/L)	Concentração de Células (g/L)
1	88,319	45,23
2	89,337	36,7
3	17,13	37,3
4	17,527	37,3
5	53,051	35
6	55,078	23,37
7	57,192	24,4
8	50,098	48,5
9	92,508	44,9
10	99,429	24,77
11	17,773	26,53
12	15,726	49,53
13	46,426	39,875
14	51,938	38,225
15	52,084	33,6
16	54,184	32,53

Tabela 3 – Concentrações Iniciais de Substrato e Células

Através da análises das amostras pelo método do HPLC e de medidas de massa seca de células foi possível calcular os valores dos rendimentos experimentais dos ensaios e também a conversão teórica de etanol, apresentados na tabela 4.

Ensaio	Y(P/S)	Y(X/S)	Y(X/P)	Etanol Teórico (%)
1	0.444	0.073	0.164	86.970
2	0.458	0.052	0.114	89.636
3	0.498	-0.250	-0.429	97.436
4	0.475	-0.017	-0.037	93.008
5	0.491	-0.017	-0.035	96.171
6	0.477	0.007	0.015	93.333
7	0.437	0.077	0.177	85.582
8	0.475	0.025	0.053	92.888
9	0.396	0.156	0.393	77.566
10	0.423	0.109	0.257	82.818
11	0.442	0.042	0.095	86.434
12	0.511	-0.091	-0.178	100.050
13	0.407	0.132	0.325	79.729
14	0.436	0.082	0.188	85.413
15	0.452	0.055	0.123	88.375
16	0.439	0.077	0.175	86.001

Tabela 4 – Rendimentos e conversões teóricas

Os resultados experimentais corroboram com os dados obtidos industrialmente, em que um alto rendimento entre etanol e substrato é obtido, muito próximo ao máximo teórico.

5 Desenvolvimento

5.1 Modelagem matemática

O desenvolvimento do modelo matemático do biorreator a ser utilizado para o estudo do processo de fermentação foi baseado em balanços de massa para os principais componentes.

Durante a produção do etanol são formados componentes intermediários. Entretanto, como são inteiramente consumidos por reações subsequentes até a formação do produto final, foram desconsiderados para os balanços de massa. Assim, a Tabela 5 apresenta os componentes para os quais estes modelos são elaborados e as respectivas siglas:

Células	X
Etanol	P
Glicose	S
Gás Carbônico	CO ₂

Tabela 5 – Siglas para componentes

Inicialmente os balanços são elaborados para um biorreator com uma corrente de entrada (Fe) e uma de saída (Fs), de modo que, através da manipulação das vazões, seja possível utilizar a modelagem para diferentes regimes de produção de etanol.

5.1.1 Balanços de massa

Abaixo são apresentados os balanços de massa global e por componente.

- Balanço de Massa Global

$$\frac{\partial m}{\partial t} = \frac{\partial V \cdot \rho}{\partial t} = F_{in}\rho - F_{out}\rho \quad (5.1)$$

- Balanço de Massa de Células

$$\frac{\partial m_x}{\partial t} = \frac{\partial V \cdot X}{\partial t} = F_{in}X_{in} - F_{out}X + \mu_x XV - \mu_d XV \quad (5.2)$$

O termo $\mu_x XV$ é referente ao crescimento celular enquanto o termo $\mu_d XV$ refere-se à morte de células.

- Balanço de Massa de Etanol

$$\frac{\partial m_p}{\partial t} = \frac{\partial V.P}{\partial t} = F_{in}P_{in} - F_{out}P + \mu_p XV - m_{P_{evap}} \quad (5.3)$$

O termo $\mu_p XV$ faz referência à produção de etanol através do processo de fermentação e o termo $m_{P_{evap}}$ representa a massa de etanol evaporada durante o processo.

- Balanço de Massa de Glicose

$$\frac{\partial m_s}{\partial t} = \frac{\partial V.S}{\partial t} = F_{in}S_{in} - F_{out}S - \mu_s XV \quad (5.4)$$

- Balanço de Massa de Gás Carbônico

$$\frac{\partial m_{CO_2}}{\partial t} = Y_{CO_2/P} \mu_P XV - m_{CO_2} \quad (5.5)$$

5.1.2 Fatores de conversão

Os fatores de conversão utilizados nos balanços de massa, apresentados anteriormente, podem ser definidos como a quantidade (em massa) produzida do componente, indicado no numerador do subscrito, em relação ao componente do denominador podendo ser esse consumido ou produzido em conjunto.

Considerou-se, conforme GIUDICI R. NASCIMENTO [1984], que parte da glicose é utilizada para o crescimento celular e parte para a produção de etanol, de modo que é possível relacionar o crescimento de células ao consumo de substrato e à produção de produto através dos índices $Y_{X/S}$ e $Y_{P/X}$.

Os fatores de conversão reais podem ser calculados através das fórmulas 5.6 para as células e 5.7 para o etanol.

$$Y_{X/S} = \frac{C_X - C_{X0}}{C_{S0} - C_S} \quad (5.6)$$

$$Y_{P/X} = \frac{C_P - C_{P0}}{C_{X0} - C_X} \quad (5.7)$$

5.1.3 Regimes de operação em biorreatores

- Batelada

Para o modelo de um reator em batelada as vazões de entrada e de saída são nulas, de modo que teremos:

$$F_{in} = F_{out} = 0 \quad (5.8)$$

- Descontínuo Alimentado

O reator operando em regime de batelada com alimentação possui vazão de saída nula e uma vazão de entrada variável, que pode ser manipulada de modo a controlar a variação de volume do tanque, apresentada na equação 5.9, considerando-se densidade constante:

$$\frac{\partial V}{\partial t} = F_{in} \quad (5.9)$$

$$F_{out} = 0 \quad (5.10)$$

- Contínuo

A operação do biorreator em regime contínuo envolve a utilização de uma corrente de entrada, que pode ser constante ou variável, e uma corrente de saída, na qual pode haver reciclo de células(5.11).

$$\frac{\partial V}{\partial t} = F_{in} - F_{out} \quad (5.11)$$

5.2 Reator isotérmico

Foi realizada a modelagem de um biorreator para o estudo da fermentação alcoólica, sendo o regime de operação considerado como batelada, ou seja, a vazão de saída e entrada serão nulas. O principal objetivo desta modelagem é estudar a cinética 2.7 e seus coeficientes, baseando-se nos resultados experimentais obtidos, de modo que o reator foi considerado isotérmico com volume constante; o líquido foi considerado uma mistura ideal e sua densidade foi constante durante toda a operação.

5.2.1 Balanços de massa

Os balanços de massa para cada um dos componentes são apresentados nas reações 5.15 a 5.18 com as devidas considerações e simplificações explicitadas:

- Balanço de Massa Global

$$\frac{\partial m}{\partial t} = \frac{\partial V \cdot \rho}{\partial t} = 0 \quad (5.12)$$

- Balanço de Massa de Células

Para o balanço de massa de células considerou-se a seguinte equação:

$$\frac{\partial m_x}{\partial t} = \frac{\partial V.X}{\partial t} = \mu_x X V = r_x V \quad (5.13)$$

Com r_x sendo:

$$r_x = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \exp(-K_i S) \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)^m \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)^n X \quad (5.14)$$

Em que μ_{max} (1/h) é a máxima taxa específica de crescimento celular, K_i é o parâmetro de inibição de substrato, X_{max} (kg/m³) é a concentração de biomassa quando a concentração celular cessa, P_{max} (kg/m³) é a concentração de produto no momento em que o crescimento celular cessa e m e n são parâmetros utilizados para descrever as inibições celulares e de produtos, respectivamente (Rivera et al. [2006]).

Portanto, o balanço de células pode ser escrito como:

$$\frac{\partial X}{\partial t} = r_x \quad (5.15)$$

- Balanço de Massa de Etanol

Considerou-se que o efeito da evaporação é desprezível e, desta forma, o balance para o etanol pode ser expresso como:

$$\frac{\partial m_p}{\partial t} = \frac{\partial V.P}{\partial t} = \mu_p X V = r_p V \quad (5.16)$$

Com r_p sendo expresso de acordo com a expressão de Luedeking e Piret [1959b]:

$$r_p = Y_{p/x} r_x + m_p X \quad (5.17)$$

Em que $Y_{p/x}$ (kg/kg) é o rendimento de etanol associado ao crescimento celular e m_p (kg/[kg.h]) é a produção de etanol associada a quantidade de células (Rivera et al. [2006]).

Portanto:

$$\frac{\partial P}{\partial t} = r_p \quad (5.18)$$

- Balanço de Massa de Glicose

Para o balanço de massa de glicose da fonte de carbono, sendo expressa por gramas de açúcares redutores totais (ART), obteve-se:

$$\frac{\partial m_s}{\partial t} = \frac{\partial V.S}{\partial t} = -\mu_s X V = -r_s V \quad (5.19)$$

Com r_s , de acordo com Luedeking e Piret [1959b]:

$$r_s = \frac{r_x}{Y_{x/s}} + m_x X \quad (5.20)$$

Em que $Y_{x/s}$ e m_x representam o limite de rendimento celular (kg/kg), que expressa quanto de substrato está direcionado ao crescimento celular, e o parâmetro de manutenção (kg/[kg h]), respectivamente (Rivera et al. [2006]).

Sendo assim, tem-se:

$$\frac{\partial S}{\partial t} = -r_s \quad (5.21)$$

5.2.2 Determinação dos parâmetros cinéticos

De acordo com as equações 5.15, 5.18 e 5.21, tem-se que é necessário estimar 11 parâmetros, sendo 5 deles modelados como dependentes das variáveis temperatura, concentração de substrato inicial e concentração celular inicial: μ_{max} , X_{max} , P_{max} , $Y_{x/s}$ e $Y_{p/x}$ de acordo com a modelagem proposta por Andrade et al. [2007] para a dependência desses parâmetros com a temperatura. Por esse motivo, obteve-se experimentalmente a cinética de S, P e X para diversas condições experimentais, com o intuito de obter o perfil dos parâmetros em relação à temperatura, concentração de substrato e concentração de células.

5.2.2.1 Estimativa dos Parâmetros

Para a estimativa dos parâmetros associados às variáveis estudadas, adotou-se 6 parâmetros fixos, os valores foram adaptados de [RIVERA et al., 2006], e são expressos na tabela abaixo:

Parâmetros fixos	Valores
Ks	3,1
Ki	0,003
m	1
n	1,5
mp	0,05
mx	0,15

Tabela 6 – Parâmetros fixos

Com isso, os 5 parâmetros dependentes da temperatura, μ_{max} , X_{max} , P_{max} , $Y_{x/s}$ e $Y_{p/x}$, foram estimados utilizando o MATLAB® (A.0.3) e com a função ode45 MATLAB®, que resolve problemas de equações diferenciais pelo método de Runge-Kutta de 4ª ordem (Duraishi [2009]) com aproximação de 5ª ordem, e a função de estimação lsqcurvefit, com objetivo de ajustar a curva do modelo com a curva experimental, utilizando o método dos mínimos quadrados (MATLAB [2020]) e o método de Newton “trust-region reflective” para minimização da equação 5.22:

$$E(\theta) = \sum_{n=1}^{np} \left[\frac{(X_n - X_{en})^2}{X_{e_{max}}^2} + \frac{(S_n - S_{en})^2}{S_{e_{max}}^2} + \frac{(P_n - P_{en})^2}{P_{e_{max}}^2} \right] = \sum_{n=1}^{np} \epsilon_n(\theta) \quad (5.22)$$

5.2.2.2 Resultados

Os resultados obtidos na otimização dos parâmetros foram compilados na Tabela 7 abaixo:

Ensaio	umax	Xmax	Pmáx	Ypx	Yx	T (°C)
1	0,479573929	73,5	90	5,73151275	0,080148185	34
2	0,130143685	139,5007784	100,0089389	8,013382442	0,054399442	28
3	0,017461945	138,5194396	101,3526	48,53	0,012	28
4	0,045950939	87,59051114	90	27	0,019291587	34
5	0,118037234	128,9730332	102,904815	9,607837732	0,048075481	34
6	0,047050488	120	70,536	28,5	0,017231389	34
7	0,344178685	140	60	5,104379323	0,081991459	28
8	0,095068465	105	79,10821	18,445105	0,028101	28
9	0,441278455	140,0000783	80	2,5	0,157759198	31
10	0,298191832	130	110	4,5	0,1	31
11	0,1	139,9996394	112,9965419	7,960855282	0,055428948	31
12	0,144074537	140	113,1006156	5,905239069	0,1	31
13	0,31	140,0997481	105	3,438180054	0,122	31
14	0,31	140,0997481	105	3,438180054	0,122	31
15	0,295	140,0951546	105	3,682092003	0,12	31
16	0,31	140,0997481	105	3,438180054	0,122	31

Tabela 7 – Resumo dos parâmetros otimizados em relação à temperatura

Os valores obtidos de Y_x e Y_{px} foram semelhantes aos obtidos experimentalmente. Porém, X_{max} e P_{max} foram significativamente maiores aos valores encontrados na literatura, uma vez que não foi possível ajustar matematicamente o modelo utilizado de forma que o resíduo seja mínimo e que a curva do modelo se ajuste com a curva experimental. Por esse motivo, obteve-se a equação de regressão apenas dos 3 parâmetros com auxílio do Minitab®: μ_{max} , Y_x e Y_{px} . As equações de regressão 5.23, 5.24 e 5.25 dispostas abaixo possuem r^2 de 0.9641, 0.8968 e 0.9610, respectivamente. Nelas é possível verificar a relação destes parâmetros com as condições experimentais iniciais não codificadas, de acordo com o design Box-Benkhen.

$$\begin{aligned} \mu_{max} = & -6,56 + 0,624T - 0,00421So - 0,1625Xo - 0,01290T^2 - 0,000055So^2 \\ & + 0,000318Xo^2 + 0,000343T * So + 0,004493T * Xo + 0,000071So * Xo \end{aligned} \quad (5.23)$$

$$\begin{aligned} Y_{px} = & 1374 - 97,9T - 3,30So + 14,04Xo + 1,694T^2 + 0,00674So^2 - 0,0537Xo^2 \\ & + 0,0811T * So - 0,331T * Xo - 0,00380So * Xo \end{aligned} \quad (5.24)$$

$$\begin{aligned} Y_x = & -6,558 + 0,4542T + 0,00348So - 0,02714Xo - 0,007805T^2 - 0,000017So^2 \\ & + 0,000020Xo^2 - 0,000034T * So + 0,000870T * Xo + 0,000001So * Xo \end{aligned} \quad (5.25)$$

Dessa forma, é possível comparar os resultados experimentais com os valores fornecidos pelo modelo em relação ao tempo de cada ensaio. As comparações são apresentadas nas figuras 6

a 21, onde é possível observar o ajuste satisfatório do modelo aos dados experimentais em todos os casos, incluindo aqueles que não apresentaram crescimento celular, normalmente comum em modelos cuja concentração celular é mais baixa. Portanto, não há competição por nutrientes.

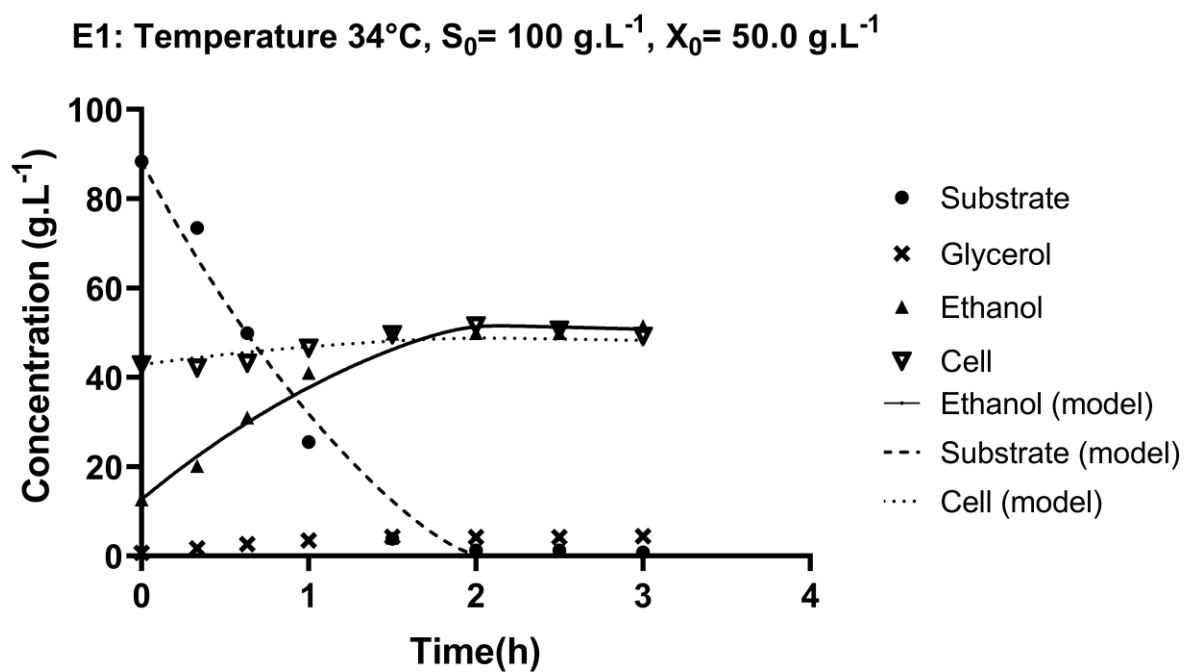


Figura 6 – Ensaio 1

Fonte: Autor

E2: Temperature 28°C, $S_0= 100 \text{ g.L}^{-1}$, $X_0= 37.5 \text{ g.L}^{-1}$

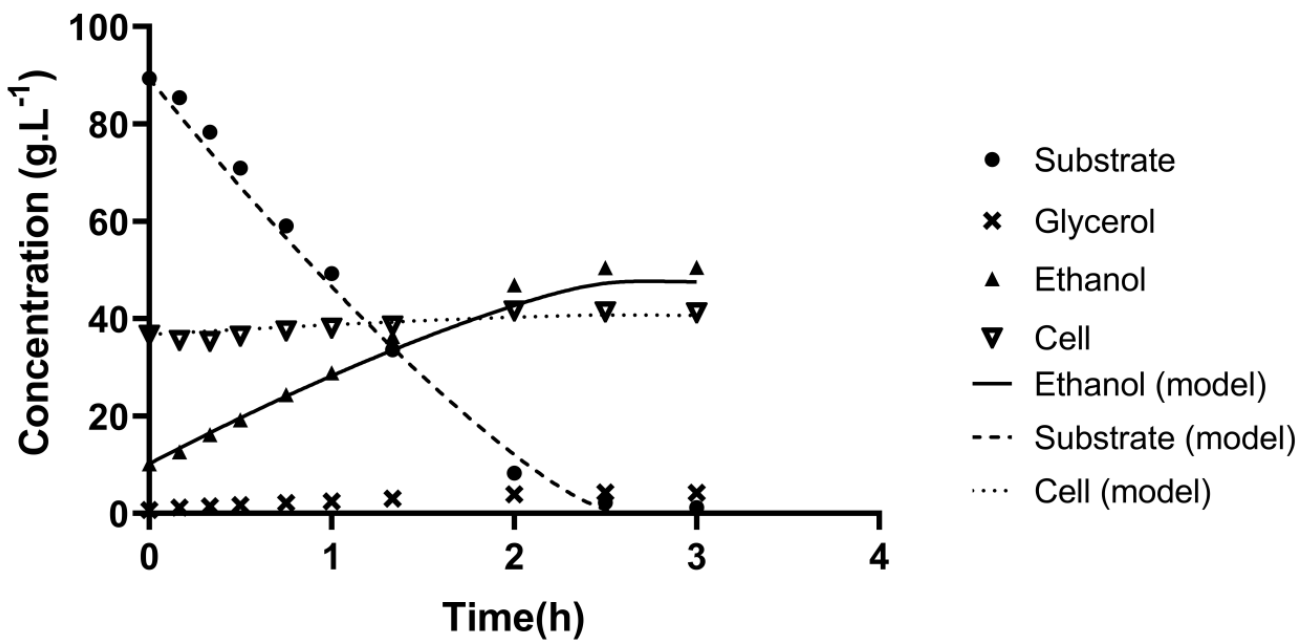


Figura 7 – Ensaio 2
Fonte: Autor

E3: Temperature 28°C, $S_0= 20 \text{ g.L}^{-1}$, $X_0= 37.5 \text{ g.L}^{-1}$

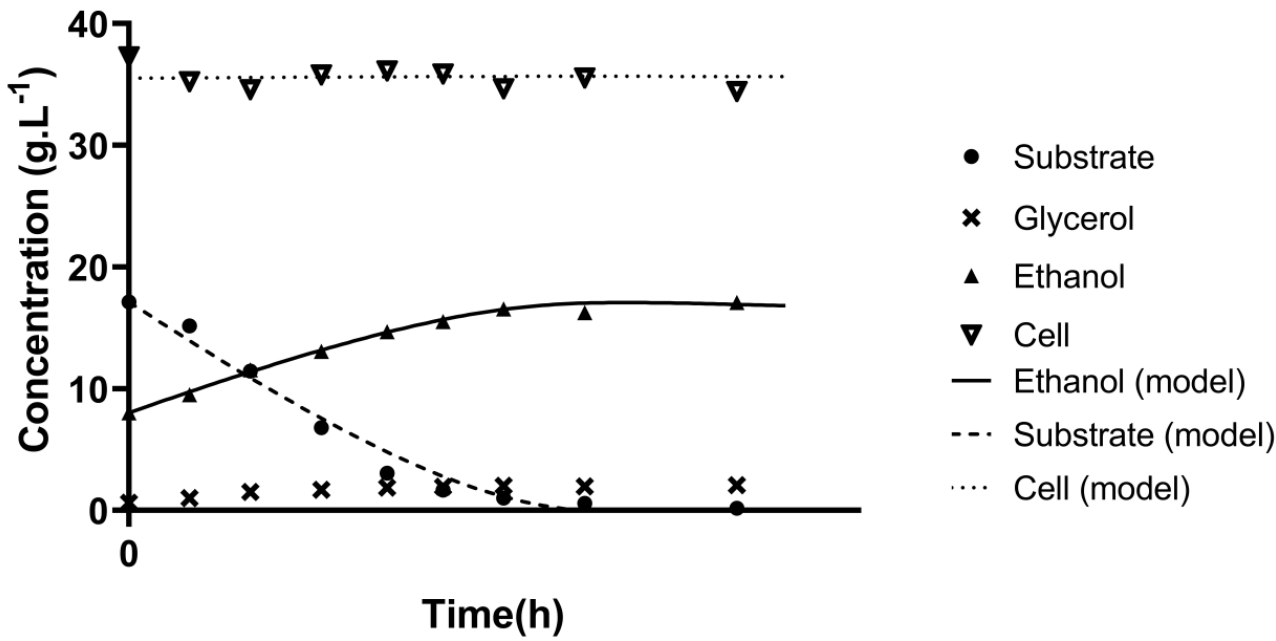


Figura 8 – Ensaio 3
Fonte: Autor

E4: Temperature 34°C, $S_0 = 20 \text{ g.L}^{-1}$, $X_0 = 37.5 \text{ g.L}^{-1}$

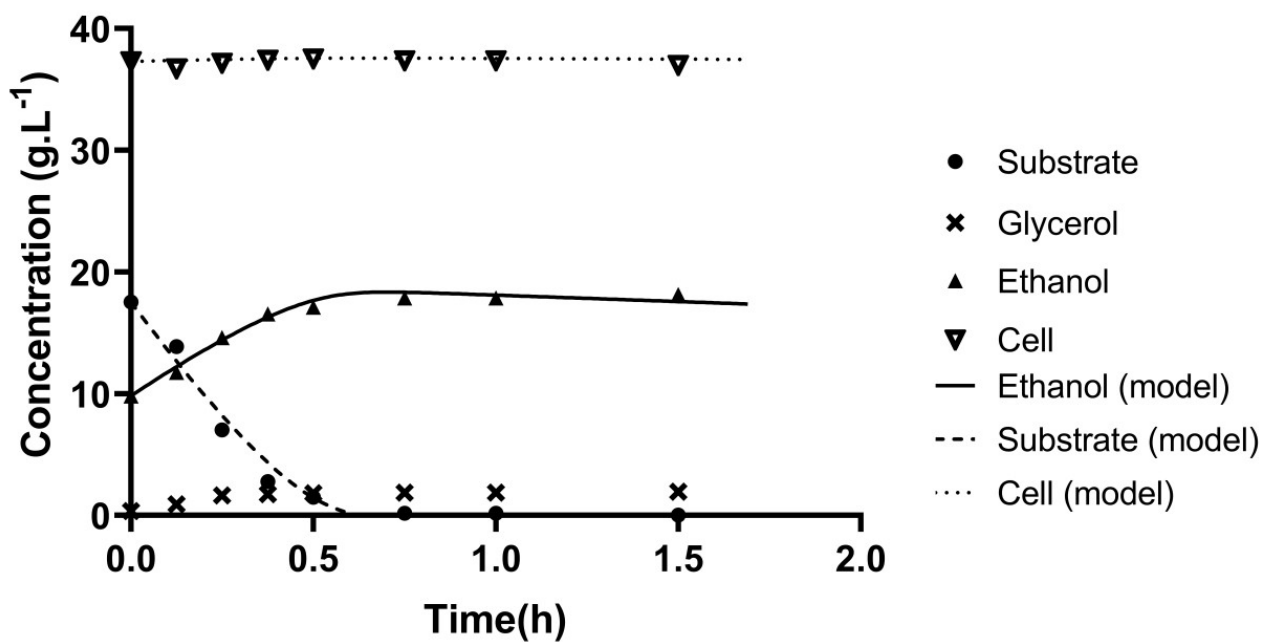


Figura 9 – Ensaio 4

Fonte: Autor

E5: Temperature 34°C, $S_0 = 60 \text{ g.L}^{-1}$, $X_0 = 37.5 \text{ g.L}^{-1}$

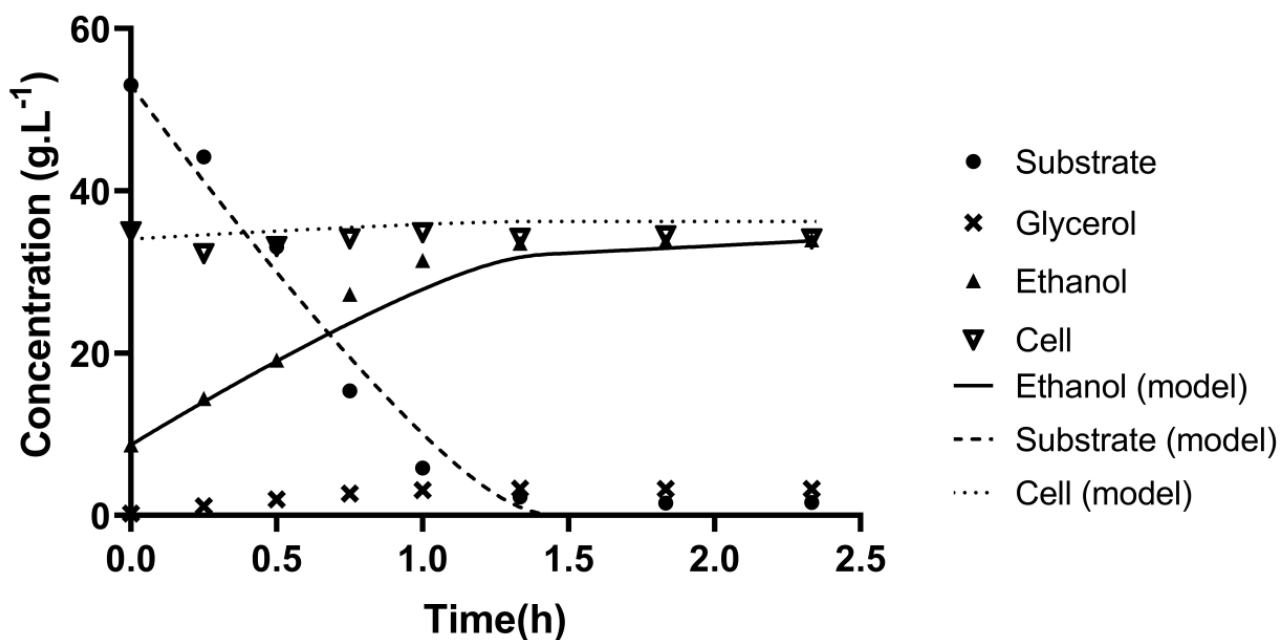


Figura 10 – Ensaio 5

Fonte: Autor

E6: Temperature 34°C, $S_0 = 60 \text{ g.L}^{-1}$, $X_0 = 25.0 \text{ g.L}^{-1}$

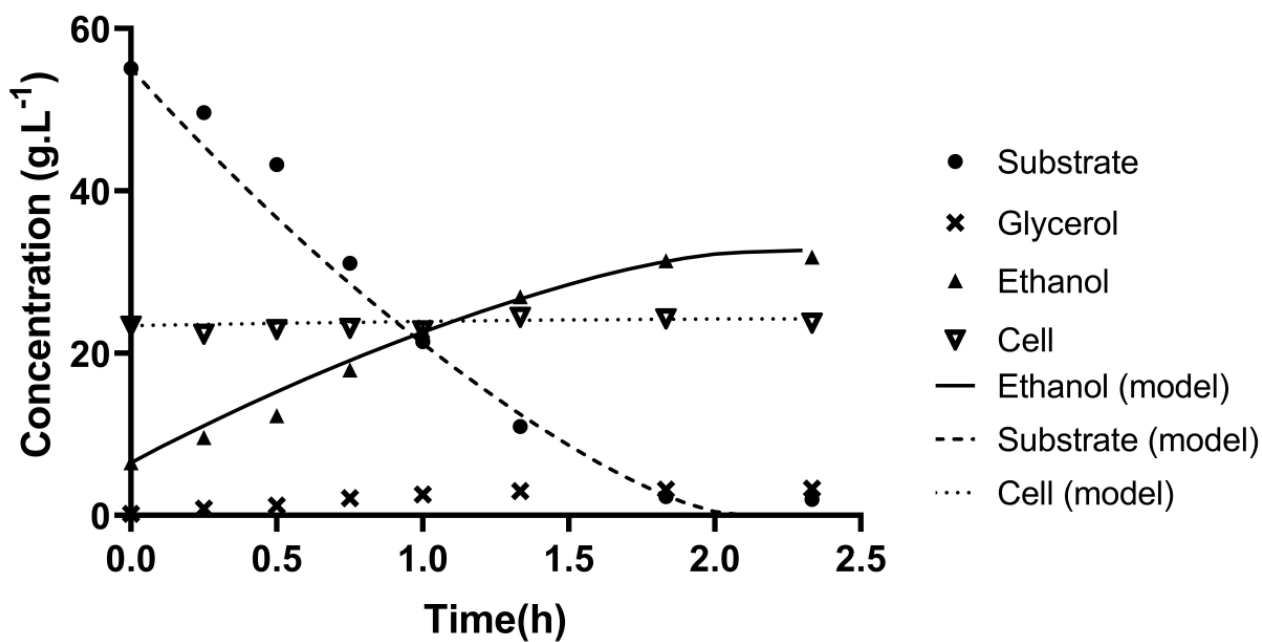


Figura 11 – Ensaio 6

Fonte: Autor

E7: Temperature 28°C, $S_0 = 60 \text{ g.L}^{-1}$, $X_0 = 25.0 \text{ g.L}^{-1}$

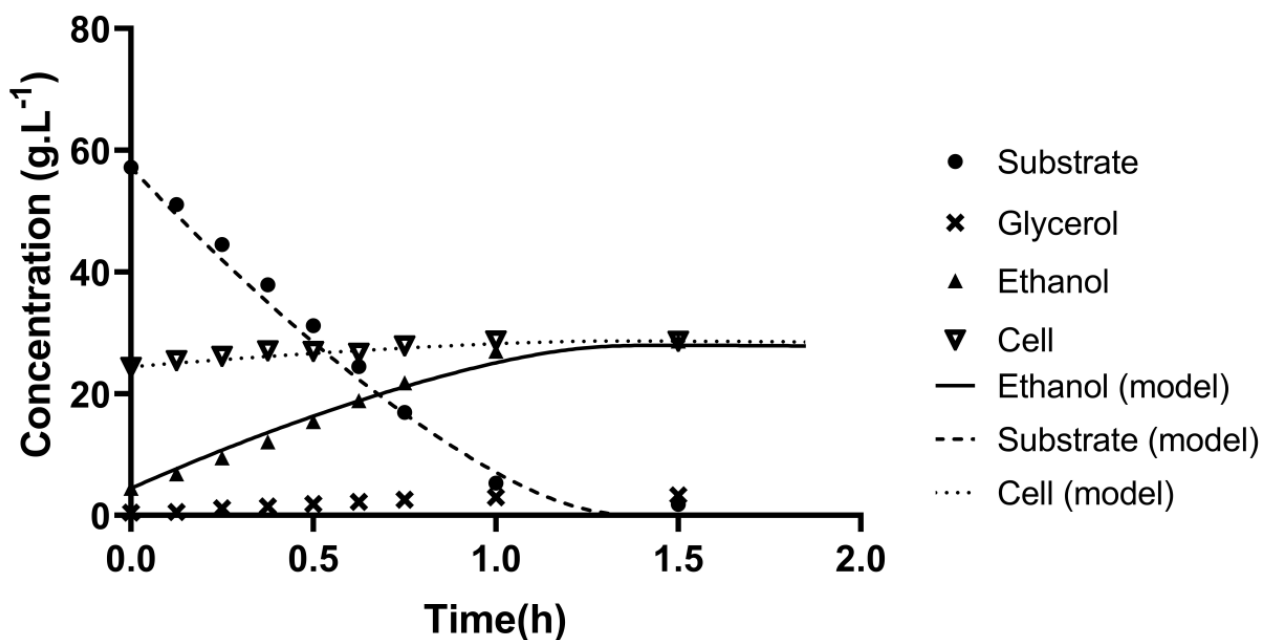


Figura 12 – Ensaio 7

Fonte: Autor

E8: Temperature 28°C, $S_0 = 60 \text{ g.L}^{-1}$, $X_0 = 50.0 \text{ g.L}^{-1}$

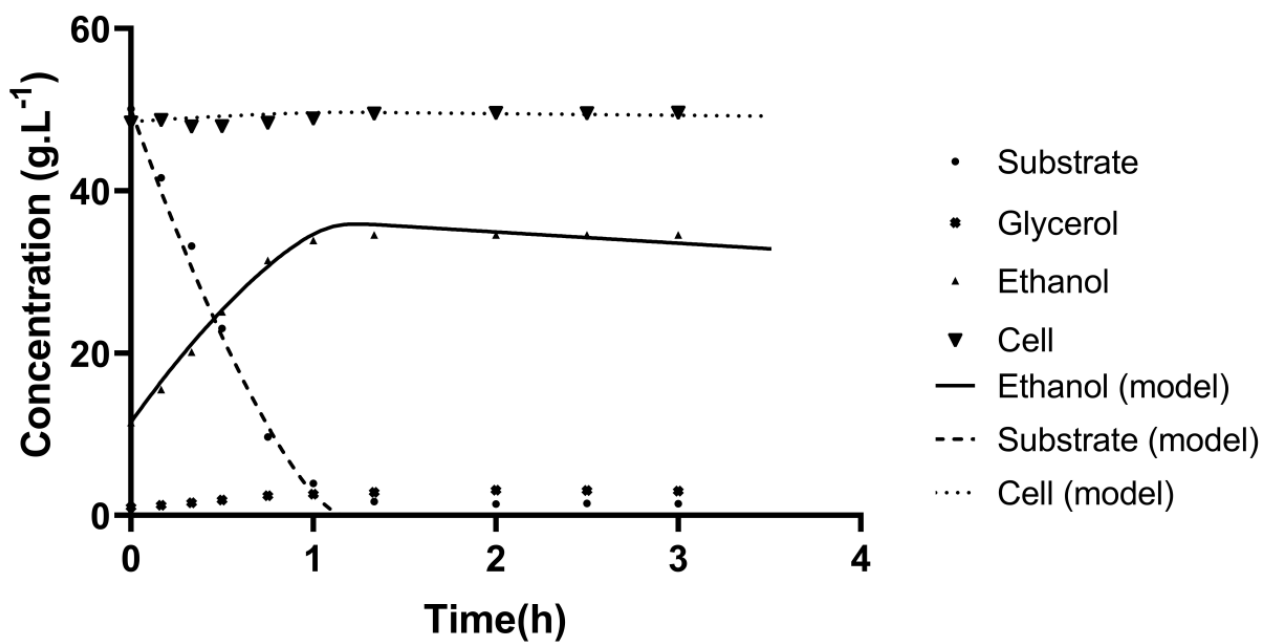


Figura 13 – Ensaio 8

Fonte: Autor

E9: Temperature 31°C, $S_0 = 100 \text{ g.L}^{-1}$, $X_0 = 50.0 \text{ g.L}^{-1}$

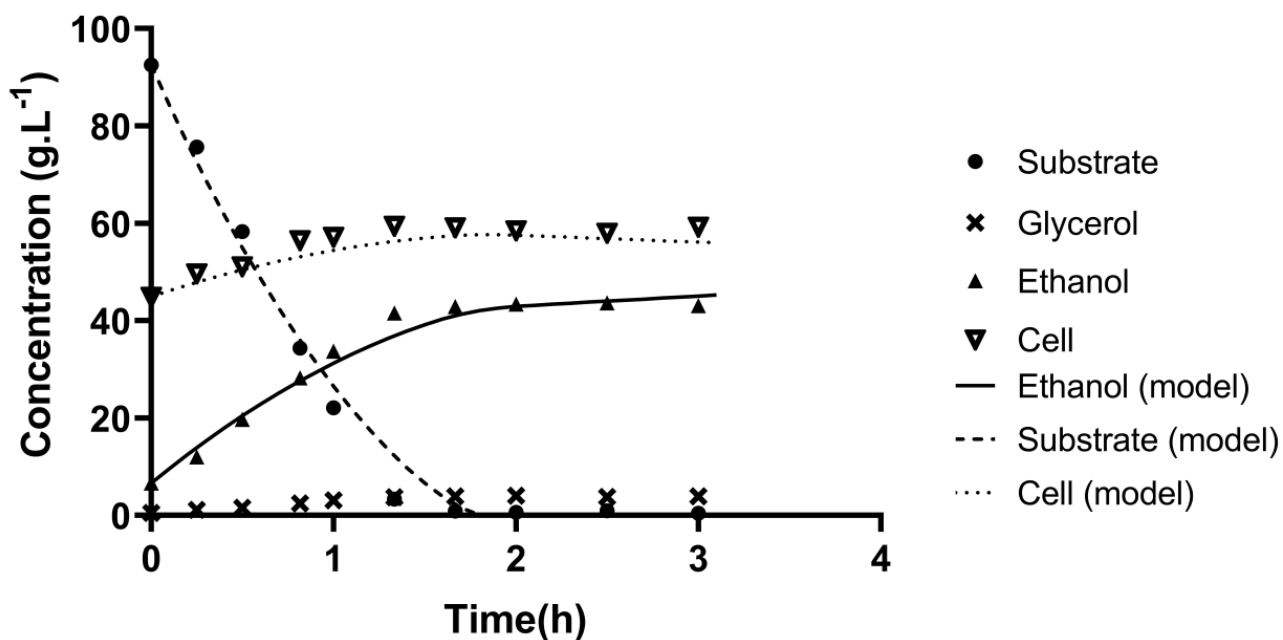


Figura 14 – Ensaio 9

Fonte: Autor

E10: Temperature 31°C, $S_0 = 100 \text{ g.L}^{-1}$, $X_0 = 25.0 \text{ g.L}^{-1}$

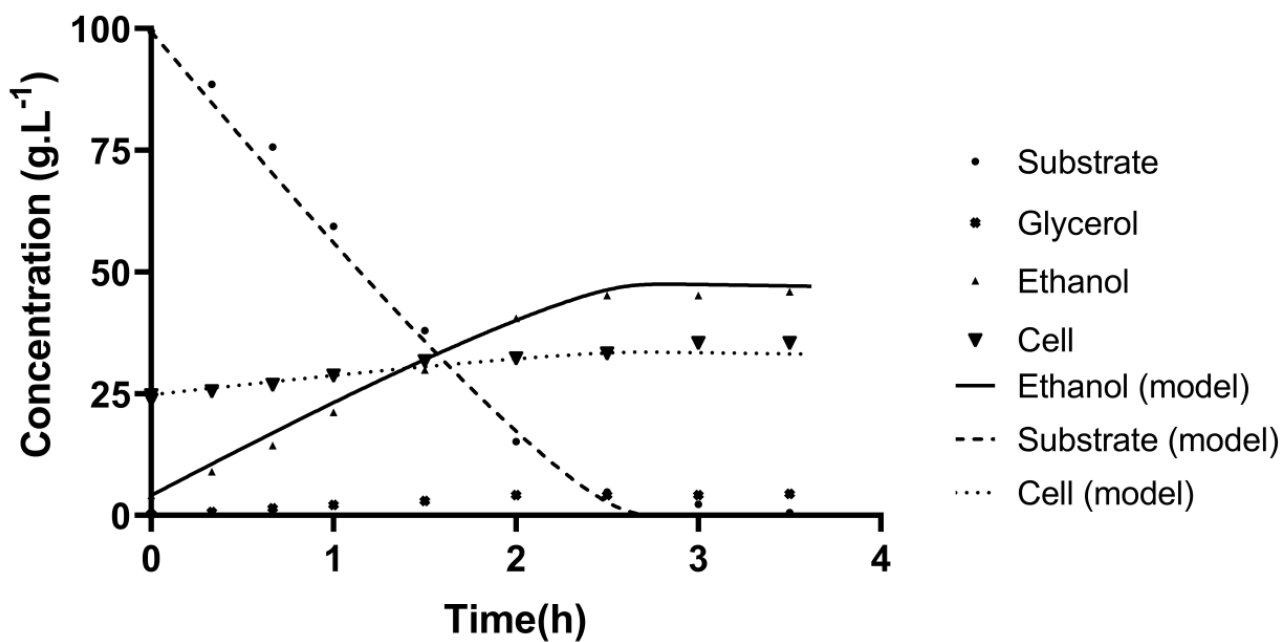


Figura 15 – Ensaio 10

Fonte: Autor

E11: Temperature 31°C, $S_0 = 20 \text{ g.L}^{-1}$, $X_0 = 25.0 \text{ g.L}^{-1}$

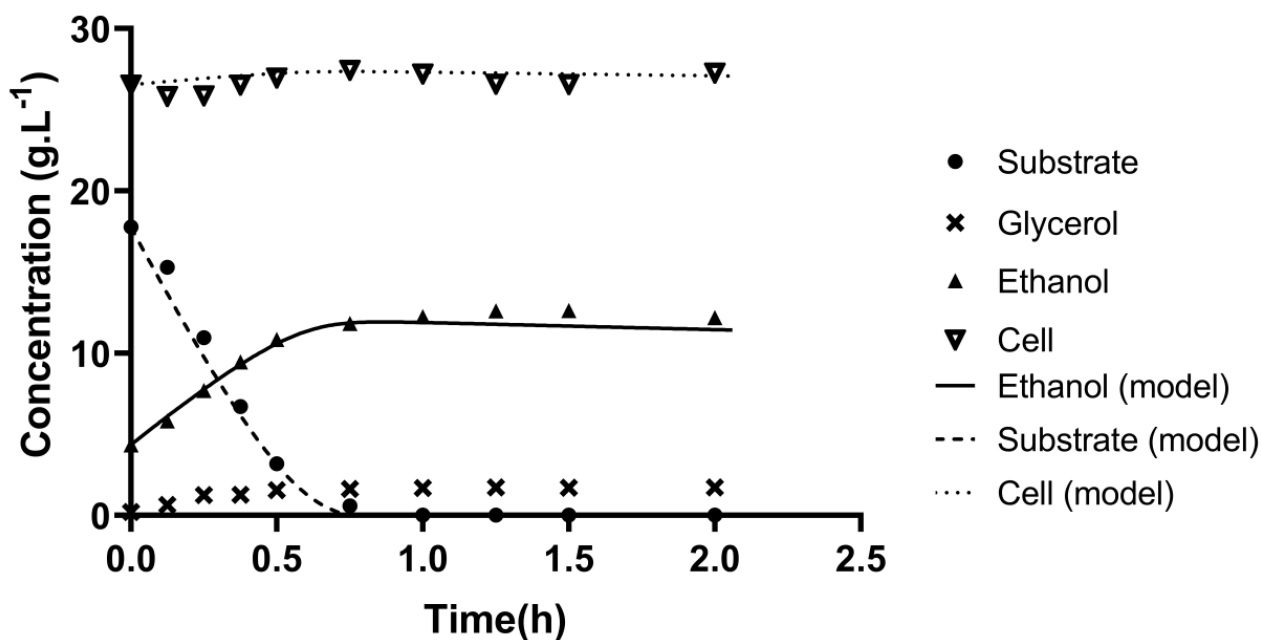


Figura 16 – Ensaio 11

Fonte: Autor

E12: Temperature 31°C, $S_0 = 20 \text{ g.L}^{-1}$, $X_0 = 50.0 \text{ g.L}^{-1}$

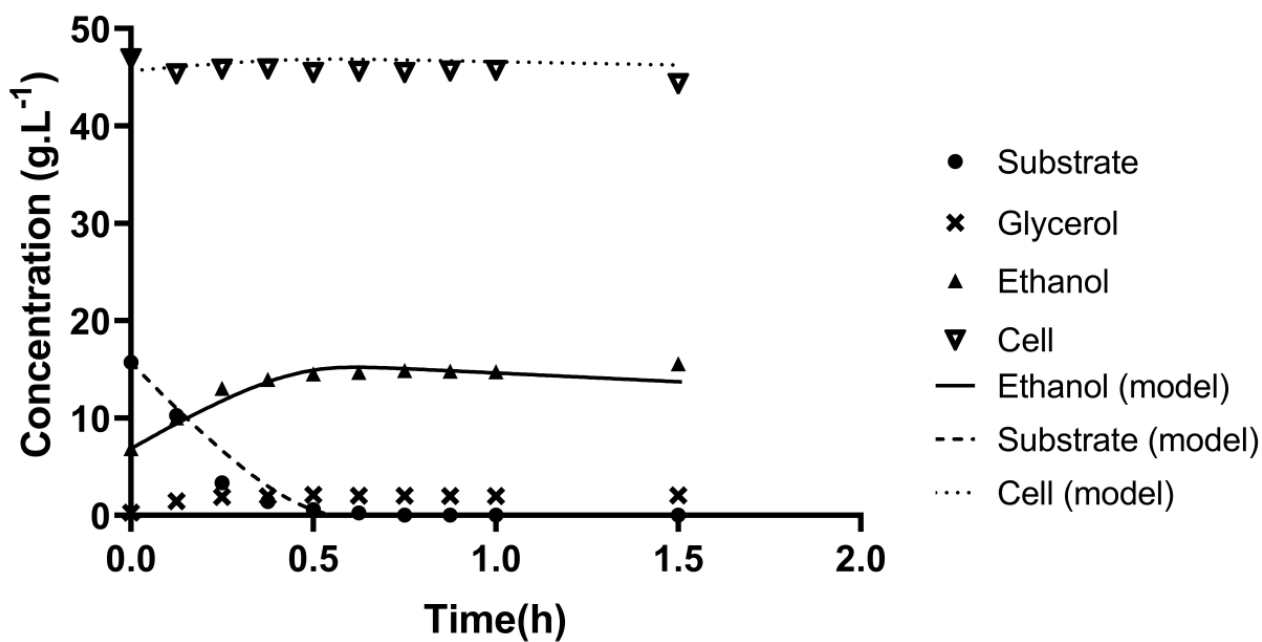


Figura 17 – Ensaio 12

Fonte: Autor

E13: Temperature 31°C, $S_0 = 60 \text{ g.L}^{-1}$, $X_0 = 37.5 \text{ g.L}^{-1}$

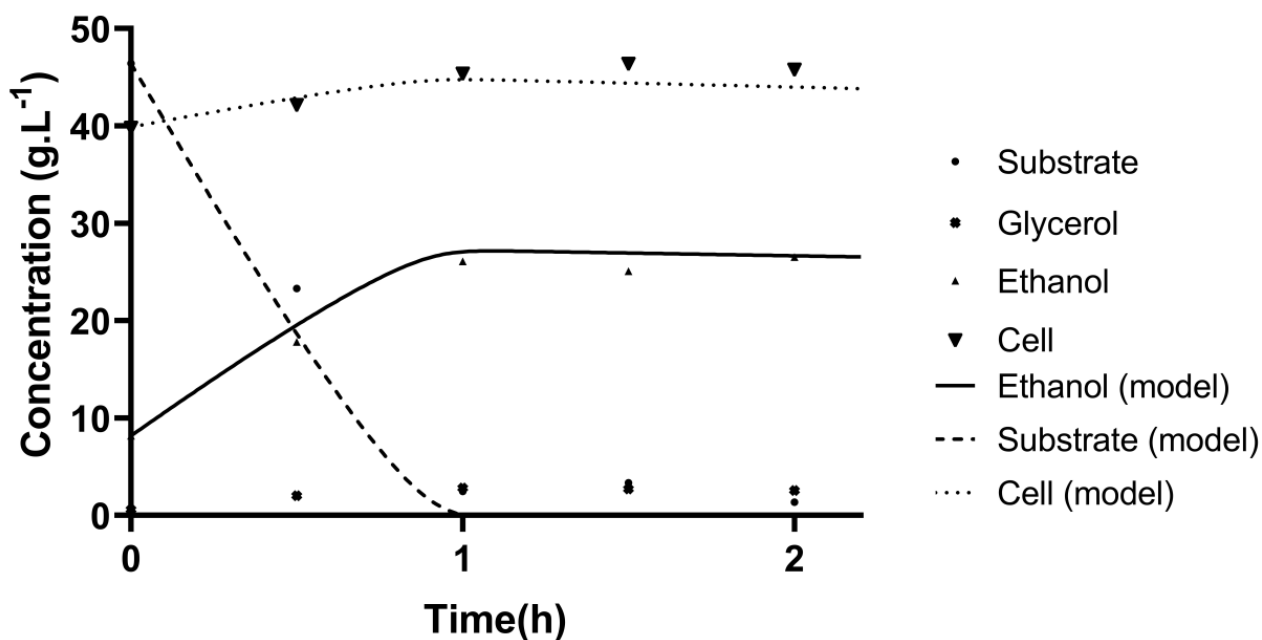


Figura 18 – Ensaio 13

Fonte: Autor

E14: Temperature 31°C, $S_0 = 60 \text{ g.L}^{-1}$, $X_0 = 37.5 \text{ g.L}^{-1}$

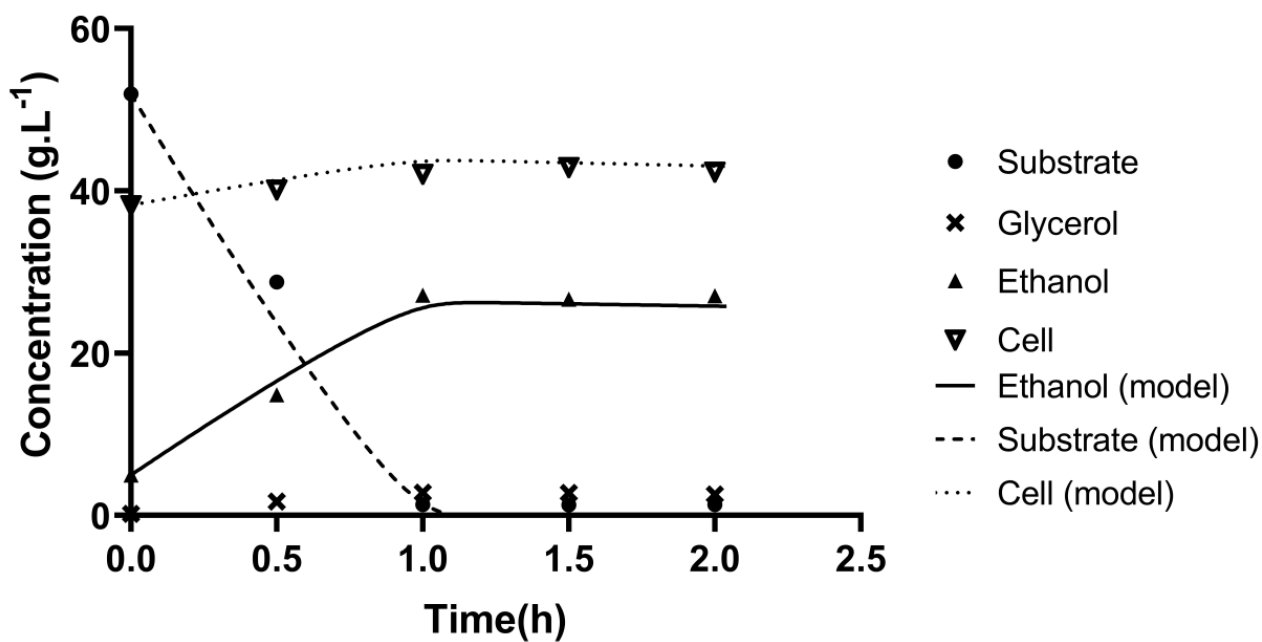


Figura 19 – Ensaio 14

Fonte: Autor

E15: Temperature 31°C, $S_0 = 60 \text{ g.L}^{-1}$, $X_0 = 37.5 \text{ g.L}^{-1}$

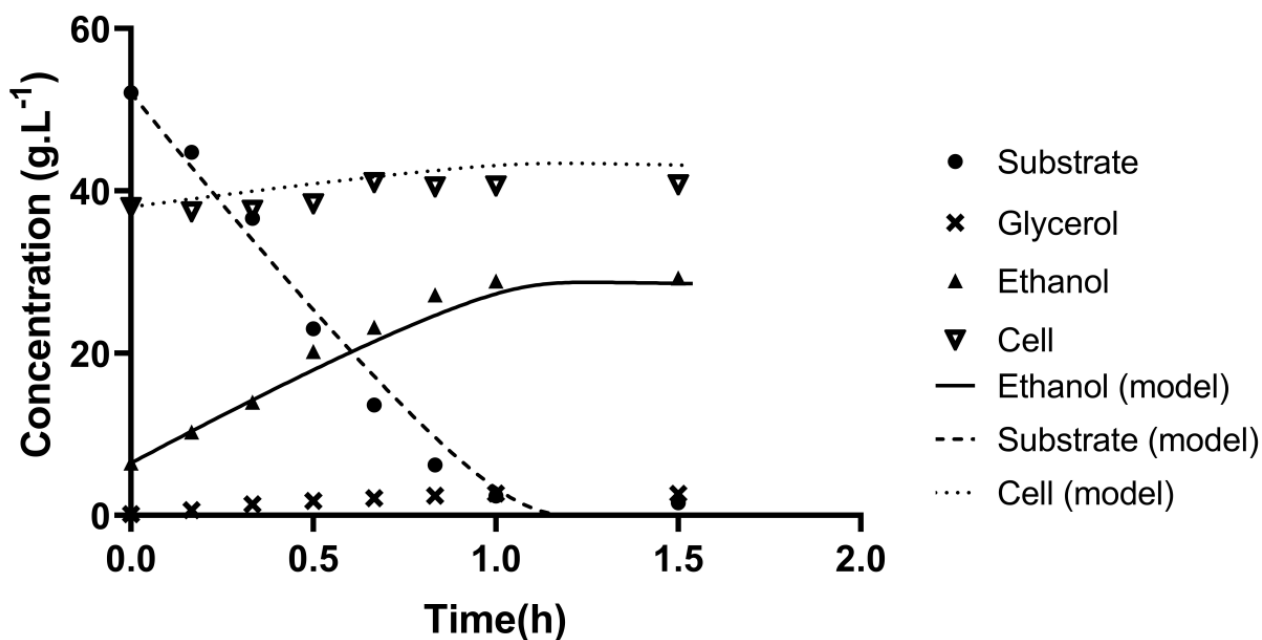


Figura 20 – Ensaio 15

Fonte: Autor

E16: Temperature 31°C, $S_0 = 60 \text{ g.L}^{-1}$, $X_0 = 37.5 \text{ g.L}^{-1}$

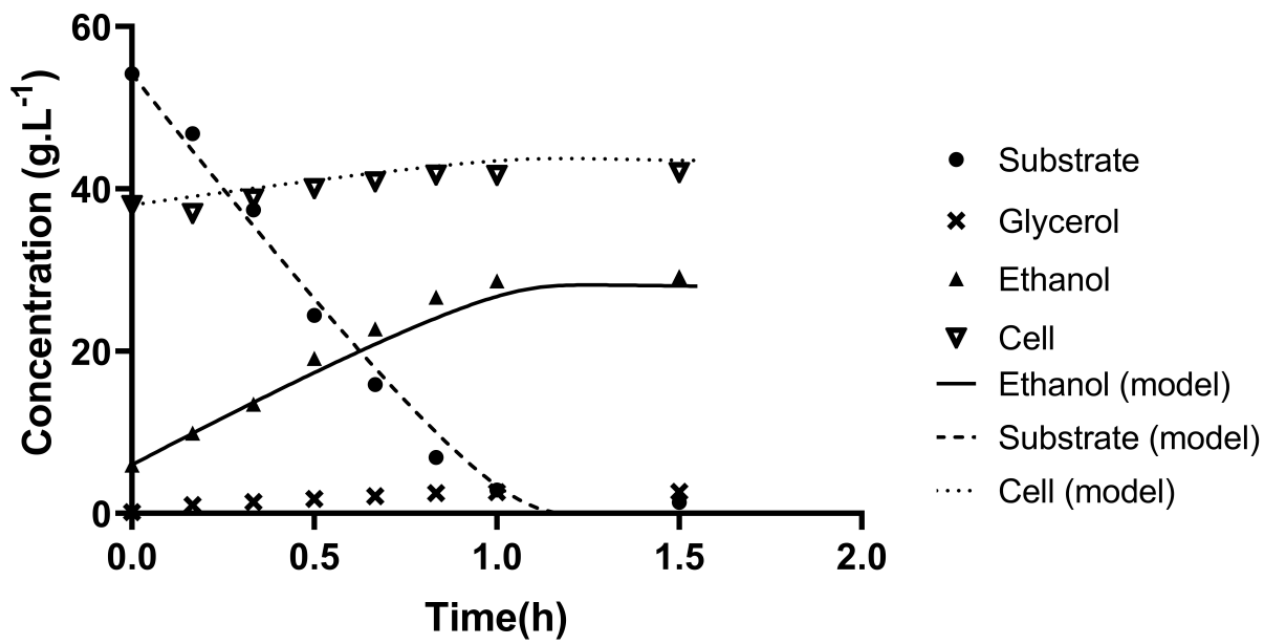


Figura 21 – Ensaio 16

Fonte: Autor

6 Conclusão

Visando o desenvolvimento de um modelo matemático do processo de fermentação alcoólica em batelada, iniciou-se com a modelagem de um biorreator isotérmico em batelada. Após o processo inicial de elaboração do modelo, foram realizados 16 ensaios de fermentação, seguido do design experimental de Box-Benkhen, nos quais 3 fatores (temperatura, concentração inicial de células e concentração de substrato) foram estudados em 3 níveis.

Com a obtenção dos resultados experimentais similares aos encontrados em indústrias (alto rendimento entre etanol e substrato), foi possível modelar matematicamente a cinética de crescimento baseada em 11 parâmetros: Y_x , Y_{px} , P_{max} , X_{max} , μ_{max} , K_s , K_i , m , n , m_p e m_x . Sendo que 6 parâmetros foram fixados previamente e 5 variam com a temperatura: Y_x , Y_{px} , P_{max} , X_{max} , μ_{max} . Utilizando-se do MATLAB®, estruturou-se um código que minimiza a função objetivo (Equação 5.22), através das funções ode45 e lsqcurvefit, otimizando e encontrando a regressão de cada parâmetro baseado na temperatura utilizando o Minitab®.

Com a otimização dos parâmetros, conclui-se que não foi possível encontrar as equações de regressão para X_{max} e P_{max} , uma vez que os valores obtidos se encontravam maiores que os esperados teoricamente. Contudo, obteve-se para Y_x , Y_{px} e μ_{max} , boas representações matemáticas; r_2 de 0.8968, 0.9641 e 0.9610, respectivamente.

Além disso, como os parâmetros obtidos foram adequados, os próximos passos incluirão a modelagem dos rendimentos utilizando-se de um modelo de segunda ordem em função das variáveis estudadas (X, S e P).

7 Cronograma Final

O cronograma final foi realizado utilizando o *software* Microsoft® Excel® 2016, principalmente pela facilidade de visualização, edição e controle de atividades e etapas a serem realizadas no projeto. O cronograma construído abaixo (Figura 22) se baseia tanto na primeira parte do projeto, que consistiu em modelar um biorreator em batelada alimentada isotérmico e não isotérmico, quanto na segunda parte do projeto, em que houve a alteração do escopo do projeto, alterando a cinética e a tipo de modelagem do biorreator para batelada.

Atividade	out/19	nov/19	dez/19	jan/20	fev/20	mar/20	abr/20
Definição do Tema							
Estudo da literatura base	X	X	X				
Pitch de apresentação		X					
Envio da proposta inicial	X						
Modelagem Matemática							
Primeira modelagem (biorreator isotérmico)			X	X			
Segunda modelagem (biorreator não isotérmico)			X	X	X		
Modelagem Matemática no Matlab do biorreator em batelada utilizando a cinética final				X	X	X	X
Modelagem Matemática no Excel do biorreator em batelada utilizando a cinética final				X	X	X	X
Modelagem Estatística dos parâmetros utilizando o Minitab							X
Experimentos							
Realização dos 16 ensaios				X	X	X	
Relatório Parcial	X	X	X				
Relatório Final					X	X	X

Figura 22 – cronograma Final

Fonte: Autor

APÊNDICE A – Código do MATLAB

A.0.1 Código base

```

clc
clear all
close all

global k Ymod
T = 307 ;%K
%dados experimentais
t = [0, 7.5/60, 15/60, 22.5/60, 30/60, 37.5/60, 45/60, 52.5/60,
     60/60, 90/60];
sexp = [15.72602103, 10.26100789, 3.339465381, 1.41, 0.59, 0.25, 0,
        0, 0, 0];
xexp = [46.96666667, 45.39913619, 45.86673015, 45.90672522,
        45.5454433, 45.64895737, 45.53900928, 45.68574841, 45.75911797,
        44.38955275];
pexp = [6.83, 10, 13.03, 13.95, 14.52, 14.67, 14.87, 14.79, 14.75,
        15.55];
Y = [xexp;pexp;sexp].';
k0 = [0.01, 140, 100, 0.01, 5];
% [umax, Xmax, Pmax, Yx, Ypx]
A = [];
b = [];
Aeq = [];
beq = [];
lb = [0, 0, 0, 0, 0];
ub = [0.15, 150, 115, 0.1, 6];
[k, resnorm, residual, exitflag, output, lambda, jacobian] =
    lsqcurvefit(@function_otimizacao,k0, t, Y, lb, ub);
%maximas dos vetores experimentais
maxsexp = max(sexp);
maxxexp = max(xexp);
maxpexp = max(pexp);
%X P S
%ultimos valores dos resduos, que representam o mnimo encontrado
residualx= sum((residual(:,1).^2)./maxxexp^2);
residualp= sum((residual(:,2).^2)./maxpexp^2);

```

```

residuals= sum((residual(:,3).^2)./maxsemp^2);

%resduo
residual_final = residualx + residualp + residuals

figure
plot(t, Ymod(:,1), 'g-',t, Ymod(:,2), 'b-',t, Ymod(:,3), 'r-',t,
      Y(:,1), 'g*',t, Y(:,2), 'b*',t, Y(:,3), 'r*');
title('Gráfico de otimização')
legend(' [P]', ' [X]', ' [S]')
xlabel('Tempo')
ylabel('Concentração')

```

A.0.2 Função ode45

```

function Ymod = function_otimizacao(beta, t)
global k Ymod
k = beta;

%dados experimentais
t = [0, 7.5/60, 15/60, 22.5/60, 30/60, 37.5/60, 45/60, 52.5/60,
      60/60, 90/60];

semp = [15.72602103, 10.26100789, 3.339465381, 1.41, 0.59, 0.25, 0,
        0, 0, 0];

xemp = [46.96666667, 45.39913619, 45.86673015, 45.90672522,
        45.5454433, 45.64895737, 45.53900928, 45.68574841, 45.75911797,
        44.38955275];

pemp = [6.83, 10, 13.03, 13.95, 14.52, 14.67, 14.87, 14.79, 14.75,
        15.55];
Y = [xemp;pemp;semp].';

% Solução do sistema de EDO's
A0 = [xemp(1) pemp(1) semp(1)];
[t,Ymod] = ode45(@(t, A)functionhandle_otimizacao(t,A, k),t,A0);
display(Ymod)
end

```

A.0.3 Função de Modelagem

```
function dAdt = functionhandle_otimizacao(t,A, k)
Ks = 3.1;
Ki = 0.003;
mp = 0.05;
mx = 0.15;
n= 1.5;
m = 1;
% Funcao modelo
dAdt = zeros(3,1);
dAdt(1) = (((k(1)*A(3))/(Ks +
    A(3)))*exp(-Ki*A(3))*((1-A(1)/k(2))^m)*((1-A(2)/k(3))^n) * A(1));
dAdt(2) = k(5) * (((k(1)*A(3))/(Ks +
    A(3)))*exp(-Ki*A(3))*((1-A(1)/k(2))^m)*((1-A(2)/k(3))^n) * A(1))
    + mp * A(1);
dAdt(3) = -(((k(1)*A(3))/(Ks +
    A(3)))*exp(-Ki*A(3))*((1-A(1)/k(2))^m)*((1-A(2)/k(3))^n) *
    A(1))/k(4) + mx * A(1));
end
```

Referências

AMORIM, H. V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Springer Verlag, v. 91, n. 5, p. 1267–1275, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-011-3437-6>>.

AMORIM, H. V. de; LOPES, M. L. Ethanol production in a petroleum dependent world: the brazilian experience. *Sugar Journal*, Kriedt Enterprises Ltd, v. 67, n. 12, p. 11–14, 2005. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20053116848>>.

ANDRADE, R. R. de et al. Estimation of temperature dependent parameters of a batch alcoholic fermentation process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Springer Science and Business Media LLC, v. 137–140, n. 1–12, p. 753–763, abr. 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12010-007-9095-6>>.

ANP. *Anuário Estatístico*. 2019. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/publicacoes/anuario-estatistico/5237-anuario-estatistico-2019>>.

BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in brazil. *FEMS Yeast Research*, FEMS (Federation of European Microbiological Societies), v. 8, n. 7, p. 1155–1163, out. 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00428.x>>.

BASTOS, R. G. *Tecnologia das fermentações fundamentos de bioprocessos*. 2010.

BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In: *Biotecnologia Industrial Volume 2*. [S.l.: s.n.], 2001. cap. 7.

BRAY, S. C.; FERREIRA, E. R.; RUAS, D. G. G. *As Políticas da Agroindústria Canavieira e o Proálcool no Brasil*. Unesp Marília Publicações, 2000. 5–71 p. Disponível em: <https://59eb71b7-a-62cb3a1a-s-sites.googlegroups.com/site/neaunesp/publicaes/as_politicas_da_agroindustrialivro.pdf?attachauth=ANoY7cryhh4g3yFtb_kvdlPN_jjEPcRLovefry_9eJWNKXDcXTIBylFtEWSK3Nj0JBIZEcgf1ccdYJMzoCQx53h39JfBLwFZQdF9zqDml_BBKHUhVLrs3o5zsFn-ZgiIdUkgBlqckZ13c2-LnwGoLtJldRm3abFwD5OZSI70S8MXpnFtwCzp8GDhme1KgCitGw8&attredirects=1>.

CARDONA, C.; SANCHEZ, O.; GUTIERREZ, L. *Process Synthesis for Fuel Ethanol Production*. CRC Press, 2009. 155–197 p. Disponível em: <<https://doi.org/10.1201/9781439815984>>.

COLA, P. et al. Differential effects of major inhibitory compounds from sugarcane-based lignocellulosic hydrolysates on the physiology of yeast strains and lactic acid bacteria. *Biotechnology Letters*, Springer, v. 42, p. 571–582, jan. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10529-020-02803-6>>.

CONAB. *PRODUCAO DE ETANOL NO BRASIL MANTEM RECORDE COM 33,14 BILHOES DE LITROS*. 2019. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/2859-producao-de-etanol-no-brasil-mantem-recorde-e-alcanca-33-58-bilhoes-de-litros>>.

CONAB, C. N. d. A. *Acompanhamento da Safra Brasileira Cana-de-açúcar*. 2019. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>>.

DIAS, M. O. de S. *Simulação do Processo de Produção de Etanol a Partir do Açúcar e do Bagaço, Visando a Integração do Processo e a Maximização da Produção de Energia e Excedentes do Bagaço*. Faculdade de Engenharia Química Universidade Estadual de Campinas, 2008. Disponível em: <<http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/266223>>.

DORAN, P. M. *Bioprocess engineering principles*. [S.l.]: Academic Press, 1995. 439 p. ISBN 9780122208515.

DURAISKI, R. G. *Otimização dinâmica em tempo real utilizando modelos não-lineares simplificados*. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2019.10.002>>.

ELIODÓRIO, K. P. et al. Advances in yeast alcoholic fermentations for the production of bioethanol, beer and wine. In: *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier, 2019. p. 61–119. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2019.10.002>>.

ELIODORIO, K. P.; GIUDICI, R. . N. *Advances in Yeast Fermentation*. 2019.

EVALUATION of optimization techniques for parameter estimation: Application to ethanol fermentation considering the effect of temperature. *Process Biochemistry*, Elsevier, v. 41, n. 7, p. Elmer Copa Rivera and Aline C Costa and Daniel I P Atala and Francisco Maugeri and Maria R. Wolf Maciel and Rubens Maciel Filho, jul. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.02.009>>.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação contínua. In: *Biotecnologia Industrial Volume 2*. [S.l.: s.n.], 2001. cap. 12.

FOLCH-MALLOL, J. L. et al. La respuesta a estrés en la levadura *saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana De Microbiología*, v. 46, p. 24–46, 2004.

GIUDICI R. NASCIMENTO, C. *Simulação de fermentador descontínuo alimentado em fermentação alcoólica em regime não-isotérmico*. 1984. 516-532 p.

GODOY, A. et al. Continuous and batch fermentation processes: Advantages and disadvantages of these processes in the brazilian ethanol production. *International Sugar Journal*, v. 110, n. 1311, p. 42–51, mar. 2008.

HELLE, S. et al. Effect of inhibitory compounds found in biomass hydrolysates on growth and xylose fermentation by a genetically engineered strain of *s. cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, Elsevier, v. 33, n. 6, p. 786–792, set. 2014. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00214-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00214-X)>.

HENDLER, B. *Construção de Um Software de Simulação e Ajuste de Curvas Cinéticas Para o Processo de Fermentação em Batelada Alimentada*. Faculdade de Engenharia Química Universidade Estadual de Campinas, 2011. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/266887/1/Hendler_Bernardo_M.pdf>.

HERRERA, W. E. et al. Modeling and control of a continuous ethanol fermentation using a mixture of enzymatic hydrolysate and molasses from sugarcane. *CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS (CET)*, The Italian Association of Chemical Engineering (AIDIC), v. 50, p. 169–174, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3303/CET1650029>>.

HISS, H. Cinética de porcessos fermentativos. In: *Biotecnologia Industrial Volume 2*. [S.l.: s.n.], 2001. cap. 6.

- KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. *Estudos Avançados*, Instituto de Estudos Avançados da Universidade de São Paulo, v. 24, n. 68, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0103-40142010000100017>>.
- LIMA, U. de A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. de. Produção de etanol. In: *Biotecnologia Industrial Volume 3*. [S.l.: s.n.], 2001. cap. 1.
- LOPES, C. H.; GABRIEL, A. V. M. D.; BORGES, M. T. M. R. *Produção de etanol a partir da cana-de-açúcar: tecnologia de produção de etanol*. 2011. Disponível em: <http://audiovisual.uab.ufscar.br/impresso/2016/TS/TS_Claudio_ProducaoEtanol.pdf>.
- LOPES, M. L. et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, Fermentec, v. 47, n. 1, p. 64—76, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.003>>.
- LUEDEKING, R.; PIRET, E. L. A kinetic study of the lactic acid fermentation. batch process at controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, Wiley, v. 1, n. 4, p. 393—412, dez. 1959. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jbmte.390010406>>.
- LUEDEKING, R.; PIRET, E. L. Transient and steady states in continuous fermentation. theory and experiment. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, Wiley, v. 1, n. 4, p. 431—459, dez. 1959. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jbmte.390010408>>.
- MANOCCHIO, C. et al. Ethanol from biomass: A comparative overview. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Springer Verlag, v. 80, p. 743—755, dez. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.063>>.
- MATLAB. *lsqcurvefit*. 2020. Disponível em: <"<https://www.mathworks.com/help/optim/ug/lsqcurvefit.html>">.
- NITSCH, M. O programa de biocombustíveis proalcool no contexto da estratégia energética brasileira. *Revista de Economia Política*, v. 11, n. 2, p. 123—138, 1991. Disponível em: <<http://www.rep.org.br/pdf/42-10.pdf>>.
- OLIVEIRA, S. C. et al. Kinetic modeling of 1-g ethanol fermentations. In: *Fermentation Processes*. InTech, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.5772/65460>>.
- PHISALAPHONG, M.; SRIRATTANA, N.; TANTHAPANICHAKOON, W. Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, Elsevier BV, v. 28, p. 36—43, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.08.039>>.
- RIVERA, E. C. et al. Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: Application to ethanol fermentation considering the effect of temperature. *Process Biochemistry*, Elsevier BV, v. 41, n. 7, p. 1682—1687, jul. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.02.009>>.
- SATO, J. C. M. de C. S. Fermentação descontínua. In: *Biotecnologia Industrial Volume 2*. [S.l.: s.n.], 2001. cap. 9.

SONEGO, J. L. S. *ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SACAROSE POR FERMENTAÇÃO EXTRATIVA UTILIZANDO ARRASTE COM DIÓXIDO DE CARBONO*. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA, 2016. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/10273/TeseJLSS.pdf?sequence=3&isAllowed=y>>.

TOSETTO, G. M. *COMPORTAMENTO DE LINHAGENS INDUSTRIAIS DE SACHAROMYCES FRENTE A COMPOSTOS INIBITÓRIOS PRESENTES NO MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR NA PRODUÇÃO DE BIOETANOL*. Faculdade de Engenharia Química Universidade Estadual de Campinas, 2008. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/266224/1/Tosetto_GiseleMantei_D.pdf>.

UNICA. *SETOR SUCROENERGÉTICO NO BRASIL UMA VISÃO PARA 2030*. 2016. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/documents/10584/7948692/UNICA-CEISE_Setor+Sucroenerg%C3%A9tico+no+Brasil_Uma+Vis%C3%A3o+para+2030.pdf/80da9580-60c7-4f53-afaf-030ad01f3ebf;jsessionid=AC802B166C93389BED1AB445EAB7CD10.srv155>.

VIEGAS, M. C. *OTIMIZAÇÃO DE SISTEMA DE FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA CONTÍNUA UTILIZANDO REATORES TIPO TORRE E LEVEDURAS COM CARACTERÍSTICAS FLOCULANTES*. Faculdade de Engenharia Química Universidade Estadual de Campinas, DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS, 2003. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/267478/1/Viegas_MarceloCaldeira_D.pdf>.

XAVIER, M. R. The brazilian sugarcane ethanol experience. *Advancing Liberty, Economy to Ecology*, n. 3, p. 11–14, 2007. Disponível em: <<https://www.cei.org/pdf/5774.pdf>>.