

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS
MESTRADO PROFISSIONAL

RAFAEL HENRIQUE GONÇALVES

MODELAGEM MATEMÁTICA DE UM PROCESSO CONTÍNUO DE
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA MULTISTÁGIO EM ESCALA
INDUSTRIAL

ARARAQUARA - SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

RAFAEL HENRIQUE GONÇALVES

MODELAGEM MATEMÁTICA DE UM PROCESSO CONTÍNUO DE
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA MULTISTÁGIO EM ESCALA
INDUSTRIAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional), Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Samuel Conceição de Oliveira

ARARAQUARA - SP

2024

G635m

Gonçalves, Rafael Henrique.

Modelagem matemática de um processo contínuo de fermentação alcoólica multiestágio em escala industrial / Rafael Henrique Gonçalves. – Araraquara, 2024.
63 f. : il.

Orientador: Samuel Conceição de Oliveira.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos.

1. Fermentação alcoólica. 2. Processo contínuo. 3. Leveduras. 4. Modelagem matemática. 5. Simulação. I. Oliveira, Samuel Conceição de, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030170P0
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Modelagem matemática de um processo contínuo de fermentação alcoólica multiestágio em escala industrial

AUTOR: RAFAEL HENRIQUE GONÇALVES

ORIENTADOR: SAMUEL CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos, área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. SAMUEL CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA (Participação Presencial)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do
Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. OSSAMU HOJO (Participação Presencial)
Departamento de Engenharia, Física e Matemática / Instituto de Química do Campus de Araraquara da Unesp

Dr. IVAN ILICH KERBAUY VELOSO (Participação Presencial)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do
Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 28 de março de 2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que ele fez e continua fazendo na minha vida, por me permitir essa nova conquista acadêmica.

Agradeço aos meus pais e irmãos pelo apoio e forças nos momentos difíceis e principalmente por estarem comigo e confiarem em mim em todas as minhas decisões. À minha sobrinha por alegrar a minha vida. E a todos os meus demais familiares.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Samuel Conceição de Oliveira, por sua indiscutível competência como orientador. Agradeço por todos os ensinamentos, correções, contribuições e sugestões que fizeram com que este trabalho fosse concluído.

Aos demais professores do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos da FCF (Faculdade de Ciências Farmacêuticas) pela contribuição ao meu crescimento acadêmico e pessoal com as diferentes disciplinas cursadas.

Aos membros da banca examinadora pelas excelentes contribuições.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos pela oportunidade concedida.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa dissertação. Com vocês divido a alegria desta experiência e ciclo da minha vida.

RESUMO

Neste trabalho, realizou-se a modelagem matemática de um processo contínuo de fermentação alcoólica multiestágio em escala industrial baseada na inspeção de dados experimentais obtidos no sistema operado diariamente sob vazão volumétrica e concentração de substrato variáveis na corrente de alimentação. A partir da análise dos dados experimentais foi possível verificar que o percentual de células viáveis no bioprocessamento foi elevado, fazendo com que uma abordagem não segregada fosse suficiente para descrever a população microbiana visto que a inativação e a morte de leveduras não foram significativas. Devido à indisponibilidade de dados experimentais sobre a concentração celular nos tanques de fermentação, uma forma alternativa de quantificar indiretamente esta variável foi aplicada. Uma vez que o etanol é um bem conhecido inibidor do metabolismo de leveduras, seu efeito inibitório foi considerado no desenvolvimento do modelo, bem como a inibição pela própria biomassa. A produção de etanol foi descrita pelo clássico modelo de Luedeking-Piret, considerando a formação deste produto totalmente associada ao crescimento celular. Além destes, outros aspectos e características importantes, bem como informações da literatura e hipóteses simplificadoras foram reunidas na concepção de um modelo matemático para o bioprocessamento, as quais foram traduzidas em equações matemáticas que foram convertidas em linguagem de programação para fazer simulações que permitiram comparar as previsões do modelo com dados experimentais. Os parâmetros do modelo foram estimados por regressão não-linear, obtendo-se valores similares àqueles comumente reportados na literatura para este bioprocessamento. O ajuste do modelo foi considerado bom tanto para os dados experimentais usados na etapa de estimação de parâmetros quanto àqueles usados na etapa de validação do modelo.

Palavras-chave: fermentação alcoólica; processo contínuo; leveduras; modelagem matemática; simulação.

ABSTRACT

In this work, mathematical modeling of a continuous multistage alcoholic fermentation process in an industrial scale was carried out based on the inspection of experimental data obtained in the system operated daily under variable volumetric flow and substrate concentration in the feed stream. From the analysis of available experimental data, it was possible to verify that the percentage of viable cells in the bioprocess was high, making a non-segregated approach sufficient to describe the microbial population since the inactivation and death of yeasts were not significant. Due to the unavailability of experimental data on cell concentration in fermentation tanks, an alternative way of indirectly quantifying this variable was applied. Since ethanol is a known inhibitor of yeast metabolism, its inhibitory effect was considered in the development of the model, as well as inhibition by the biomass itself. Ethanol production was described by the classic Luedeking-Piret model, considering the product formation fully associated with cell growth. In addition to these, other important aspects and characteristics, as well as information from the literature and simplifying hypotheses were reunited in the conception of a mathematical model for the bioprocess, which was translated into mathematical equations that were converted into programming language to perform simulations in order to compare the model predictions with the experimental data. The model parameters were estimated by non-linear regression, obtaining values similar to those commonly reported in the literature for this bioprocess. The model fit was considered good for both experimental data used in the parameter estimation stage and those used in the model validation stage.

Keywords: alcoholic fermentation; continuous process; yeasts; mathematical modeling; simulation

Índice de Figuras

Figura 1 – Esquema de uma célula de levedura.....	16
Figura 2 – Esquema de crescimento de leveduras por brotamento.....	17
Figura 3 – Fórmula estrutural da D – Glicose e D – Frutose.....	18
Figura 4 – Esquema do processo de fermentação alcoólica em batelada Alimentada.....	19
Figura 5 – Fluxograma simplificado de um processo contínuo de fermentação alcoólica em único estágio	20
Figura 6 – Fluxograma simplificado de um processo contínuo de fermentação alcoólica multiestágio com reúso de células	21
Figura 7 – Efeitos do estresse osmótico sobre células de leveduras	26
Figura 8 – Fluxograma simplificado do processo contínuo de fermentação alcoólica multiestágio em escala industrial.....	32
Figura 9 – Esquema das correntes de entrada e saída na 1ª dorna de fermentação e respectivas concentrações dos componentes.....	35
Figura 10 – Esquema do separador de biomassa com suas correntes de entrada e saída e respectivas concentrações dos componentes	36
Figura 11 – Concentração de substrato diária na corrente de alimentação do sistema de fermentação (S0).....	38
Figura 12 – Concentração de produto diária na saída da 4ª dorna (P4)	39
Figura 13 – Porcentagem de células viáveis na 1ª dorna do sistema de fermentação.....	42
Figura 14 – Porcentagem de brotamento celular na 1ª dorna de fermentação.....	43
Figura 15 – Fluxograma adaptado do bioprocesso para fins de formulação do modelo matemático	47
Figura 16 – Ajuste do modelo aos dados experimentais da dorna 1.....	52
Figura 17 – Ajuste do modelo aos dados experimentais da dorna 4.....	54
Figura 18 – Simulação do comportamento diário da concentração de etanol e de biomassa nas dornas 2 e 3	55
Figura A1 - Fluxograma simplificado para cálculo das condições de entrada na dorna 1	62

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Equações propostas para descrever o efeito inibitório do etanol sobre as velocidades específicas de crescimento celular (μ_x) e formação de produto (μ_p) em fermentações alcoólicas.....	28
Tabela 2 – Valores diários de vazão volumétrica e concentração de substrato em algumas correntes do bioprocessamento e concentração de substrato nas saídas das dornas.	39
Tabela 3 – Valores diários da concentração de substrato, etanol e biomassa em alguns pontos principais do sistema de fermentação e fatores aparentes de conversão.....	41
Tabela 4 – Compilação dos dados de concentração de substrato, células e etanol disponíveis para a estimação dos parâmetros cinéticos e a avaliação do ajuste do modelo.....	48
Tabela 5 – Valores e desvios-padrão dos parâmetros cinéticos do modelo proposto.....	51

Lista de Abreviaturas

ART: Açúcares Redutores Totais

F_0 : vazão de alimentação no sistema de fermentação.....(g/L)

F_m : vazão da corrente de mistura.(m³/h)

F_i : vazão de saída da dorna i (i=1, 2, 3, 4).....(m³/h)

F_r : vazão da corrente de reciclo..... (m³/h)

K_i : constante de inibição pelo substrato..... (g/L)

K_P : constante de inibição pelo produto(g/L)

K_s : constante de saturação de Monod..... (g/L)

P_{max} : concentração máxima de produto tolerável pela levedura. (g/L)

S_m : concentração de substrato na corrente de mistura.....(g/L)

P_m : concentração de produto na corrente de mistura. (g/L)

X_m : concentração de células na corrente de mistura. (g/L)

S_r : concentração de substrato na corrente de reciclo (g/L)

P_r : concentração de produto na corrente de reciclo..... (g/L)

X_r : concentração de células na corrente de reciclo..... (g/L)

S_i : concentração de substrato na dorna i (i=1, 2, 3, 4).....(g/L)

P_i : concentração de produto na dorna i (i=1, 2, 3, 4) (g/L)

X_i : concentração de células na dorna i (i=1, 2, 3, 4) (g/L)

$Y_{P/S}$: fator de rendimento em etanol por grama de substrato consumido (g/g)

$Y_{P/X}$: fator de rendimento em etanol por grama de células formadas. (g/g)

$Y_{X/S}$: fator de rendimento em células por grama de substrato consumido (g/g)

μ_X : velocidade específica de crescimento celular (h⁻¹)

μ_{max} : velocidade específica máxima de crescimento celular (h⁻¹)

μ_S : velocidade específica de consumo de substrato (g/(g.h))

μ_P : velocidade específica de formação de produto (g/(g.h))

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVO.....	14
2.1 Objetivo Principal.....	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1 Produção de Etanol no Brasil	15
3.2 Bioprocessos de Produção de Etanol	16
3.3 Fermentação Batelada Alimentada	18
3.4 Fermentação Contínua.....	20
3.5 Alguns Fatores Influentes na Fermentação Alcoólica	22
3.5.1 Temperatura	22
3.5.2 pH.....	22
3.5.3 Viabilidade celular.....	22
3.6 Modelagem Matemática de Bioprocessos	23
3.7 Cinética de Fermentação Alcoólica.....	25
4. METODOLOGIA.....	32
4.1 Dados Experimentais	32
4.2 Métodos Analíticos	32
4.2.1 Determinação da Viabilidade e do Brotamento Celular	32
4.2.2 Determinação do Teor Alcoólico	33
4.2.3 Determinação dos Açúcares Redutores Totais (ART)	33
4.2.4 Estimação da Concentração Celular.....	34
4.3 Equações de Balanço de Massa	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Dados Experimentais	37
5.1.1 Concentração de Substrato na Alimentação	37
5.1.2 Concentração de Produto.....	39
5.1.3 Viabilidade Celular	42
5.1.4 Brotamento Celular	43
5.2 Concepção do Modelo Matemático do Bioprocessos.....	43
5.3 Formulação do Modelo Matemático	47
5.4 Estimação dos Parâmetros Cinéticos.....	49
5.5 Verificação da Qualidade do Ajuste do Modelo aos Dados Experimentais	51
6. CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
APÊNDICE A – CÁLCULO DAS CONDIÇÕES DE ENTRADA NA DORNA 1.....	62

1. INTRODUÇÃO

O Acordo de Paris (COP21) é um tratado mundial sobre as alterações climáticas que tem como objetivo principal conter o aumento do aquecimento global, estimulando os países desenvolvidos a darem suporte financeiro e tecnológico aos países subdesenvolvidos a fim de ampliar as ações que contribuam para a redução da emissão de gases de efeito estufa Bioen (2021). Neste contexto, o etanol produzido no Brasil e no mundo se destaca por inúmeros benefícios tais como ser uma fonte de energia renovável, apresentar baixo teor de emissões poluentes, ser produzido a partir de matérias-primas de origem vegetal e ser uma opção mais sustentável em comparação aos combustíveis fósseis. O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, ocupando o primeiro lugar no ranking global de produção desse biocombustível a partir dessa matéria-prima Udop (2020). Além disso, de acordo com a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico OCDE (2021), o Brasil é atualmente o único país do mundo em que o uso de biocombustíveis supera 10% da demanda de energia para transportes.

É consensual a necessidade de se obter ganhos de produtividade, a níveis agrícola e industrial, para que a atividade produtora de álcool combustível, a partir da cana-de-açúcar, possa aumentar a sua rentabilidade econômica e se tornar menos dependente do sistema de subsídios governamentais que atualmente utiliza. Atualmente, a maioria das unidades industriais brasileiras utiliza o processo tradicional de Melle-Boinot de produção de etanol, que se fundamenta na fermentação com recuperação das células por centrifugação e o seu posterior tratamento com ácido sulfúrico Alcarde (2007).

Um processo ainda pouco empregado nas usinas brasileiras é a fermentação contínua multiestágio, o qual consiste na alimentação contínua de meio fresco e na retirada, também contínua, de meio fermentado, utilizando-se de 4 a 5 dornas conectadas em série Madaleno (2013). Esta operação apresenta algumas vantagens em relação ao processo Melle-Boinot, tais como maior produtividade e qualidade do produto obtido, o que facilita a automação do bioprocessos e a redução dos custos com mão de obra.

Desta forma, o processo contínuo representa para o setor industrial uma alternativa extremamente vantajosa do ponto de vista técnico-econômico, pois combina elevados valores de produtividade com reduzidos investimentos devido à utilização de equipamentos de menores custos. Além disso, a concepção extremamente simples deste processo o torna potencialmente implementável às unidades industriais existentes que operam segundo o processo Melle-Boinot, uma vez que as mesmas dornas de fermentação podem ser utilizadas, sendo necessárias apenas algumas adaptações no sistema.

Uma parte significativa das usinas brasileiras ainda opera com baixo grau de automação e controle de seus processos, prevalecendo o empirismo e acarretando não homogeneidade e limitações na qualidade do produto obtido. Conforme Lobato (2015), em setores industriais bem desenvolvidos, como o petroquímico, a otimização de processos já é uma ferramenta bastante consolidada. Neste contexto, a modelagem matemática é um requisito fundamental para o projeto, operação, controle e otimização de qualquer bioprocessos. Algumas das mais importantes utilidades de um modelo matemático são a simulação do comportamento do bioprocessos em condições e escalas não investigadas experimentalmente, estudo do comportamento dinâmico e estacionário do bioprocessos, projeto e ajuste dos algoritmos de controle e determinação do ponto de operação economicamente ótimo, dentre outras.

De forma geral, a modelagem matemática de um bioprocessos corresponde à representação, por meio de equações matemáticas, dos balanços de massa para cada componente no biorreator e das velocidades com que as principais transformações bioquímicas ocorrem no processo Bonomi; Schmidel (2001). Por meio de modelagem e simulação é possível analisar e avaliar os fatores intervenientes no bioprocessos, selecionando-os e otimizando-os de modo a se ter melhor desempenho operacional e controle do bioprocessos.

Embora ao se realizar a modelagem matemática não seja possível descrever todos os aspectos envolvidos no bioprocessos, esta tem por objetivo organizar de forma coerente informações desconexas sobre os eventos, identificando os fenômenos e interações mais relevantes do bioprocessos Bailey (1998).

Uma vez validado o modelo matemático do bioprocessos com dados experimentais, este poderá ser usado para a otimização do processo produtivo, pois permitirá avaliar, por meio de simulações, condições não testadas experimentalmente, possibilitando a determinação de condições ótimas para a operação.

Apesar de haver inúmeros trabalhos publicados na literatura sobre modelagem e simulação de processos de fermentação alcoólica, abordando diferentes aspectos tais como cinética, otimização e controle do bioprocesso, a maioria dos trabalhos refere-se à descrição matemática de processos conduzidos em modo batelada ou batelada alimentada em único fermentador, em escala de bancada. Poucos são os trabalhos sobre modelagem de processos contínuos, muito menos quando estes são conduzidos em unidades em série, em escala industrial, como no presente caso, o que desperta grande interesse acadêmico e tecnológico, pois esta configuração operacional é utilizada em algumas usinas brasileiras.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Principal

O objetivo principal da presente dissertação é a modelagem matemática de um bioprocessamento contínuo multiestágio de produção de etanol em escala industrial, visando futuramente identificar, por meio de simulações, novas condições operacionais que possam trazer ganhos de rendimento e produtividade para o bioprocessamento.

2.2 Objetivos Específicos

- propor um modelo matemático para o bioprocessamento, consistindo na elaboração de equações de balanço de massa de substrato, leveduras e etanol baseadas em um fluxograma simplificado do sistema de fermentação;
- levantar e analisar os principais modelos cinéticos de crescimento celular, formação de produto e consumo de substrato utilizados na literatura para modelagem de processos de fermentação alcoólica;
- estimar os parâmetros do modelo proposto;
- avaliar a qualidade do ajuste do modelo aos dados experimentais por inspeção visual dos gráficos de valores experimentais e preditos para cada variável modelada.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produção de Etanol no Brasil

No início da década de 1970, o Brasil importava 80% do petróleo consumido no país. A forte dependência das importações acentuou os efeitos do primeiro choque do setor petrolífero de 1973, devido ao seu alto preço Lima (2010).

Em um esforço para contornar estes efeitos e reduzir a dependência das importações, o governo brasileiro incentivou a produção de etanol combustível em larga escala por meio da implementação do Programa Nacional do Álcool em 1975 Bray (2000). Este programa federal teve por objetivo aumentar a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar e reduzir as importações de petróleo. O governo forneceu financiamento para aqueles que modernizaram ou instalaram novas destilarias, inicialmente destinadas ao etanol anidro. O programa brasileiro é, destacadamente, a nível mundial, o maior e o mais duradouro projeto de substituição de combustível fóssil por biocombustível renovável, sendo que desde a sua criação, o país foi abastecido com mais de 637 bilhões de litros de etanol (anidro e hidratado), os quais substituíram um equivalente de 2,4 bilhões de barris de petróleo, com significativa redução de emissão de gases de efeito estufa Brasil (2022).

O etanol produzido no Brasil é usado principalmente como combustível, na forma de etanol hidratado em veículos de combustível flexível, ou como aditivo à gasolina para torná-la mais barata e menos poluente. De acordo com União Nacional de Bioenergia (2020), o Brasil é o maior produtor mundial de etanol a partir de cana-de-açúcar, possuindo a maior frota de veículos que utiliza este combustível. Atualmente, a gasolina comercializada no Brasil contém 27% de etanol em sua composição. O etanol anidro também é utilizado no país para fabricação de tintas, vernizes e solventes Conab (2017).

O etanol pode ser produzido a partir de uma variedade de matérias-primas como cana-de-açúcar, milho, beterraba, batata, sorgo, entre outras. No Brasil, a matéria-prima para produção de etanol é a cana-de-açúcar Basso *et al.* (2011). A produção total de etanol anidro no país em 2023 foi de 14,8 bilhões de litros, enquanto a de etanol hidratado foi de 24,9 bilhões de litros Conab (2023).

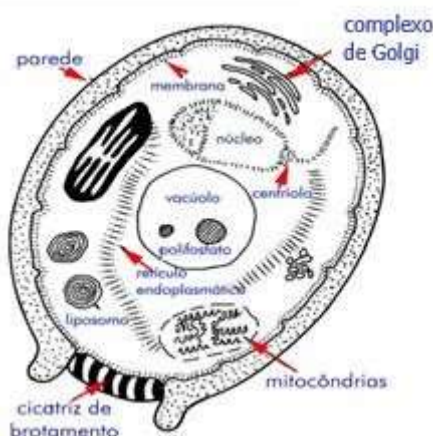
Industrialmente, etanol é obtido via fermentação de açúcares sob condições devidamente controladas, visando-se máxima produção e qualidade do produto.

3.2 Bioprocessos de Produção de Etanol

A produção de etanol é um processo biotecnológico (bioprocesso) que envolve a conversão de açúcares em álcool etílico (etanol) por meio da ação de microrganismos, geralmente leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, as quais são amplamente utilizadas por apresentarem boa capacidade fermentativa e elevada tolerância ao etanol e a outros inibidores formados durante o processo Mussato *et al.* (2010). As leveduras são microrganismos pertencentes à classe dos fungos e suas células apresentam características de seres eucarióticos, isto é, apresentam estrutura celular altamente organizada, com membrana citoplasmática lipoprotéica, cuja função principal é regular as trocas com o meio ambiente, além de possuírem também uma parede celular rígida. No citoplasma, encontram-se, além dos componentes usuais em solução, as demais organelas como mitocôndria, complexo de Golgi, lisossomo dentre outras Amorim *et al.* (1996), como pode ser observado na Figura 1, na qual é apresentado um esquema de uma célula de levedura, destacando suas principais estruturas.

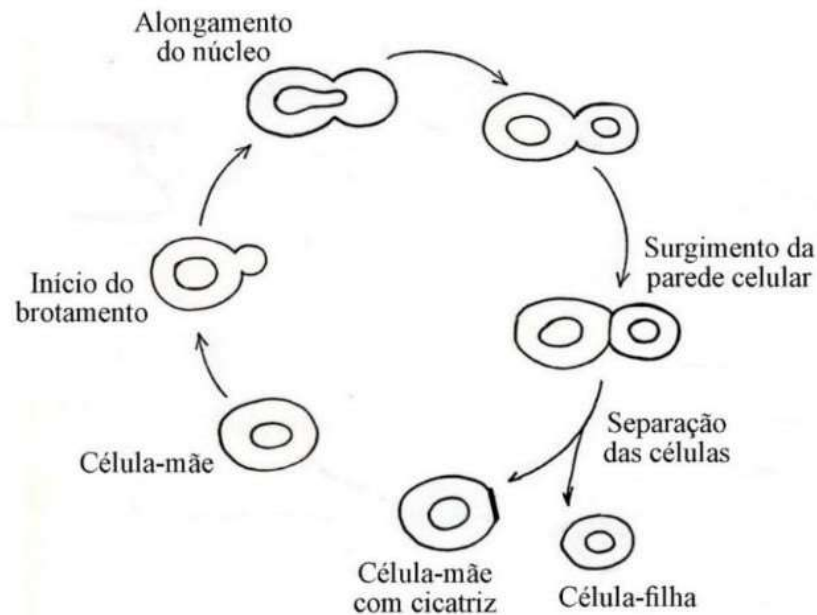
Predominantemente as leveduras apresentam-se na forma unicelular e se reproduzem basicamente por gemulação (brotamento), processo no qual uma célula mãe dá origem a uma ou mais células novas, conforme esquematizado na Figura 2.

Figura 1 – Esquema de uma célula de levedura.



Fonte: Soares *et al.* (2014).

Figura 2 – Esquema do crescimento de leveduras por brotamento

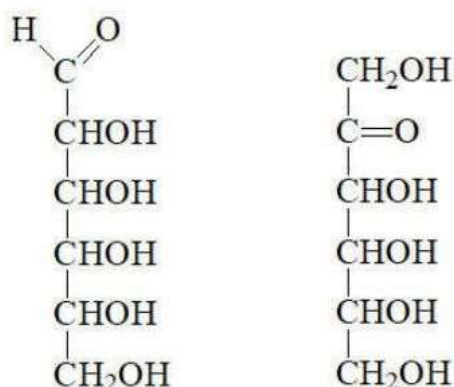


Fonte: Santos (2022).

Nas plantas industriais, denominadas genericamente de usinas, o processo de fermentação é conduzido em vasos ou dornas, os quais são alimentados com mosto, que consiste numa mistura de nutrientes e substrato, contendo os açúcares fermentescíveis que serão convertidos em etanol, além de sustentarem o crescimento celular Paternina (2011).

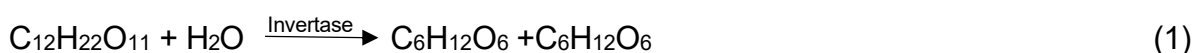
As células de leveduras possuem uma enzima constitutiva, a invertase, que hidrolisa a sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), produzindo duas moléculas menores, denominadas de monossacarídeos, os quais são convertidos em etanol Souza (2009). Os dois monossacarídeos são a D-glicose ($C_6H_{12}O_6$) e a D-frutose ($C_6H_{12}O_6$), que apesar de possuírem a mesma fórmula molecular, apresentam diferentes fórmulas estruturais, como mostrado na Figura 3.

Figura 3 – Fórmula estrutural da D – Glicose e D – Frutose.



Fonte: adaptado de Madaleno (2013).

O processo de fermentação pode ser simplificado por duas equações principais. A primeira etapa, representada pela Equação (1), consiste na hidrólise enzimática da sacarose pela invertase em duas moléculas fermentescíveis, a glicose e a frutose. A segunda etapa é a conversão de glicose ou frutose em etanol e dióxido de carbono em condições anaeróbicas, conforme representado na Equação (2).



A estequiometria da Equação (2) mostra que 0,511 g de etanol são produzidos a partir de 1 g de hexose (glicose ou frutose) consumida. Estima-se que 5% do açúcar metabolizado seja desviado para produtos secundários, como ácido acético, glicerol e óleo fúsel Amorim (1996).

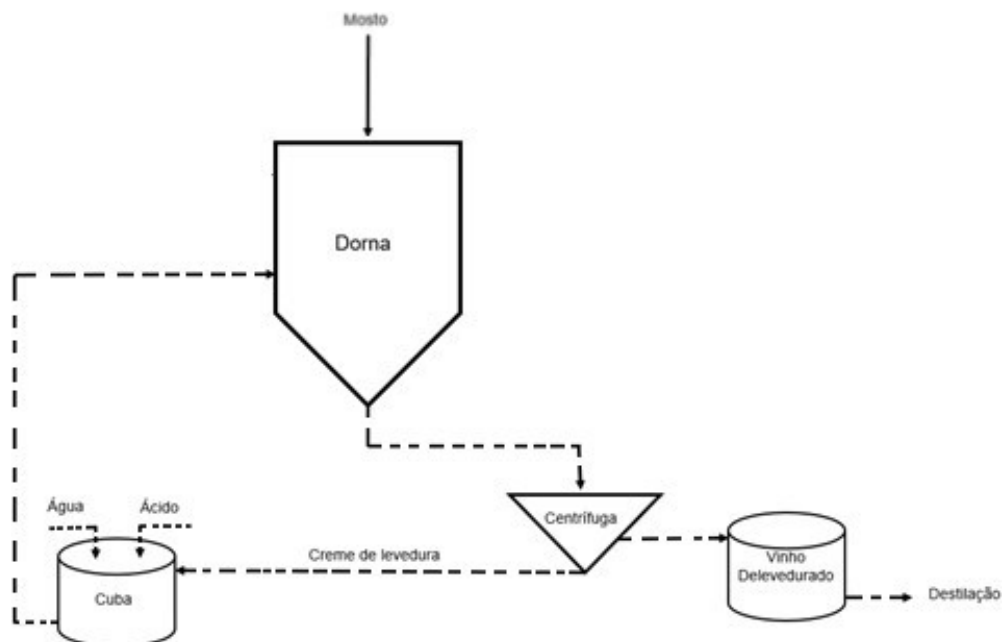
3.3 Fermentação Batelada Alimentada

Os processos industriais de fermentação podem ser classificados, de acordo com o modo de alimentação de meio fresco e de retirada de meio fermentado das dornas, em descontínuos (batelada), descontínuos alimentados ou contínuos.

O processo mais utilizado pelas usinas sucroalcooleiras no Brasil é o Melle-Boinot, o qual se caracteriza pela fermentação em modo descontínuo e posterior recuperação do fermento por centrifugação e tratamento com ácido visando o reúso de biomassa no processo Alcarde (2007). Na dorna, o fermento é inoculado no mosto

e a fermentação é conduzida até o final, sendo a alimentação de substrato (mosto) no reator realizada gradual ou continuamente durante a fermentação. Após a fermentação, a dorna é esvaziada e o vinho levedurado, contendo aproximadamente 11% em massa de fermento e grau alcóolico entre 8 e 12% (v/v), é conduzido às centrífugas, nas quais são obtidas duas correntes, uma de topo, clarificada em biomassa (vinho delevedurado) e a outra de fundo, concentrada em biomassa. A corrente de vinho delevedurado é encaminhada primeiramente a um tanque pulmão e depois para a destilação. A corrente de fundo (concentrada em biomassa) é encaminhada às cubas para um pré-tratamento, consistindo de diluição e acidificação, sendo a biomassa em seguida reciclada para a dorna de fermentação Madaleno (2013). Devido à exotermicidade do bioprocessamento, as dornas são resfriadas por serpentinas ou trocadores para manter a temperatura adequada à atividade celular Carvalho (2001). Na Figura 3.4 está apresentado um esquema do processo de fermentação alcoólica em batelada alimentada, no qual as linhas tracejadas representam operações que são realizadas após a etapa fermentativa.

Figura 4 – Esquema do processo de fermentação alcoólica em batelada alimentada.



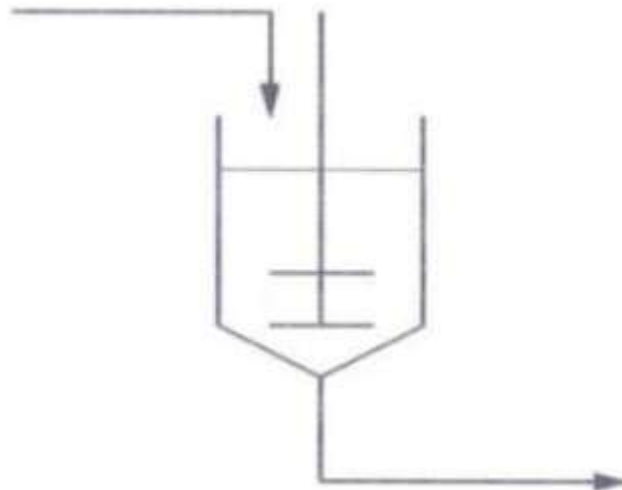
Fonte: Autor (2024).

3.4 Fermentação Contínua

Um processo pouco empregado nas usinas brasileiras é o processo contínuo, o qual se caracteriza pela alimentação de mosto fresco e retirada de mosto fermentado continuamente da dorna, à mesma vazão, fazendo com que o volume de caldo permaneça constante na dorna Basso; Amorim (1996). O processo contínuo começou a ser utilizado no Brasil no final da década de 70 Andrietta *et al.* (1994).

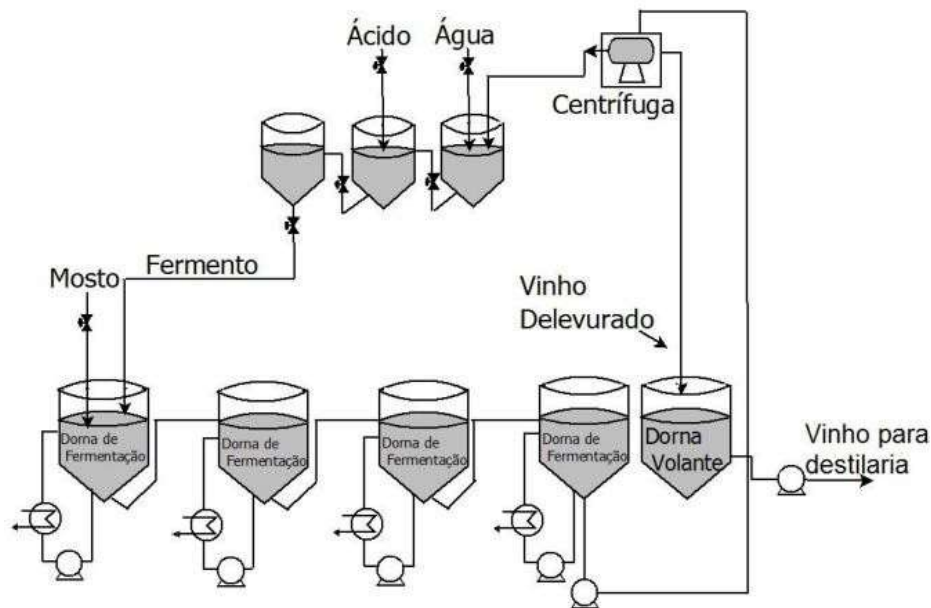
Na operação em modo contínuo, há uma versatilidade quanto à condução do processo fermentativo podendo ser em única dorna/estágio (Figura 3.5) ou em múltiplas dornas/estágios (Figura 3.6). Nas usinas brasileiras, é comum utilizar 4 ou 5 dornas em série, onde na 1ª dorna é alimentada uma corrente contínua de mosto, a qual vai passando de dorna em dorna, sendo o teor de açúcar nas correntes de saída destas dornas gradativamente reduzido até próximo de zero na corrente de saída da última dorna, obtendo-se ao final, elevado teor alcoólico. Em seguida, o vinho levedurado é centrifugado e tratado com ácido para recuperação e reúso da biomassa no processo.

Figura 5 – Fluxograma simplificado de um processo contínuo de fermentação alcoólica em único estágio.



Fonte: Autor (2024).

Figura 6 – Fluxograma simplificado de um processo contínuo de fermentação alcoólica multiestágio com reúso de células.



Fonte: Vasconcelo (2012).

O processo contínuo apresenta vantagens e desvantagens em relação ao processo batelada alimentada, destacando-se Facciotti (2001); Pacheco (2010):

- maior produtividade;
- menor volume de equipamentos em geral;
- possibilidade de automação total do bioprocessos ;
- redução, de maneira geral, do consumo de insumos;
- operações em condições de estado estacionário;
- maior risco de contaminação;
- possibilidade de ocorrência de mutações genéticas espontâneas e seleção de mutantes menos produtivos;
- dificuldades de operação em estado estacionário devido à possibilidade de formação exagerada de espuma e de crescimento do microrganismo nas paredes da dorna;
- dificuldade de manutenção de homogeneidade nas dornas quando se opera com baixas vazões ou com unidades de grande porte;
- maior investimento fixo na planta.

3.5 Alguns Fatores Influentes na Fermentação Alcoólica

3.5.1 Temperatura

É um fator muito importante na fermentação alcoólica com as leveduras atuando melhor em temperaturas entre 28 e 35 °C. Altas temperaturas, potencializam o efeito inibitório do etanol, afetando negativamente o comportamento das leveduras e reduzindo o teor alcoólico no vinho, tornando-se um agravante para a contaminação bacteriana, pois à medida que a temperatura aumenta, maior é a toxidez do etanol, ocasionando perda de viabilidade celular, inativação de leveduras e consequente redução do rendimento alcoólico Santos (2019). Em baixas temperaturas, por falta de ativação térmica, há redução da velocidade da reação de transformação do substrato, com diminuição da conversão de açúcar em etanol, afetando negativamente a produtividade do bioprocessamento.

3.5.2 pH

O pH do meio de fermentação influencia muito no rendimento em etanol, pois está intimamente relacionado à atividade de várias enzimas envolvidas nas reações do crescimento microbiano e da formação de produto, sendo o pH ideal usado nas unidades industriais situado na faixa de 4,0 a 5,5.

Em decorrência dos efeitos da temperatura e do pH sobre a atividade celular, torna-se evidente que, do ponto de vista industrial, é mais fácil operar e controlar o bioprocessamento em faixas ótimas destas variáveis do que em pontos fixos. Sabe-se que, sempre existirão valores ótimos de pH e temperatura que maximizarão o crescimento celular e a formação de produto. Entretanto, o controle rigoroso de temperatura e pH nestes valores ótimos somente será factível em reatores de pequeno porte, pois em reatores de grande porte (dezenas de milhares de litros), ocorrerá heterogeneidades destas variáveis ao longo do volume do reator, de forma que as células deverão manter o desempenho desejado mesmo diante de tais heterogeneidades.

3.5.3 Viabilidade celular

Quanto maior a viabilidade celular melhor será o desempenho do processo, pois maior será o número de microrganismos ativos tanto no processo de crescimento celular quanto no processo de produção de etanol. Na literatura é reportado que a

viabilidade celular de leveduras decresce gradualmente em anaerobiose porque alguns componentes, tais como ácidos graxos insaturados, que conferem resistência ao etanol e integridade à membrana celular das leveduras, deixam de ser sintetizados na ausência de oxigênio, diminuindo a viabilidade celular. O aumento da temperatura de fermentação também contribui fortemente para o declínio da viabilidade celular, pois conforme já explicado, com o aumento da temperatura, a levedura torna-se mais sensível à toxidez do etanol Silva Filho *et al.* (2005), e mais vulnerável a contaminações.

3.6 Modelagem Matemática de Bioprocessos

De um modo bem abrangente, a modelagem matemática de bioprocessos pode ser definida como processo de concepção e formulação do conjunto de equações representativas do bioprocessos.

Em virtude da complexidade dos bioprocessos e do elevado número de parâmetros físico-químicos, bioquímicos e genéticos, além de limitações matemáticas, os modelos, em geral, são baseados na idealidade, representando aproximadamente o comportamento das principais variáveis do bioprocessos Voleski; Votruba (1992), uma vez que é impossível fazer uma descrição matemática completa de todas as vias e interações metabólicas que ocorrem em um bioprocessos Ohba (1998).

De acordo com a abordagem utilizada na modelagem, os modelos matemáticos de bioprocessos podem ser classificados como fenomenológicos ou empíricos. A abordagem empírica consiste na observação da tendência de comportamento dos dados medidos de cada variável modelada, buscando-se, num passo seguinte, identificar, quais dentre equações empíricas do tipo linear, polinomial, exponencial, etc., aquela que melhor descreve o comportamento observado. Nesta abordagem, os mecanismos de causa e efeito entre as variáveis de entrada e saída são completamente ignorados. A principal vantagem desta abordagem é a facilidade/rapidez com que se pode chegar a um modelo final satisfatório, dentre aqueles testados. Entretanto, como principal desvantagem, tem-se um alto risco ao se fazer extrapolações, pois não há base fenomenológica nenhuma que as assegure.

Na abordagem fenomenológica, o modelo é elaborado com base na descrição dos fenômenos principais governantes do bioprocessos e em princípios fundamentais de conservação, tendendo a apresentar boa capacidade de reprodução dos dados experimentais e extrapolação do comportamento das variáveis modeladas. Os

modelos fenomenológicos de bioprocessos compreendem vários aspectos, incluindo hipóteses simplificadoras, equações de balanço de massa, energia e quantidade de movimento, equações cinéticas e de equilíbrio termodinâmico, além de condições iniciais e/ou de contorno quando for o caso Bonomi; Schmidell (2001).

Conforme Bonomi e Schmidell (2001), os modelos cinéticos de bioprocessos podem ainda ser classificadas, quanto à heterogeneidade da população microbiana, em modelos segregados/não-segregados e quanto ao número de componentes intracelulares usado na representação celular, em modelos estruturados/não-estruturados. Nos modelos segregados as células são consideradas como indivíduos discretos de uma população heterogênea, com distribuição de idade, tamanho e propriedades celulares. Nos modelos não-segregados a população é considerada homogênea, isto é, todas as células apresentam o mesmo comportamento, não havendo segregação entre elas sob nenhum aspecto.

Nos modelos estruturados, a descrição é realizada mais detalhadamente, atribuindo-se à célula microbiana uma estrutura interna dividida em compartimentos nos quais estariam locados os principais componentes intracelulares envolvidos no bioprocessos, conferindo uma composição à célula em termos destes componentes, cuja variação temporal é descrita matematicamente. Nos modelos não-estruturados as células são vistas como um reagente simples, com composição química constante, isto é, sem variações temporais nas quantidades relativas dos componentes intracelulares, condição esta verificada quando o crescimento é balanceado.

Segundo Bonomi e Schmidell (2001), em modelagem fenomenológica de bioprocessos, é frequente, para fins de simplificação do modelo, utilizar a abordagem não-segregada/não-estruturada, isto é, considera-se que a população celular é homogênea e que não há variações de composição intracelular durante o bioprocessos, sendo o material celular representado por uma única variável, o número de células ou a massa seca por volume.

Assim, em consequência de sua maior simplicidade, a abordagem não segregada e não estruturada tem sido a mais empregada na literatura para modelar processos de fermentação alcoólica. Nos trabalhos, diversos modelos matemáticos, levando em conta vários fenômenos, são elaborados a partir da combinação destas duas abordagens (não segregada e não estruturada) juntamente com a equação de Monod, para descrever as principais cinéticas intervenientes no processo de fermentação alcoólica, conforme descrito no item a seguir.

3.7 Cinética de Fermentação Alcoólica

O estudo cinético das velocidades específicas de crescimento celular, formação de etanol e consumo de substrato em processos de fermentação alcoólica tem sido geralmente baseado em modelos não-segregados e não-estruturados, os quais são elaborados a partir de uma abordagem que ignora a presença de células individuais e aspectos estruturais, funcionais e composicionais da célula, descrevendo os complexos processos de crescimento, produção de etanol e consumo de substrato por simples equações cinéticas do tipo das Equações (3) e (4), a seguir:

$$\mu_x = f_1(S)g_1(P) \quad (3)$$

$$\mu_p = f_2(S)g_2(P) \quad (4)$$

Nas Equações (3) e (4), μ_x e μ_p são as velocidades específicas de crescimento da levedura e de produção de etanol, respectivamente, enquanto S e P representam as concentrações do substrato limitante e do produto (etanol).

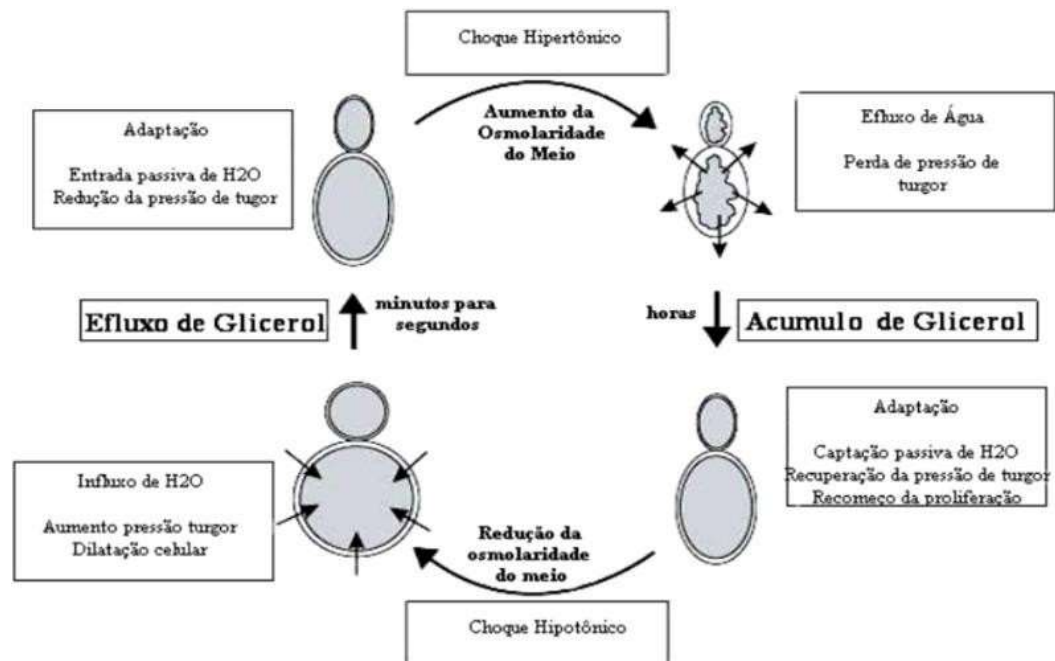
As funções $f_1(S)$ e $f_2(S)$ são geralmente do tipo de Monod, Equação (5), exceto naqueles casos em que ocorre inibição por altas concentrações de substrato ou limitações difusionais em processos com altas densidades celulares, utilizando leveduras floculantes ou imobilizadas em suportes.

$$f(S) = \frac{\mu_{max}S}{K_s + S} \quad (5)$$

A equação de Monod não considera efeitos inibitórios de nenhuma espécie, apenas limitação do crescimento pelo substrato Dutta (2008), o que é corroborado por Luong (1985) ao afirmar que a equação de Monod só se aplica quando não há presença de produtos metabólicos tóxicos.

Com relação à inibição do crescimento celular por excesso de substrato, esta ocorre devido ao estresse osmótico causado por altas concentrações de açúcares, superiores a 150 g/L segundo Steckelberg (2001). De acordo com Angioletto (2013), quando leveduras são expostas a meios hiperosmóticos, ocorre perda de água do citoplasma e para evitar desidratação celular, há alterações na fisiologia e em outras funções celulares da levedura a fim de garantir a sobrevivência, fazendo com que o microrganismo deixe de se multiplicar durante este processo, podendo, em casos extremos, acarretar perda de viabilidade celular, conforme mostrado na Figura 7.

Figura 7 – Efeitos do estresse osmótico sobre células de leveduras.



Fonte: Adaptado de Hohmann *et al.* (1997).

Uma das equações reportadas na literatura para descrever a inibição por substrato é aquela de Andrews, a qual considera o substrato tanto limitante quanto inibidor do crescimento celular quando presente em altas concentrações, sendo representada pela Equação (6), na qual K_i é a constante de inibição pelo substrato.

A equação de Andrews tem sua origem baseada em uma analogia com a equação de Haldane, a qual foi estabelecida para descrever a cinética de reações enzimáticas inibidas por substrato.

$$\mu_x = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (6)$$

Sobre a inibição pelo produto, sabe-se que o etanol é o principal agente inibidor do crescimento de leveduras em processos de fermentação alcoólica Riccia *et al.* (2004), sendo que o acúmulo deste componente resulta numa diminuição gradativa da velocidade específica de crescimento celular e, conseqüentemente, da velocidade específica de formação do próprio produto, pois o etanol é um produto do metabolismo primário das leveduras produzido simultaneamente ao crescimento microbiano Basso *et al.* (2011).

Segundo Pascual *et al.* (1988), a base molecular do mecanismo pelo qual o etanol exerce seu efeito inibitório sobre a fermentação é complexa, pois este componente, ao atuar como um agente desnaturante, pode não somente agir diretamente sobre as proteínas e causar inativação ou inibição das enzimas da via glicolítica, mas, pode também agir sobre a integridade de membranas lipídicas, afetando fatores essenciais, incluindo componentes da membrana tais como proteínas de transporte e enzimas ligadas a ela.

De acordo com Bonomi *et al.* (1981), o tipo de inibição que afeta o crescimento celular não é obrigatoriamente o mesmo que afeta a produção de etanol sendo necessário a identificação individual de cada efeito a partir do comportamento das velocidades específicas de crescimento e produção com o aumento da concentração de etanol, mantendo-se constante a concentração de substrato.

Representações simplificadas dos efeitos de inibição do etanol sobre as cinéticas de fermentação têm sido realizadas na literatura. Na Tabela 1 estão apresentadas as equações empíricas frequentemente usadas para descrever $g_1(P)$ e $g_2(P)$, as quais foram propostas por diversos autores, incluindo (Aiba *et al.*, 1968, Aiba e Shoda, 1969; Bazua e Wilke, 1977; Ghose e Tyagi, 1979; Levenspiel, 1980; Novak *et al.*, 1981; Bu' Lock *et al.* 1984; Jones *et al.*, 1984, Limtong *et al.*, 1984; Luong *et al.*, 1985; Admassu *et al.*, 1985; Comberbach *et al.*, 1987; Godia *et al.*, 1988 e Hojo *et al.*, 1999).

Tabela 1 – Equações propostas para descrever o efeito inibitório do etanol sobre as velocidades específicas de crescimento celular (μ_x) e formação de produto (μ_p) em fermentações alcoólicas

Linear (L)	$g(P) = \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)$	(7)
Não Linear Generalizada (NLG)	$g(P) = \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)^n$	(8)
Hiperbólica (H)	$g(P) = \left(\frac{K_p}{K_p + P}\right)$	(9)
Parabólica (P)	$g(P) = \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)^{0.5}$	(10)
Exponencial (E)	$g(P) = \left(e^{-\frac{K_p P}{P_m}}\right)$	(11)

Fonte: Autor (2024)

A limitação conceitual dos modelos de inibição hiperbólica e exponencial, é que eles predizem crescimento celular e produção para todas as concentrações de etanol, embora muitos trabalhos experimentais tenham mostrado que crescimento celular e produção cessam a uma dada concentração alta de etanol Lee (1985). Os modelos de inibição linear, não linear generalizado e parabólico, consideram que existe uma determinada concentração de etanol acima da qual não ocorre crescimento nem produção. Nestes modelos, os parâmetros P_m representam as concentrações de etanol para as quais os processos de crescimento e produção são completamente interrompidos.

Nos modelos linear, não linear generalizado e parabólico, os expoentes do termo $(1-P/P_m)$ são denominados por Levenspiel (1980), de “potências tóxicas”, as quais indicam como fortemente o termo de inibição $(1-P/P_m)$ afeta μ_x e μ_p , sendo que com o aumento da potência tóxica, a intensidade de inibição aumenta para uma dada concentração fixa de etanol.

Nos modelos de inibição hiperbólica e exponencial, o parâmetro K_p não possui significado fenomenológico, podendo ser considerado como uma simples constante empírica que aparentemente depende do modo batelada ou contínuo de cultivo, conforme reportado por Aiba *et al.* (1968), Aiba e Shoda (1969) e Luong (1985).

A cinética de consumo de substrato pode ser descrita de forma completa pela equação de Herbert-Pirt, segundo a qual, o substrato é consumido para crescimento e manutenção celular, bem como para produção de um determinado produto de interesse Menezes *et al.* (1994):

$$\mu_s = \frac{\mu_x}{Y_{X/S}^*} + \frac{\mu_p}{Y_{P/S}^*} + m \quad (12)$$

Na Equação (12) $Y_{X/S}^*$ e $Y_{P/S}^*$ são respectivamente os coeficientes estequiométricos de conversão de substrato em células e produto baseado no substrato consumido exclusivamente para cada finalidade e m é o termo de manutenção celular, o qual refere-se ao substrato utilizado na geração de energia para funções distintas das do crescimento tais como manutenção dos gradientes de concentração entre o interior e o exterior da célula (trabalho osmótico), síntese de componentes celulares que são continuamente degradados, dentre outras finalidades Sinclair (1991); Sinclair; Kristiansen (1987); Acevedo; Gentina (1996).

Na Equação (12), considera-se que a velocidade específica de consumo de substrato para manutenção celular (m) é constante, hipótese que Ramkrishna *et al.* (1966), não adotam, pois segundo eles, as células sofreriam um processo de degradação em etapas, no qual numa primeira etapa as células perderiam a viabilidade celular e numa segunda, morreriam caso suas necessidades de manutenção não fossem satisfeitas. Para recuperar a viabilidade, as células não viáveis necessitariam de um substrato que poderia ser o mesmo usado para o crescimento (substrato exógeno) ou um substrato armazenado internamente (substrato endógeno). A partir destas considerações, Menezes *et al.* (1994), introduziram uma modificação na representação matemática do metabolismo de manutenção, substituindo a velocidade específica de manutenção constante m na Equação (3.12) por uma velocidade específica de manutenção ζ variável com a concentração de substrato S , segundo uma equação semelhante à de Monod, dada pela Equação 3.13:

$$\zeta = \frac{\zeta_{max} S}{K_{S,m} + S} \quad (13)$$

A Equação (13) indica que à altas concentrações de substrato (S), quando $S \gg K_{S,m}$, há predominância do metabolismo exógeno e $\zeta_{max} \rightarrow m$ enquanto que, à baixas concentrações, quando $S \rightarrow 0$, o metabolismo endógeno predomina e $\zeta \rightarrow 0$.

Geralmente a cinética de consumo de substrato não é descrita utilizando-se a equação de Herbert-Pirt em toda a sua completude. A abordagem mais comum é a utilização de coeficientes aparentes de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e em etanol ($Y_{P/S}$), relacionando μ_S à μ_X ou μ_P por meios destes coeficientes aparentes, conforme as Equações (14) e (15), apresentadas a seguir:

$$\mu_S = \frac{\mu_X}{Y_{X/S}} \quad (14)$$

$$\mu_S = \frac{\mu_P}{Y_{P/S}} \quad (15)$$

Sinclair e Kristiansen (1987), enfatizam a importância de não se confundir os coeficientes estequiométricos com os respectivos coeficientes aparentes como normalmente é feito na literatura. O coeficiente estequiométrico é uma constante que depende da equação química relacionando os reagentes e os produtos (por exemplo, $Y_{P/S}^* = 0,511\text{g-etanol/g-glicose}$ na fermentação de glicose a etanol). Já o coeficiente aparente é a razão da massa de um produto formada pela massa total de substrato consumido, o qual pode estar participando de múltiplas reações formando uma variedade de produtos metabólicos, incluindo novas células. Deste modo, as Equações (16) a (19) fazem-se necessárias para uma definição precisa dos coeficientes estequiométricos e aparentes:

$$Y_{X/S}^* = \frac{\text{massa de células novas formadas}}{\text{massa de substrato consumida exclusivamente para a formação de novas células}} \quad (16)$$

$$Y_{X/S} = \frac{\text{massa de células novas formadas}}{\text{massa total de substrato consumida}} \quad (17)$$

$$Y_{P/S}^* = \frac{\text{massa de produto formada}}{\text{massa de substrato consumida exclusivamente para a formação de produto}} \quad (18)$$

$$Y_{P/S} = \frac{\text{massa de produto formada}}{\text{massa total de substrato consumida}} \quad (19)$$

Bonomi *et al.* (1981), modelando a produção de etanol a partir de hidrolisado de mandioca em biorreator descontínuo, equacionaram o balanço de massa de substrato conforme a Equação (20), justificando que as definições dos coeficientes

aparentes $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ garantem que os termos $\mu_X/Y_{X/S}$ e $\mu_P/Y_{P/S}$ são teoricamente iguais, pois ambos consistem em formas diferentes de cálculo da velocidade específica de consumo de substrato (μ_S). Entretanto, Bonomi *et al.* (1981), argumentam que os dois termos não são exatamente iguais devido aos valores calculados de $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ serem afetados por diferentes erros experimentais e os valores de μ_X e μ_P serem calculados utilizando estimativas de outros parâmetros do modelo. Assim, os referidos autores propõem a introdução da média entre tais termos na Equação (20) como uma forma de minimizar a propagação dos erros supracitados.

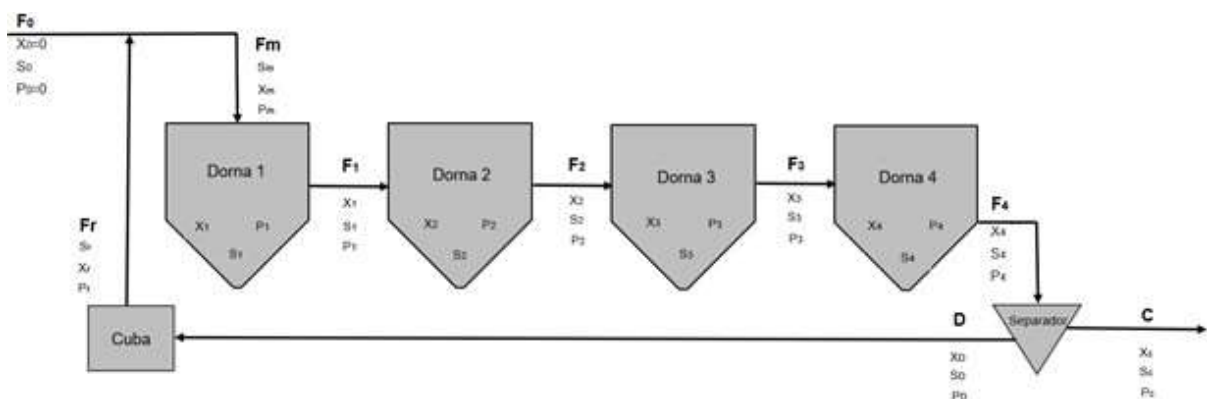
$$\frac{dS}{dt} = -\mu_S X = - \left[\frac{1}{2} \left(\frac{1}{Y_{X/S}} \mu_X + \frac{1}{Y_{P/S}} \mu_P \right) \right] X \quad (20)$$

4. METODOLOGIA

4.1 Dados Experimentais

Os dados experimentais utilizados nesta dissertação são concernentes à operação de um processo contínuo de fermentação alcoólica multiestágio em escala industrial, cujo fluxograma simplificado para fins de modelagem matemática é apresentado na Figura 8. Por razão de sigilo industrial, o nome da usina, bem como sua localização não serão identificadas.

Figura 8 – Fluxograma simplificado do processo contínuo de fermentação alcoólica multiestágio em escala industrial.



Fonte: Autor (2023).

O processo foi operado com diferentes vazões de alimentação de mosto F_0 ($F_0=93\text{-}127\text{ m}^3/\text{h}$), diferentes concentrações de substrato (açúcares redutores totais) na corrente de alimentação S_0 ($S_0=210\text{-}238\text{ g/L}$), temperatura T variando de 30 a 35 °C, sendo o valor médio de 33°C assumido como o valor constante de temperatura.

As variáveis de resposta medidas experimentalmente foram as concentrações de substrato e produto na 1ª e 4ª dornas, durante 30 dias de operação do bioprocessamento e os volumes das dornas eram $V_1=V_2=V_3=V_4=600\text{ m}^3$.

4.2 Métodos Analíticos

4.2.1 Determinação da Viabilidade e do Brotamento Celular

A viabilidade celular e o brotamento das leveduras *S. cerevisiae* foram determinados utilizando-se o método da coloração diferencial das células por solução de eritrosina, seguida de contagem de células viáveis, não viáveis e brotos viáveis em câmara de Neubauer espelhada, por meio de microscopia ótica, em microscópio

OLYMPUS, modelo BH, com objetiva de 100x, de acordo com a metodologia descrita por Oliveira *et al.* (1996). O preparo da amostra foi realizado conforme descrito a seguir: a um tubo de ensaio, foram adicionados 1 mL de caldo fermentado retirado da 1ª dorna e 49 mL de água desmineralizada. Da solução resultante foi retirado 1 mL e adicionado a um tubo de ensaio com 1 mL de solução de eritrosina. Após o preparo da amostra, uma alíquota foi colocada em câmara de Neubauer para realização da contagem, a qual foi realizada nos quatros retículos centrais de cada quadrículo somando um total de 100 retículos. Os resultados foram expressos em porcentagem sendo que a viabilidade representa a relação de células ativas e o total de células, o brotamento corresponde à relação entre brotos vivos e o total de células e o número de células viáveis por mL foi calculado mediante uma relação envolvendo o número de células vivas, o volume da câmara e o total de retículos contados.

As equações usadas para os cálculos da viabilidade celular, do brotamento e do número de células viáveis foram as Equações (21) a (23), apresentadas a seguir:

$$\text{Viabilidade Celular} = \frac{\text{Total de células viáveis}}{\text{Total de células (viáveis + não viáveis)}} * 100 \% \quad (21)$$

$$\text{Brotamento} = \frac{\text{Nº de Brotos viáveis}}{\text{Total de células viáveis}} * 100 \% \quad (22)$$

$$\text{Nº Células ativas /mL} = \frac{\text{Total de células viáveis}}{\text{Total de retículos contados}} * 4000 * D * 1000 \quad (23)$$

Na Equação (23): 4000 = 1 / 0,00025 (volume de líquido em cada retículo); D é a diluição final da amostra; 1000=fator de conversão para mL.

4.2.2 Determinação do Teor Alcoólico

Para a determinação do teor alcoólico nas dornas de fermentação 1 e 4 foram retirados 25 mL das amostras, os quais foram colocados em um microdestilador, onde toda a amostra foi destilada, sendo o produto da destilação analisado num densímetro.

4.2.3 Determinação dos Açúcares Redutores Totais (ART)

O teor de ART representa todos os açúcares da cana na forma de açúcares redutores ou açúcares invertidos. Para a determinação da porcentagem de açúcares

reduzidores totais contidas na amostra, utilizou-se a titulometria de Lane & Eynon, também conhecido como método de Fehling.

4.2.4 Estimação da Concentração Celular

Segundo informação da gerência técnica da produção na usina, não há dados experimentais sobre a concentração celular nas dornas de fermentação. As únicas medidas disponíveis desta variável de estado são a concentração celular na corrente que sai do separador e vai para o tratamento ácido, após o qual é reciclada para a 1ª dorna e a concentração celular na corrente clarificada que segue para a unidade de destilação. A concentração celular é uma variável fundamental na análise cinética de bioprocessos, pois participa das equações de definição das velocidades específicas de crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto. Assim, a medida do número de células ativas descrita no item 4.2.1 foi utilizada para estimar a concentração celular em g/L, tendo em vista que a medida disponível fornece a quantidade de células de leveduras presente em 1 mL e não a massa em gramas neste volume. Estudo realizado pela associação de cervejeiros *Brewers Friends*, concluiu que, em um pacote de levedura seca, há cerca de 8 a 20 bilhões de células por grama, um intervalo bastante amplo. Haddad; Lindegren (1953), descreveram um método experimental para a determinação da densidade e da massa de uma célula individual de levedura e obtiveram valores médios destas grandezas, respectivamente iguais a $1,087 \pm 0,026$ g/mL e $7,922 \times 10^{-11} \pm 3,188 \times 10^{-11}$ g. Assumindo que em 1 grama de leveduras há aproximadamente 10 bilhões de células, foi possível, a partir dos dados anteriores, estabelecer relações apropriadas e estimar a concentração celular no bioprocessos, especificamente nas dornas 1 e 4, obtendo-se valores consistentes desta variável com valores reportados na literatura para processos de fermentação alcoólica em escala industrial similares ao estudado neste trabalho.

4.3 Equações de Balanço de Massa

Na modelagem do processo contínuo em dornas em série, a vazão de entrada da i -ésima dorna é igual à vazão de saída da dorna anterior, indexada como $i-1$, conforme fluxograma simplificado do bioprocessos apresentado na Figura 8.

Baseado neste fluxograma, as equações de balanço de massa em estado estacionário para cada componente nas dornas 2, 3 e 4 podem ser generalizadas na forma das Equações (24) a (26), com $i = 2, 3, 4$:

- **BALANÇO DE MASSA DE CÉLULAS EM ESTADO ESTACIONÁRIO NAS DORNAS 2, 3 e 4 ($i=2,3,4$):**

$$0 = F_{i-1} \cdot X_{i-1} - F_i \cdot X_i + (r_X)_i \cdot V_i ; (r_X)_i = (\mu_X)_i \cdot X_i \cdot V_i \quad (24)$$

- **BALANÇO DE MASSA DE SUBTRATO EM ESTADO ESTACIONÁRIO NAS DORNAS 2, 3 e 4 ($i=2,3,4$):**

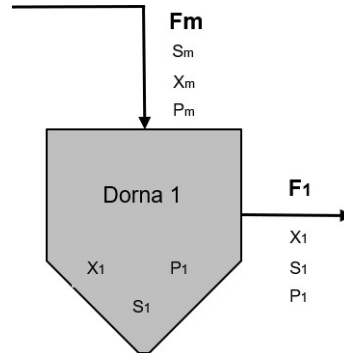
$$0 = F_{i-1} \cdot S_{i-1} - F_i \cdot S_i - (r_S)_i \cdot V_i ; (r_S)_i = (\mu_S)_i \cdot X_i \cdot V_i \quad (25)$$

- **BALANÇO DE MASSA DE PRODUTO EM ESTADO ESTACIONÁRIO NAS DORNAS 2, 3 e 4 ($i=2,3,4$):**

$$0 = F_{i-1} \cdot P_{i-1} - F_i \cdot P_i + (r_P)_i \cdot V_i ; (r_P)_i = (\mu_P)_i \cdot X_i \cdot V_i \quad (26)$$

Para a elaboração dos balanços de massa na 1ª dorna, considera-se o esquema apresentado na Figura 9, obtendo-se as Equações (27) a (29). No Apêndice A, estão apresentadas as equações utilizadas para o cálculo das condições de entrada na dorna 1, isto é, F_m , S_m , X_m e P_m .

Figura 9 – Esquema das correntes de entrada e saída na 1ª dorna de fermentação e respectivas concentrações dos componentes.



Fonte: Autor (2024).

- **BALANÇO DE MASSA DE CÉLULAS NA DORNA 1 EM ESTADO ESTACIONÁRIO:**

$$0 = F_m \cdot X_m - F_1 \cdot X_1 + (r_X)_1 \cdot V_1 ; (r_X)_1 = (\mu_X)_1 \cdot X_1 \cdot V_1 \quad (27)$$

- **BALANÇO DE MASSA DE SUBSTRATO NA DORNA 1 EM ESTADO ESTACIONÁRIO:**

$$0 = F_m \cdot S_m - F_1 \cdot S_1 - (r_S)_1 \cdot V_1 ; (r_S)_1 = (\mu_S)_1 \cdot X_1 \cdot V_1 \quad (28)$$

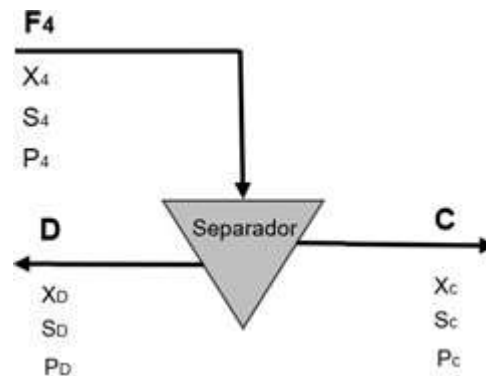
- **BALANÇO DE MASSA DE PRODUTO NA DORNA 1 EM ESTADO ESTACIONÁRIO:**

$$0 = F_m \cdot P_m - F_1 \cdot P_1 + (r_P)_1 \cdot V_1 ; (r_P)_1 = (\mu_P)_1 \cdot X_1 \cdot V_1 \quad (29)$$

O meio fermentado continuamente retirado da 4ª dorna é direcionado a um separador, onde a corrente de alimentação é dividida em duas correntes, uma clarificada (C), praticamente isenta de células, a qual é encaminhada à unidade de destilação para separação e recuperação do etanol e outra densa (D), constituída majoritariamente de biomassa, a qual é destinada à unidade de tratamento ácido (cuba) e posteriormente reciclada para a 1ª dorna. A razão entre a vazão de reciclo (F_r) e a vazão volumétrica de alimentação do sistema F_0 empregada no processo foi de 50%, resultando numa razão de reciclo (RR) de 0,5, isto é, $RR=F_r/F_0=0,5$.

Na Figura 10 é apresentado um esquema do separador de biomassa e nas Equações (30) a (32), estão apresentadas as equações correspondentes aos balanços de massa dos principais componentes nesta unidade.

Figura 10 – Esquema do separador de biomassa com suas correntes de entrada e saída e respectivas concentrações dos componentes.



Fonte: Autor (2024).

• **BALANÇO DE MASSA DE CÉLULAS NO SEPARADOR EM ESTADO ESTACIONÁRIO:**

$$0 = F_4 \cdot X_4 - D \cdot X_D - C \cdot X_C \quad (30)$$

• **BALANÇO DE MASSA DE SUBSTRATO NO SEPARADOR EM ESTADO ESTACIONÁRIO:**

$$0 = F_4 \cdot S_4 - D \cdot S_D - C \cdot S_C \quad (31)$$

• **BALANÇO DE MASSA DE PRODUTO NO SEPARADOR EM ESTADO ESTACIONÁRIO:**

$$0 = F_4 \cdot P_4 - D \cdot P_D - C \cdot P_C \quad (32)$$

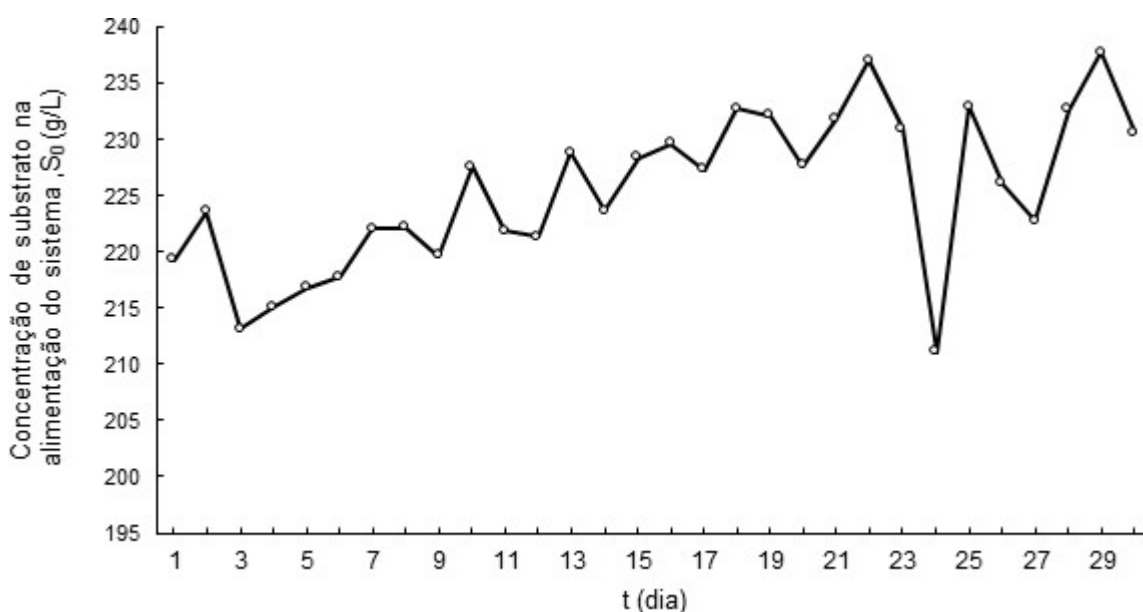
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Dados Experimentais

5.1.1 Concentração de Substrato na Alimentação

Na Figura 11 pode-se observar os valores diários da concentração de substrato (açúcares) na corrente de alimentação do sistema de fermentação, a qual variou entre 211 e 238 g/L de ART mesmo em se tratando de um sistema contínuo, pois é normal ocorrerem variações na composição do caldo, uma vez que a composição da cana-de-açúcar pode variar dependendo da variedade da cana, do solo onde foi plantada, do período e método (manual ou mecânico) de colheita.

Figura 11 – Concentração de substrato diária na corrente de alimentação do sistema de fermentação (S_0).



Fonte: Autor (2024).

Com relação à quantidade de substrato consumida nas dornas, observa-se na Tabela 2 que há um expressivo consumo de substrato na 1ª dorna, seguido de menores consumos nas dornas subsequentes, resultando num consumo global quase completo do substrato no sistema de fermentação. Isso é o que se espera de um microrganismo produtor, que ele apresente elevada conversão da matéria-prima, pois

o custo desta pode representar de 38 a 73% do custo total de produção, não se permitindo residuais altos de substrato com vistas à economicidade do bioprocesso.

Tabela 2 – Valores diários de vazão volumétrica e concentração de substrato em algumas correntes do bioprocesso e concentração de substrato nas saídas das dornas

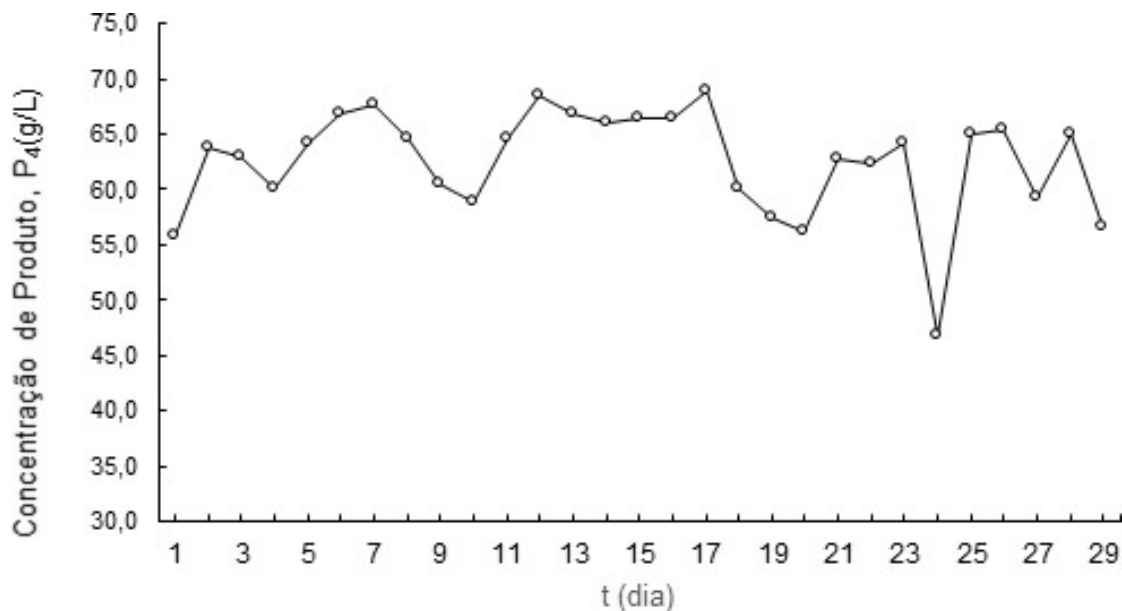
t (dia)	F_0 (m ³ /h)	F_m (m ³ /h)	S_0 (g/L)	S_m (g/L)	S_1 (g/L)	S_2 (g/L)	S_3 (g/L)	S_4 (g/L)
1	126	189	219,33	109,66	54,27	16,28	5,36	4,77
2	105	158	223,57	111,78	39,53	14,94	5,32	3,69
3	99	149	213,14	106,57	23,84	7,13	3,46	3,05
4	126	189	215,15	107,58	9,98	4,24	3,21	3,38
5	105	158	216,84	108,42	15,74	4,02	3,64	3,21
6	107	161	217,80	108,90	11,39	4,48	3,22	3,35
7	111	167	222,10	111,05	17,02	3,71	3,15	2,95
8	108	162	222,15	111,08	19,68	4,18	4,05	3,41
9	127	191	219,67	109,83	26,96	3,41	3,31	3,03
10	113	170	227,60	113,80	39,63	3,54	2,79	3,76
11	116	174	221,93	110,96	23,23	4,24	3,27	3,03
12	124	186	221,33	110,66	39,07	3,33	2,54	3,34
13	113	170	228,85	114,43	39,43	3,36	3,25	3,55
14	112	168	223,71	111,85	24,44	2,60	2,41	3,01
15	121	182	228,38	114,19	6,46	3,06	2,64	3,22
16	116	174	229,64	114,82	20,48	3,43	2,61	2,74
17	109	164	227,31	113,65	25,29	2,12	1,95	2,05
18	109	164	232,75	116,38	16,68	3,40	2,76	2,67
19	113	170	232,15	116,08	24,27	3,35	3,15	2,76
20	112	168	227,73	113,86	24,47	2,51	2,34	2,78
21	115	173	231,88	115,94	33,64	2,50	2,17	2,63
22	104	156	237,00	118,50	39,65	3,09	2,60	2,81
23	108	162	230,97	115,48	23,88	3,19	3,04	3,20
24	119	179	211,10	105,55	33,34	2,40	2,04	2,15
25	103	155	232,98	116,49	33,95	2,71	2,54	2,51
26	111	167	226,03	113,02	43,87	3,23	2,74	2,69
27	97	146	222,80	111,40	22,26	3,27	3,12	2,88
28	93	140	232,65	116,33	14,77	3,19	3,09	3,02
29	108	162	237,80	118,90	25,05	3,02	2,74	2,76
30	105	158	230,62	115,31	23,32	3,01	3,15	2,70

Fonte: Autor (2024).

5.1.2 Concentração de Produto

Na Figura 12 está apresentado o comportamento da concentração de etanol diária na corrente de saída da 4ª dorna, a qual é igual à concentração na saída do sistema (P_4), podendo-se verificar que houve variações nos valores desta variável, as quais foram, muito provavelmente, decorrentes das variações na concentração de substrato na alimentação, com reflexos diretos na concentração de etanol produzido.

Figura 12 – Concentração de produto diária na saída da 4ª dorna (P_4).



Fonte: Autor (2024).

Os valores dos fatores de rendimento de produto por substrato consumido ($Y_{P/S}$), de produto por biomassa formada ($Y_{P/X}$) e de biomassa formada por substrato consumido ($Y_{X/S}$) foram calculados a partir de macrobalanços, de acordo com as Equações (5.1), (5.2) e (5.3), obtendo-se os dados apresentados na Tabela 2.

$$Y_{P/S} = \frac{(P_4 - P_m)}{(S_m - S_4)} \quad (33)$$

$$Y_{P/X} = \frac{(P_4 - P_m)}{(X_4 - X_m)} \quad (34)$$

$$Y_{X/S} = \frac{(X_4 - X_m)}{(S_m - S_4)} \quad (35)$$

Com relação a $Y_{P/S}$, verifica-se que os fatores calculados resultaram em um valor médio de 0,47 g/g, correspondente a 92% do valor estequiométrico de 0,511 g/g, podendo a diferença em relação a 100 % ser explicada por desvios do uso de substrato para outras finalidades tais como crescimento celular, formação de subprodutos e geração de energia para manutenção. No cálculo do valor médio de $Y_{P/S}$ foram desprezados os valores iguais ou superiores a 0,511 g/g, pois, como é sabido, não é possível atingir rendimentos iguais ao máximo ou superior a ele porque desvios metabólicos podem ocorrer. Segundo Schimidell (2001), leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são normalmente utilizadas em fermentações alcoólicas, permitindo obter rendimentos em etanol frequentemente da ordem de 90% do valor estequiométrico, o que torna estas leveduras os microrganismos mais indicados para realizarem essa bioconversão, apesar de vários outros microrganismos produzirem etanol, a partir de glicose, porém, não com um rendimento tão elevado. Este aspecto tem grande importância econômica, pois a matéria-prima neste caso representa em torno de 60% do custo do etanol e, desta forma, rendimentos insuficientes tornam inviável economicamente a produção deste produto, o qual tem baixo valor agregado, sendo sua rentabilidade fortemente dependente de altos volumes de produção e comercialização. Sempre é desejável que o microrganismo permita um elevado acúmulo de produto no meio, sem, entretanto, sofrer inibição mais acentuada por esta maior concentração de produto acumulada no meio. Uma maior acumulação de produto contribui para uma redução nos custos de recuperação, os quais também podem ser muito acentuados.

Tabela 3 – Valores diários da concentração de substrato, etanol e biomassa em alguns pontos principais do sistema de fermentação e fatores aparentes de conversão.

t (dia)	S_m (g/L)	S_4 (g/L)	P_m (g/L)	P_4 (g/L)	X_m (g/L)	X_4 (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{P/X}$ (g/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)
1	109,66	4,77	20,59	70,01	48,40	49,34	0,47	52,77	0,009
2	111,78	3,69	20,22	75,81	27,45	30,93	0,51	15,97	0,032
3	106,57	3,05	19,48	76,98	47,68	56,61	0,56	6,44	0,086
4	107,58	3,38	20,13	73,87	63,55	70,22	0,52	8,05	0,064
5	108,42	3,21	19,12	68,84	52,25	56,65	0,47	11,31	0,042
6	108,90	3,35	20,13	73,84	49,95	55,11	0,51	10,41	0,049
7	111,05	2,95	18,08	69,61	65,81	76,13	0,48	5,00	0,095
8	111,08	3,41	19,38	74,24	74,41	85,45	0,51	4,97	0,103
9	109,83	3,03	15,88	73,10	58,75	80,97	0,54	2,57	0,208
10	113,80	3,76	17,73	71,16	75,95	91,38	0,49	3,46	0,140
11	110,96	3,03	17,54	73,07	70,14	87,81	0,51	3,14	0,164
12	110,66	3,34	19,76	75,01	75,05	85,77	0,51	5,15	0,100
13	114,43	3,55	18,46	74,61	43,36	52,63	0,51	6,06	0,084
14	111,85	3,01	16,44	72,67	64,16	84,92	0,52	2,71	0,191
15	114,19	3,22	16,17	71,55	55,23	73,53	0,50	3,03	0,165
16	114,82	2,74	17,00	73,10	56,31	72,38	0,50	3,49	0,143
17	113,65	2,05	17,54	71,18	44,85	54,38	0,48	5,63	0,085
18	116,38	2,67	17,99	69,59	60,66	70,14	0,45	5,44	0,083
19	116,08	2,76	16,25	69,98	43,61	56,47	0,47	4,18	0,113
20	113,86	2,78	15,61	67,30	48,37	62,73	0,47	3,60	0,129
21	115,94	2,63	16,35	70,78	48,06	62,27	0,48	3,83	0,125
22	118,50	2,81	17,63	71,16	65,53	79,25	0,46	3,90	0,119
23	115,48	3,20	16,53	71,55	56,65	73,84	0,49	3,20	0,153
24	105,55	2,15	16,63	63,07	63,38	72,25	0,45	5,24	0,086
25	116,49	2,51	18,55	71,16	46,95	53,90	0,46	7,57	0,061
26	113,02	2,69	20,31	71,93	92,70	98,13	0,47	9,50	0,049
27	111,40	2,88	20,32	69,21	70,99	72,25	0,45	38,92	0,012
28	116,33	3,02	16,99	71,53	56,57	71,33	0,48	3,70	0,130
29	118,90	2,76	19,29	73,44	42,35	48,30	0,47	9,10	0,051
30	115,31	2,70	17,92	65,76	55,11	60,81	0,42	8,39	0,051

Fonte: Autor (2024).

Quanto à $Y_{P/X}$, alguns valores deste coeficiente apresentaram-se muito acima daqueles reportados por Kollerup e Daugulis (1985), Lee (1985), e Oliveira *et al.* (2016), os quais obtiveram valores de $Y_{P/X}$ entre 2,50 e 6,25 g/g. Descartando-se os valores deste coeficiente fora do intervalo mencionado, obteve-se um valor médio de $Y_{P/X}$ igual a 5,02 g/g, que é um valor consistente com aqueles reportados na literatura.

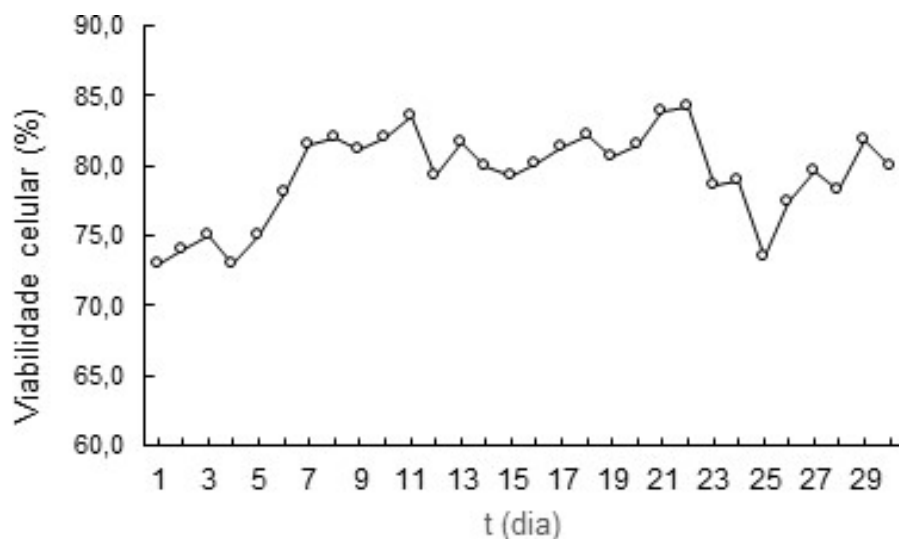
O valor médio de $Y_{X/S}$ foi 0,1 g/g, similar a alguns valores encontrados na literatura, sendo típico de processos de fermentação alcoólica, os quais ocorrem em condições quase anaeróbias, predominando majoritariamente um metabolismo fermentativo em detrimento do respiratório, com reduzido crescimento celular.

5.1.3 Viabilidade Celular

Na abordagem não segregada, a população celular é considerada homogênea, ou seja, todas as células apresentam o mesmo comportamento, não havendo distinção entre elas quanto a nenhum aspecto. Entretanto, sabe-se que em fermentações alcoólicas, fatores tais como altas concentrações de células e de etanol, microaeração insuficiente, estresses estérico e nutricional, além de contaminação, podem acarretar perda de viabilidade celular de parte da população microbiana, com consequente inativação de células e diminuição de produtividade.

Analisando-se a Figura 13, na qual está apresentado o percentual de células viáveis na 1ª dorna do sistema de fermentação, verifica-se que altos níveis de viabilidade celular foram observados nesta dorna, o que conferiu alta atividade à população microbiana e acarretou um expressivo consumo de substrato em tal dorna.

Figura 13 – Porcentagem de células viáveis na 1ª dorna do sistema de fermentação.

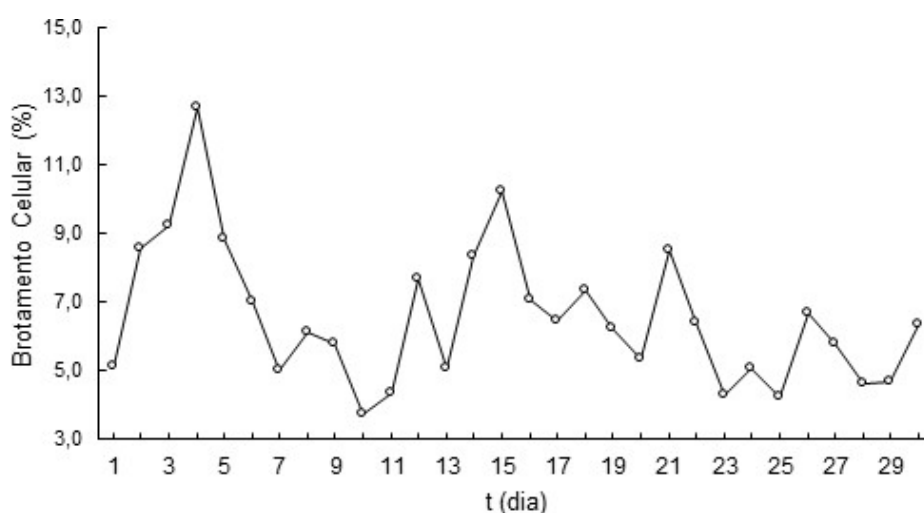


Fonte: Autor (2024).

5.1.4 Brotamento Celular

Na Figura 14 está apresentado o comportamento do percentual de brotamento celular na 1ª dorna do sistema de fermentação. O percentual de brotamento é uma medida indireta do crescimento da biomassa, estando as variações neste parâmetro relacionadas de alguma forma às variações de concentração celular. Observa-se que, desprezando alguns valores discrepantes para mais e para menos, o valor do percentual de brotamento, oscilou moderadamente em torno de 7%.

Figura 14 – Porcentagem de brotamento celular na 1ª dorna de fermentação.



Fonte: Autor (2024).

5.2 Concepção do Modelo Matemático do Bioprocesso

Em se desenvolvendo um modelo matemático para um determinado sistema, uma etapa preliminar à formulação das equações matemáticas representativas do modelo é a fase de concepção do modelo, a qual consiste na enumeração de diversos aspectos e características importantes do sistema para fins de modelagem, informações da literatura e hipóteses simplificadoras, visando fundamentar o modelo a ser proposto, conforme realizado a seguir.

O desenvolvimento do modelo matemático do processo baseou-se na análise dos dados experimentais apresentada anteriormente, bem como em eventos frequentemente observados em fermentações alcoólicas como a inibição por etanol, que se inicia a partir de 8 a 10% em volume de etanol no meio, cerca de 64 a 80 g/L no vinho fermentado. Além disso, a consideração de possível inibição por etanol é

devido a este produto ser reportado na literatura como um inibidor não competitivo tanto do crescimento quanto da sua própria produção (Bu'lock *et al.* 1984; Ghose, Tyagi 1979; Bazua, Wilke, 1977; Novak *et al.*, 1981; Aiba *et al.* 1968; Aiba; Shoda 1969). Segundo Bonomi *et al* (1981), uma das maiores dificuldades durante o desenvolvimento de um modelo matemático que ajusta dados experimentais de fermentação alcoólica é identificar a expressão, dentre várias possíveis, que melhor descreve o efeito de inibição do etanol sobre o metabolismo da levedura.

Neste trabalho, as velocidades específicas de crescimento celular (μ_X) e formação de produto (μ_P) poderiam ser descritas por equações independentes, o que, devido à necessidade de discriminação entre os 5 modelos rivais de inibição vistos anteriormente, iria requerer a realização de 25 ajustes do modelo global do bioprocessamento, sendo este número correspondente ao número de combinações de expressões de $g_1(P)$ e $g_2(P)$ possíveis para descrever o efeito inibitório do etanol sobre μ_X e μ_P . Entretanto, optou-se por correlacionar μ_P a μ_X pela equação generalizada de Luedeking e Piret, representando a velocidade específica de formação de produto por $\mu_P = \alpha\mu_X + \beta$, com $\alpha > 0$ e $\beta = 0$, pois este é o caso de metabólitos primários, formados simultaneamente à fase de crescimento celular, como é a produção de etanol em leveduras. Esta opção visou reduzir o esforço computacional a ser empreendido, pois apenas 5 e não 25 ajustes do modelo global do bioprocessamento teriam que ser realizados, além de ter que estimar um menor número de parâmetros cinéticos referente à μ_P .

Outro aspecto a ser discutido é a consideração ou não da perda de viabilidade celular na análise cinética do bioprocessamento, uma vez que, segundo Oliveira (2000), apesar de esta perda ser reportada por vários autores, ela é pouco considerada na modelagem do processo. Jarzebski *et al* (1989) estudaram um sistema contínuo de fermentação alcoólica composto por um reator de mistura perfeita e um filtro de membrana para separação e reciclo de células para o reator. Os autores compararam as previsões de um modelo denominado de convencional, no qual não se considerava a perda de viabilidade celular, com as previsões de dois modelos modificados nos quais esta perda era considerada, sendo em um deles, utilizadas concentrações intrínsecas de substrato e etanol nas suas respectivas equações de balanço de massa, conforme sugerido por Monbouquette (1987), para levar em conta a significativa fração volumétrica ocupada pela biomassa em processos com altas

densidades celulares, tais como aqueles com reciclo celular. Concluíram que o modelo convencional se mostrou inadequado para representar satisfatoriamente o bioprocesso a altas densidades celulares e que as previsões fornecidas pelos dois modelos modificados foram semelhantes, credenciando-os, indistintamente, a serem utilizados em estudos de análise e simulação do processo.

Oliveira (2000), estudando um processo contínuo de fermentação alcoólica em reator tipo torre com reciclo de leveduras floculantes, comparou as previsões de um modelo convencional, no qual a viabilidade celular não era considerada, com as previsões de um modelo modificado, no qual esta variável era considerada, e concluiu que ambos os modelos apresentavam previsões similares das variáveis de estado para todos os ensaios realizados, estando as diferenças entre as previsões dos modelos, dentro do erro experimental das medidas. Devido à indisponibilidade de dados experimentais de viabilidade, Oliveira (2000) inferiu, via modelo modificado, que a viabilidade celular tinha sido aproximadamente a mesma em todos os ensaios de fermentação, sendo seu valor médio de $69 \pm 6\%$ e destacou que uma melhor descrição do processo fermentativo é sempre esperada quando o modelo modificado é usado, principalmente, naqueles casos em que a viabilidade celular é baixa.

Lafforgue-Delorme *et al.* (1994), estudando um sistema semelhante ao de Jarzebski *et al.* (1989), destacaram a necessidade de se considerar outros fatores na modelagem do bioprocesso, incluindo o estado fisiológico das leveduras (viabilidade celular). Os autores consideraram as previsões do modelo satisfatórias quando comparadas com os dados experimentais obtidos em operações do reator com reciclo parcial e total de biomassa.

Facciotti e Schmidell (1995), analisaram a cinética de bioprocessos contínuos considerando o fenômeno de perda de viabilidade celular e estabeleceram o conceito de “viabilidade celular mínima”, avaliando as consequências no projeto e operação de Reatores de Tanque Agitado Contínuos (CSTRs) sem e com reciclo de microrganismos em cultivos cuja cinética de crescimento celular era descrita pelo modelo de Monod. Segundo os autores, viabilidade celular mínima é o valor mínimo de viabilidade que a população microbiana deve apresentar para que um estado estacionário diferente do de lavagem possa ser atingido e mantido estável.

Hojo *et al.* (1999), estudando a produção de etanol por leveduras floculantes em um CSTR sem e com reciclo de células, concluíram que a consideração da viabilidade celular foi de fundamental importância para o estabelecimento do modelo cinético do

processo com reciclo e que a morte celular é um fator que deve ser considerado em fermentações contínuas prolongadas, com altos tempos de residência hidráulico.

Nos trabalhos relatados anteriormente, considerou-se que a população microbiana era constituída somente por células viáveis e não viáveis, sendo estas últimas incapazes de crescerem e produzirem o produto desejado. Apesar de inativas em ambos os processos, as células não viáveis foram consideradas íntegras, isto é, não sofreram lise celular. Para Borzani (1986), quando se pretende realizar uma abordagem deste gênero, a segregação deve considerar as células ativas e inativas no processo de crescimento e as células ativas e inativas no processo de produção, argumentando que uma célula considerada ativa num processo pode não ser ativa no outro e vice-versa. Apesar de bastante realista, esta abordagem é pouco aplicável dada a enorme dificuldade experimental de se quantificar separadamente cada grupo de células participante em cada processo.

A diferenciação de células em células viáveis e não viáveis consiste na forma mais básica e simples de segregação da população microbiana e, em se adotando esta abordagem, equações de balanço de massa para células viáveis e não viáveis devem ser elaboradas separadamente. As equações de balanço de massa de etanol e substrato são semelhantes às da abordagem convencional não segregada com as devidas modificações em μ_X , μ_P e μ_S , as quais devem ser definidas com base na concentração de células viáveis que são as células efetivamente ativas no bioprocessos, assim como, do mesmo modo, deve-se definir e incluir na descrição, a velocidade específica de transformação de células viáveis em não viáveis ou de morte celular.

A maioria dos modelos na literatura descreve a taxa de crescimento (r_X) como uma função linear da concentração celular quando esta varia de 5 a 10g/L em fermentadores convencionais Lee (1985). Entretanto, é bem conhecido que o uso de reciclo de leveduras leva à obtenção de altas concentrações celulares no fermentador, chegando a ser 10 a 20 vezes maior que aquelas em fermentadores convencionais Lee (1985), o que torna a relação linear inadequada nestes casos, sendo recomendado incluir em μ_X um termo generalizado $h(X)=(1-X/X_m)^m$, análogo ao termo $g(P)$ de inibição pelo produto, para descrever o efeito inibitório da própria biomassa sobre o crescimento celular, na qual m é um parâmetro modulador da intensidade desta inibição, segundo Lee (1985).

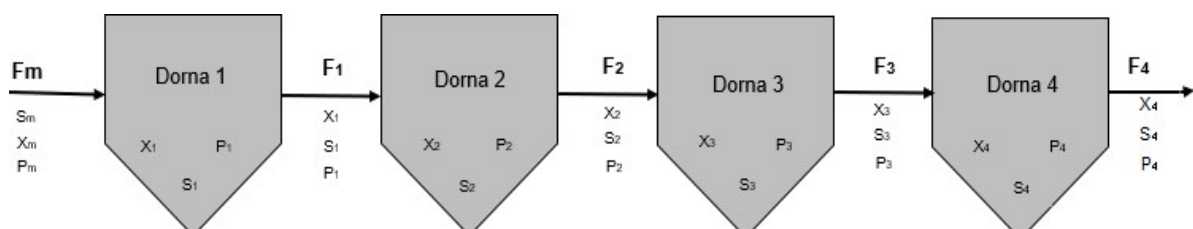
Além de todos os aspectos, características, informações e considerações apresentadas anteriormente, as seguintes hipóteses completaram a concepção do modelo matemático do bioprocesso:

- devido à mistura completa promovida pela evolução de gás CO_2 produzido no bioprocesso, o comportamento hidrodinâmico das dornas de fermentação é de CSTR;
- devido à concentração de açúcares residuais não ter atingido níveis elevados nas dornas de fermentação, não foi necessário incluir um efeito de inibição pelo substrato no modelo do bioprocesso;
- devido aos níveis de concentração de leveduras estimados para o bioprocesso, um efeito de inibição pela própria biomassa foi considerado na modelagem do processo, incluindo-se o termo $h(X)=(1-X/X_m)^m$ na expressão de μ_X ;
- a velocidade específica de consumo de substrato (μ_S) foi correlacionada com a velocidade específica de formação de produto (μ_P) por meio do coeficiente aparente de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), isto é, $\mu_S = \mu_P/Y_{P/S}$;
- devido aos elevados níveis de viabilidade celular observados diariamente, entre 70 e 85%, uma abordagem não segregada foi usada para descrever a população microbiana, isto é, todas as células foram consideradas viáveis, estando ativas tanto no processo de crescimento celular quanto no processo de produção de etanol.

5.3 Formulação do Modelo Matemático

Para a formulação do modelo matemático, o fluxograma do bioprocesso apresentado na Figura 8 foi adaptado conforme mostrado na Figura 15.

Figura 15 – Fluxograma adaptado do bioprocesso para fins de formulação do modelo matemático.



Fonte: Autor (2024).

Com relação à disponibilidade de dados experimentais de concentração, estes estão compilados na Tabela 4, na qual pode-se observar que estão disponíveis dados das 3 variáveis de estado modeladas apenas nas dornas 1 e 4 enquanto, nas dornas intermediárias 2 e 3, só estão disponíveis dados de concentração de substrato, o que requereu uma estratégia apropriada para a estimação dos parâmetros cinéticos e para calcular as concentrações de células, etanol e substrato nas quatro dornas.

Tabela 4 – Compilação dos dados de concentração de substrato, células e etanol disponíveis para a estimação dos parâmetros cinéticos e a avaliação do ajuste do modelo.

t (dia)	F_m (m ³ /h)	S_m (g/L)	X_m (g/L)	P_m (g/L)	S_1 (g/L)	X_1 (g/L)	P_1 (g/L)	S_2 (g/L)	S_3 (g/L)	S_4 (g/L)	X_4 (g/L)	P_4 (g/L)
1	189	109,66	48,40	20,59	54,27	44,49	55,83	16,28	5,36	4,77	49,34	70,01
2	158	111,78	27,45	20,22	39,53	67,94	63,84	14,94	5,32	3,69	30,93	75,81
3	149	106,57	47,68	19,48	23,84	61,89	63,04	7,13	3,46	3,05	56,61	76,98
4	189	107,58	63,55	20,13	9,98	63,44	60,04	4,24	3,21	3,38	70,22	73,87
5	158	108,42	52,25	19,12	15,74	68,81	64,19	4,02	3,64	3,21	56,65	68,84
6	161	108,90	49,95	20,13	11,39	69,17	66,93	4,48	3,22	3,35	55,11	73,84
7	167	111,05	65,81	18,08	17,02	63,44	67,70	3,71	3,15	2,95	76,13	69,61
8	162	111,08	74,41	19,38	19,68	68,81	64,61	4,18	4,05	3,41	85,45	74,24
9	191	109,83	58,75	15,88	26,96	82,57	60,41	3,41	3,31	3,03	80,97	73,10
10	170	113,80	75,95	17,73	39,63	86,09	58,92	3,54	2,79	3,76	91,38	71,16
11	174	110,96	70,14	17,54	23,23	86,51	64,58	4,24	3,27	3,03	87,81	73,07
12	186	110,66	75,05	19,76	39,07	71,05	68,44	3,33	2,54	3,34	85,77	75,01
13	170	114,43	43,36	18,46	39,43	74,11	66,90	3,36	3,25	3,55	52,63	74,61
14	168	111,85	64,16	16,44	24,44	82,76	66,13	2,60	2,41	3,01	84,92	72,67
15	182	114,19	55,23	16,17	6,46	85,64	66,50	3,06	2,64	3,22	73,53	71,55
16	174	114,82	56,31	17,00	20,48	77,69	66,50	3,43	2,61	2,74	72,38	73,10
17	164	113,65	44,85	17,54	25,29	52,35	68,84	2,12	1,95	2,05	54,38	71,18
18	164	116,38	60,66	17,99	16,68	69,49	60,04	3,40	2,76	2,67	70,14	69,59
19	170	116,08	43,61	16,25	24,27	57,50	57,35	3,35	3,15	2,76	56,47	69,98
20	168	113,86	48,37	15,61	24,47	72,01	56,21	2,51	2,34	2,78	62,73	67,30
21	173	115,94	48,06	16,35	33,64	64,31	62,70	2,50	2,17	2,63	62,27	70,78
22	156	118,50	65,53	17,63	39,65	85,82	62,30	3,09	2,60	2,81	79,25	71,16
23	162	115,48	56,65	16,53	23,88	76,16	64,21	3,19	3,04	3,20	73,84	71,55
24	179	105,55	63,38	16,63	33,34	50,19	46,79	2,40	2,04	2,15	72,25	63,07
25	155	116,49	46,95	18,55	33,95	48,26	64,98	2,71	2,54	2,51	53,90	71,16
26	167	113,02	92,70	20,31	43,87	58,56	65,36	3,23	2,74	2,69	98,13	71,93
27	146	111,40	70,99	20,32	22,26	83,09	59,26	3,27	3,12	2,88	72,25	69,21
28	140	116,33	56,57	16,99	14,77	87,37	65,76	3,19	3,09	3,02	71,33	71,53
29	162	118,90	42,35	19,29	25,05	74,11	64,98	3,02	2,74	2,76	48,30	73,44
30	158	115,31	55,11	17,92	23,32	75,53	56,55	3,01	3,15	2,70	60,81	65,76

Fonte: Autor (2024).

A estratégia para estimar os parâmetros cinéticos consistiu em utilizar os dados de concentração de substrato, células e etanol na 1ª dorna. Em seguida, admitiu-se que os valores dos coeficientes de rendimento $Y_{P/S}$ e $Y_{P/X}$ eram igualmente válidos em todas as dornas, o que permitiu calcular os valores das concentrações de produto, células e substrato nas dornas 2, 3 e 4 por meio destes coeficientes, conforme as Equações 36 a 41, apresentadas a seguir:

$$P_{2_{calc.}} = P_{1_{calc.}} + Y_{P/S} (S_{1_{calc.}} - S_{2_{exp.}}) \quad (36)$$

$$X_{2_{calc.}} = X_{1_{calc.}} + \frac{1}{Y_{P/X}} (P_{2_{calc.}} - P_{1_{calc.}}) \quad (37)$$

$$P_{3_{calc.}} = P_{2_{calc.}} + Y_{P/S} (S_{2_{exp.}} - S_{3_{exp.}}) \quad (38)$$

$$X_{3_{calc.}} = X_{2_{calc.}} + \frac{1}{Y_{P/X}} (P_{3_{calc.}} - P_{2_{calc.}}) \quad (39)$$

$$P_{4_{calc.}} = P_{3_{calc.}} + Y_{P/S} (S_{3_{exp.}} - S_{4_{exp.}}) \quad (40)$$

$$X_{4_{calc.}} = X_{3_{calc.}} + \frac{1}{Y_{P/X}} (P_{4_{calc.}} - P_{3_{calc.}}) \quad (41)$$

Os valores de $S_{1_{calc.}}$, $X_{1_{calc.}}$ e $P_{1_{calc.}}$ foram obtidos quando da estimação dos parâmetros cinéticos pelo ajuste do modelo aos dados experimentais de concentração de substrato, células e produto (etanol) na 1ª dorna enquanto que $S_{2_{exp.}}$ e $S_{3_{exp.}}$ são graus de liberdade do sistema.

5.4 Estimação dos Parâmetros Cinéticos

Devido à necessidade de discriminação entre 5 expressões para descrever o efeito inibitório do etanol sobre μ_X , 5 ajustes do modelo global do processo foram realizados, correspondendo este número às expressões de $g(P)$ testadas (Linear (L), Não Linear Generalizada (NG), Hiperbólica (H), Parabólica (P) e Exponencial (E)).

Bonomi (1994) destaca que um aspecto fundamental na estimação de parâmetros de bioprocessos por regressão não linear é a forma de calcular os resíduos entre os valores calculados pelo modelo e os valores experimentais e apresenta várias formas de cálculo dos resíduos, visando à normalização dos mesmos.

A normalização dos resíduos tem sido empregada por vários autores para estimar parâmetros cinéticos de diferentes modelos matemáticos de bioprocessos,

sendo sua aplicação recomendável naqueles casos em que haja significativas diferenças entre as ordens de grandeza dos valores das variáveis dependentes (X , S e P), evitando-se favorecer o ajuste daquelas com maiores valores absolutos.

Analisando-se os dados de S_1 , X_1 e P_1 apresentados na Tabela 4, os quais foram os dados utilizados na estimação dos parâmetros, verifica-se que os valores destas concentrações variam em um intervalo cuja ordem de grandeza é de dezenas de g/L, não sendo necessária no caso, a normalização dos resíduos. Apesar de a normalização ser potencialmente útil na estimação de parâmetros de modelos multi-resposta, salienta-se que este procedimento altera o valor real da soma dos quadrados dos resíduos (ϕ) e conseqüentemente dos valores dos desvios-padrão das estimativas dos parâmetros, dificultando uma interpretação clara destes desvios.

Assim, a estimação dos parâmetros cinéticos do modelo foi realizada por regressão não linear, utilizando-se o método de Marquardt para determinar iterativamente os valores ótimos dos parâmetros que minimizassem a função ϕ , dada pela Equação (42), a partir de estimativas iniciais dos parâmetros extraídas da literatura (OLIVEIRA, 2000):

$$\phi = \sum_{i=1}^{n_e} \left(\frac{S_{exp,i} - S_{calc,i}}{S_{calc,i}} \right)^2 + \sum_{i=1}^{n_e} \left(\frac{P_{exp,i} - P_{calc,i}}{P_{calc,i}} \right)^2 + \sum_{i=1}^{n_e} \left(\frac{X_{exp,i} - X_{calc,i}}{X_{calc,i}} \right)^2 \quad (42)$$

Na Equação (42), i é o número do experimento, correspondente a cada dia de operação (1^0 , 2^0 , 3^0 , ..., 30^0 dia), n_e é o número total de experimentos ($n_e=30$) e os subscritos exp,i e $calc,i$ representam os valores experimental e calculado da concentração de açúcares residuais, etanol e células no experimento i .

Os valores das variáveis dependentes para um particular conjunto de valores de parâmetros cinéticos e variáveis independentes foram calculados pelo método do “falso transiente” o qual tem-se mostrado eficaz, não apresentando as dificuldades de convergência dos métodos clássicos de solução de sistemas de equações algébricas não lineares devido a estimativas iniciais inapropriadas das raízes Seidel (1990), e consistiu, primeiramente, em formular as equações de balanço de massa em estado transiente, resultando em equações diferenciais ordinárias que, secundariamente, foram integradas numericamente pelo método de Runge-Kutta-Gill de 4ª ordem com passo variável, até o estado estacionário ser atingido para uma dada condição operacional do sistema contínuo.

A discriminação entre os modelos rivais de inibição pelo produto foi realizada e a expressão de $g(P)$ que forneceu o menor valor para ϕ foi a Não Linear Generalizada

(NLG), obtendo-se os valores e desvios-padrão dos parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 5. Analisando-se os dados desta tabela, pode-se observar que os valores estimados representam valores típicos de parâmetros cinéticos em fermentação alcoólica Oliveira (2000). Além disso, observa-se que, com exceção de K_S e n , demais parâmetros do modelo são estimados com boa precisão, pois os valores dos desvios-padrão de suas estimativas são pequenos quando comparados aos respectivos valores dos próprios parâmetros.

Tabela 5 – Valores e desvios-padrão dos parâmetros cinéticos do modelo proposto.

PARÂMETRO CINÉTICO	VALOR $\pm$ DESVIO-PADRÃO
μ_{max} (h^{-1})	$0,48 \pm 0,02$
K_S (g/L)	$0,83 \pm 0,48$
$P_{máx}$ (g/L)	$59,52 \pm 0,90$
n (-)	$0,39 \pm 0,22$
$X_{máx}$ (g/L)	$104,82 \pm 7,33$
m (-)	$0,30 \pm 0,01$

Fonte: Autor (2024).

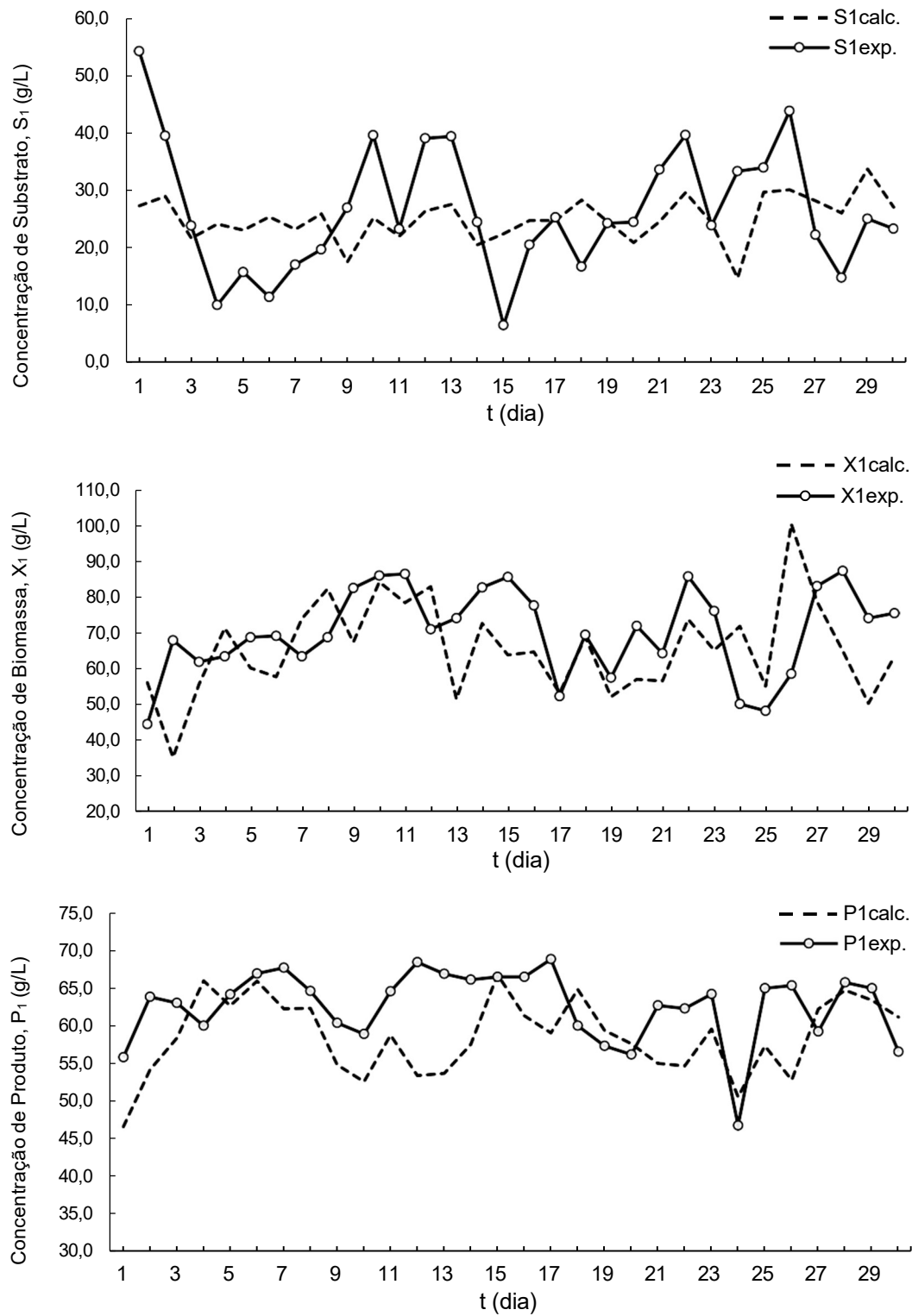
A expressão cinética $\mu_x = \frac{\mu_{max} S}{K_S + S} \left(1 - \frac{P}{P_{máx}} \right)^n \left(1 - \frac{X}{X_{máx}} \right)^n$, determinada como a

melhor para representar os dados, tem sido usada por vários autores para ajustar dados de diversos processos de fermentação alcoólica, inclusive dados de usinas alcooleiras para os quais é necessário incorporar à esta expressão cinética um fator de inibição pelo substrato, a qual geralmente ocorre em dornas industriais, principalmente, quando são utilizados meios à base de melaço Eliodório (2024).

5.5 Verificação da Qualidade do Ajuste do Modelo aos Dados Experimentais

Na Figura 16 está apresentado o gráfico do ajuste do modelo aos dados experimentais de concentração de substrato, etanol e biomassa na 1ª dorna de fermentação, a partir do qual pode-se observar que o modelo proposto descreve satisfatoriamente a tendência de comportamento das três variáveis modeladas.

Figura 16 – Ajuste do modelo aos dados experimentais da dorna 1.

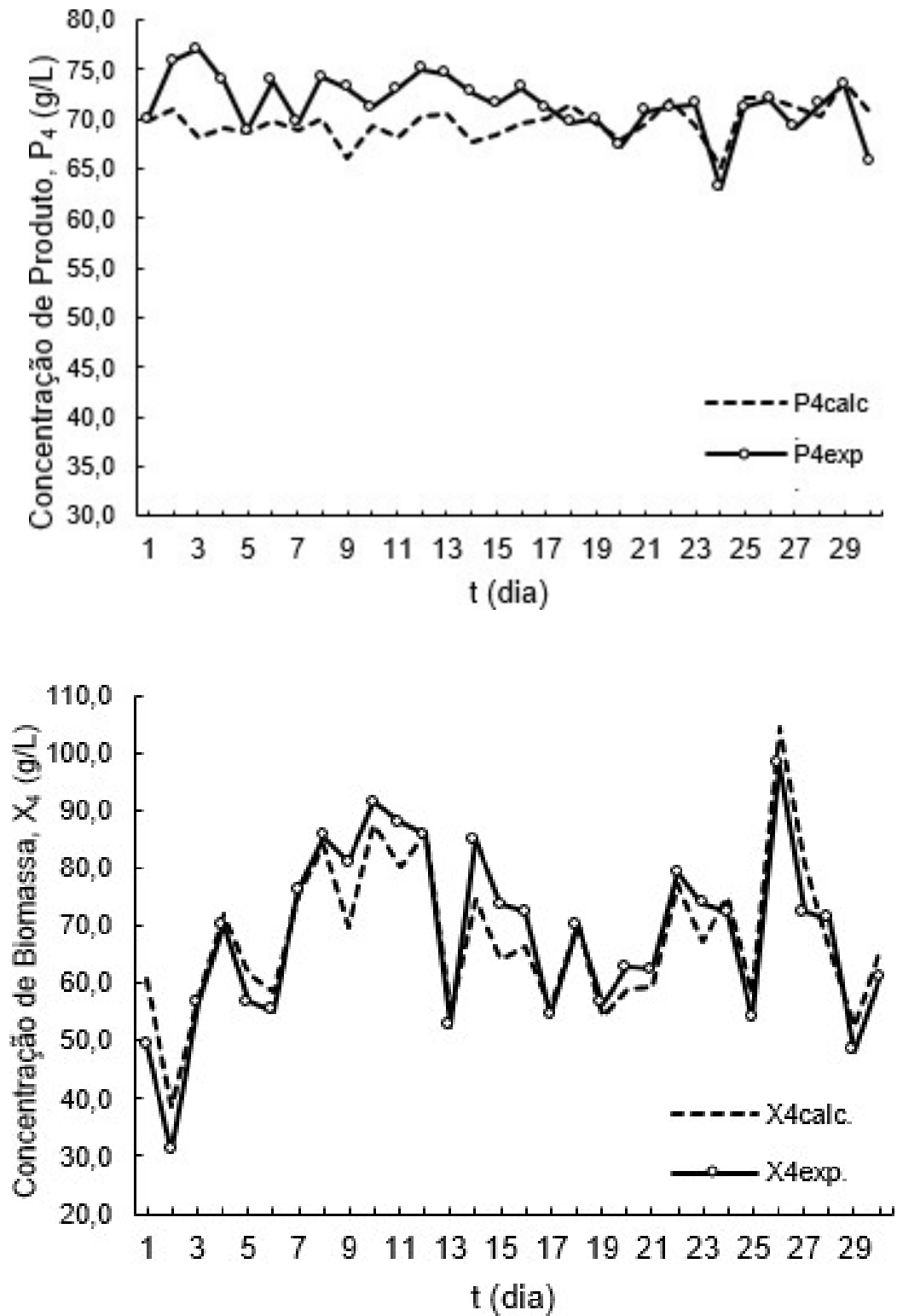


Fonte: Autor (2024).

Uma forma de validar o modelo matemático é testá-lo frente a dados experimentais não utilizados na etapa de estimação de seus parâmetros. Neste sentido, na Figura 17 está apresentado o gráfico do ajuste do modelo aos dados experimentais de concentração de etanol e de biomassa na 4ª dorna, dados estes não apresentados antecipadamente ao modelo. Conforme se observa nesta figura, o ajuste do modelo aos dados experimentais foi muito bom, principalmente para a concentração de biomassa, cuja tendência de comportamento foi reproduzida precisamente pelo modelo matemático. Em termos quantitativos, tem-se que o valor experimental médio da concentração de biomassa na 4ª dorna foi de 68,20 g/L enquanto o valor médio predito pelo modelo foi de 67,88 g/L. Para a concentração de etanol, o valor médio experimental foi de 71,50g/L e o valor médio estimado pelo modelo foi 69,70 g/L. Esta expressiva concordância entre valores experimentais e preditos credencia o uso do modelo em estudos de simulação, otimização e controle do bioprocessos.

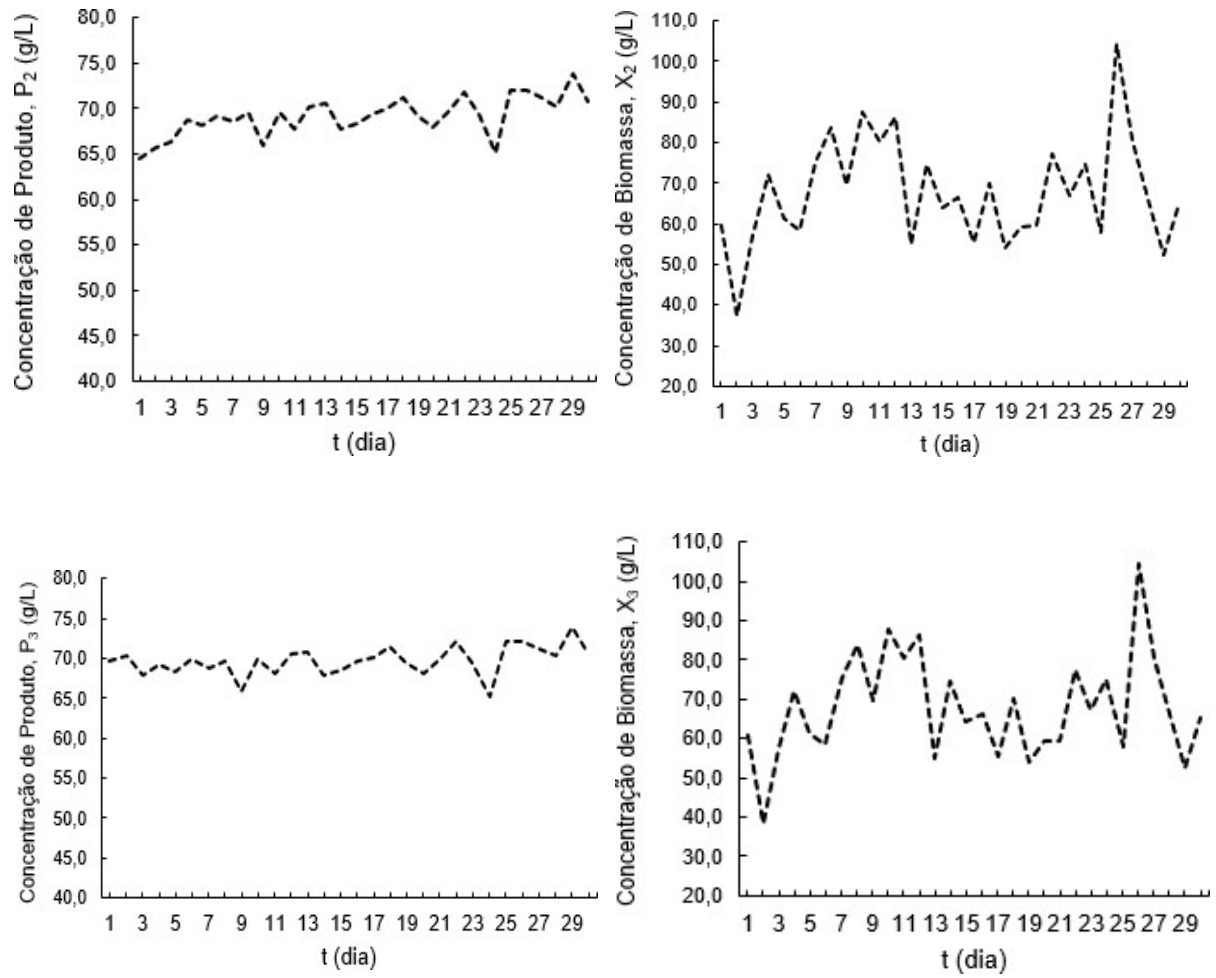
Comprovada a boa capacidade preditiva do modelo proposto, este foi empregado para simular o comportamento diário da concentração de etanol e de biomassa nas dornas intermediárias 2 e 3, estando os resultados destas simulações apresentados na Figura 5.8. Com relação ao comportamento predito para estas variáveis, verifica-se que este é muito similar nas duas dornas, com valores médios da concentração de biomassa e etanol, respectivamente iguais a 67,77 g/L e 69,14 g/L na dorna 2 e 67,88 e 69, 69 g/L na dorna 3. Considerando que o valor médio predito e experimental na dorna 1 foi de 65,68 g/L e 70,31 g/L para X_1 e de 58,66 g/L e 62,66 g/L para P_1 , pode-se inferir que praticamente não ocorre crescimento celular nas dornas 2 e 3, predominando em tais dornas um metabolismo de manutenção celular, com pequena produção de etanol associada a este metabolismo. Isto é, o consumo majoritário de açúcares para a produção significativa de etanol ocorre na 1ª dorna, funcionando as demais dornas como tanques de detenção hidráulica nos quais os açúcares residuais são quase completamente convertidos, evitando-se danos causados por uma eventual caramelização destes açúcares nos equipamentos da destilaria.

Figura 17 – Ajuste do modelo aos dados experimentais da dorna 4.



Fonte: Autor (2024).

Figura 18 – Simulação do comportamento diário da concentração de etanol e de biomassa nas dornas 2 e 3.



Fonte: Autor (2024).

6. CONCLUSÃO

A partir da análise de dados experimentais foi possível desenvolver um modelo matemático para um processo contínuo de fermentação alcoólica multiestágio em escala industrial, no qual foram incorporados vários aspectos, características, informações da literatura e hipóteses simplificadoras, reunindo considerável conhecimento sobre o bioprocessamento de modo a permitir futuramente a realização de estudos de otimização e controle com o modelo proposto, com vistas a aumentos de produtividade.

O passo subsequente consistiu em traduzir a concepção do modelo em equações matemáticas correspondentes, seguida da estimação de seus vários parâmetros, visando confrontar as previsões do modelo com dados experimentais e, assim, validar ou revisar o modelo proposto, dependendo da qualidade do ajuste aos dados experimentais.

Ficou evidenciado que, devido aos altos níveis de viabilidade celular observados no bioprocessamento, não foi necessário utilizar uma abordagem segregada para descrever a população microbiana, o que simplificou a descrição.

Os maiores níveis de concentração de substrato foram verificados na 1ª dorna de fermentação, entretanto, tais níveis não foram considerados inibitórios ao processo, não sendo necessário incluir inibição por substrato na concepção do modelo.

A estratégia de correlacionar a velocidade específica de formação de etanol (μ_P) com a velocidade específica de crescimento celular (μ_X) acarretou uma significativa redução do esforço computacional para identificar o tipo de inibição que o etanol exerce sobre μ_X , além de reduzir o número de parâmetros cinéticos a ser estimado referente à cinética de formação de produto (μ_P).

Houve a necessidade de estimar a concentração celular a partir de outras medidas relacionadas à esta variável, sendo a metodologia empregada satisfatória.

Com relação aos parâmetros cinéticos estimados, estes foram consistentes com valores comumente reportados na literatura para processos de fermentação alcoólica, constituindo-se em parâmetros típicos deste bioprocessamento.

Apesar das várias simplificações realizadas na proposição do modelo matemático, este conseguiu reter o comportamento essencial do bioprocessamento, retratando com boa precisão a tendência de comportamento das variáveis-chave.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEVEDO, F.; GENTINA, J. C. **Cinética de Fermentaciones**. In: Curso Latino-Americano de Biotecnologia, 5, Valparaíso, Chile, 1996. Apostila, p. 77-100, 1996.
- ADMASSU, W.; KORUS, R. A.; HEIMSCH, R. C. **Ethanol fermentation with a flocculating yeast**. *Chem. Eng. J.* v. 31, p. B1-B8., 1985.
- Adames, Neil; Logan Schuck; Kathy Chen; John J. Tyson; Peccoud, Jean (2013). **Analysis of Yeast Mutants to Test a Mathematical Model of the Cell Cycle**. *figshare*. Poster. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.650225.v1>
- AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATANI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 10, p. 845-864, 1968.
- AIBA, S.; SHODA, M. **Reassessment of the product inhibition in alcohol fermentation**. **J. Ferment. Technol.**, v. 47, n. 12, p. 790-794, 1969.
- ALCARDE, A.R. **Processamento da cana-de-açúcar**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa. 2007, Brasília, DF.
- AMORIM, H. V.; LOPES, L. M.; OLIVEIRA, J. V. C.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. M. **Scientific challenges of bioethanol production in Brazil**. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 91, p. 1267–1275, 1996.
- ANDRIETTA, S. R.; GAMBARO, V.; FIORIM, F.; FABRO, J. L.; PALMER JÚNIOR, C. S.; MAUGERI, F. **Fermentação contínua - projeto, controle e aspectos operacionais**. *STAB*, v. 12, n.5, p. 26-30, 1994.
- BAILEY, J. E. **Mathematical modeling and analysis in biochemical engineering past accomplishments and future opportunities**. *Biotechnology Progress*, v. 14, p. 8-20, 1998.
- BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: The industrial process and its impact on yeast fermentation. In: BERNARDES, M. A. S. (ed.). **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**. 1 ed. Croatia: Intech, 2011. cap.5. p. 85-100.
- BAZUA, C. D.; WILKE, C. R. **Ethanol Effects on the kinetics of a continuous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae***. **Biotechnol. Bioeng. Symp.** v. 7, p. 105-118, 1977.
- BIOEN, 2021. **RenovaBio completa um ano e emerge como umas das políticas ambientais mais consistentes do Brasil**. Disponível em: <<https://www.noticiasagricolas.com.br/noticias/sucroenergetico/288344-renovabio-completa-um-ano-e-emerge-como-umas-das-politicas-ambientais-mais-consistentes-do-brasil.html#.YMpz3qhKjIU>>
- BRASIL. Ministério Minas Energia. **CNPE passa a ter competência para fixar teor de etanol anidro na gasolina**. [S.l]: Ministério de Minas e Energia, 14/01/2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/mme/pt-br/assuntos/noticias/cnpe-passa-a-ter-competencia-para-fixar-teor-de-etanol-anidro-na-gasolina>>.

BRAY, S. C.; FERREIRA, E. R.; RUAS, D. G. H. **As políticas da agroindústria canavieira e o PROÁLCOOL no Brasil**. Marília: Unesp Marília Publicações, 2000.

BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. **Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos**. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (coord.) *Biotechnology Industrial: engenharia bioquímica*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001, v.2, p.123-178.

BONOMI, A.; ABOUTBOUL, H; SCHMIDELL, W. Simulation of the continuous fermentation of manioc hydrolysate. **Biotechnol. Bioeng. Symp.** v. 11, p. 333-357, 1981.

BONOMI, A. **Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos**. In: Curso em Tópicos de Biotechnology Industrial, 2, Joinville, SC, 1994. Apostila, p. 1-48, 1994.

BORZANI, W. **Fermentação Alcoólica Contínua**. **Semana da Fermentação Alcoólica, Piracicaba**. **Anais da Semana da Fermentação Alcoólica**, Piracicaba, p.263- 276. 1986.

BU'LOCK, J. D.; COMBERBACH, D. M.; GHOMMIDH, C. **A study of continuous ethanol production using a highly flocculent yeast in the gas lift tower fermenter**. *Chem. Eng. J.*, v. 29, p. B9-B24, 1984.

CARVALHO, J. C.; SATO S. **Fermentação descontínua alimentada**. In: SCHMIDELL, W., *et al* (coord.). *Biotechnology Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgar Bluncher, vol. 2, 2001b. cap. 10. p. 205-218.

COMBERBACH, D. M.; GHOMMIDH, C.; BU'LOCK, J. D. **Steady-state stability and dynamic behavior of continuous ethanol fermentation at high cell densities**. *Enzyme Microb. Technol.* V. 9, p. 676-684, 1987.

CONAB. **Perfil do Setor do açúcar e do álcool no Brasil**. Brasília, 2017.

CONAB. **Perfil do Setor do açúcar e do álcool no Brasil**. Brasília, 2023.

DUTTA, R. **Fundamentals of Biochemical Engineering**. Lucknow: Ane books India, 2008.

ELIODÓRIO, K. P. **Experimental study and mathematical modelling of ethanol fermentation considering thermal effects**. São Paulo, 2024. Tese (Doutorado) - Escola Politécnica, USP.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação Contínua. In: Schmidell *et al.* (Coord.). **Biotechnology Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 223-246, 2001.

FACCIOTTI, M. C. R.; SCHMIDELL, W. **The new concept of minimum cell viability and its consequences on bioprocess design and operation**. *Braz. J. Chem. Eng.*, v. 12, n. 1, p. 22-31, 1995.

GODIA, F.; CASA, C.; SOLA, C. J. *Chem. Tech. Biotechnol.*, v. 41, p. 155-165, 1988.

- GHOSE, T. K.; TYAGI, R. D. **Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 21, n. 8, p. 1401-1420, 1979.
- HAN, K.; LEVENSPIEL, O. **Extended monod kinetics for substrate, product, and cell inhibition.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 32, n. 4, p. 430-447, 1988.
- Haddad, S.A; Lindegren, C.C. **A Method for Determining the Weight of an Individual Yeast Cell.** *Biological Research Laboratory, Southern Illinois University, Carbondale, Illinois*, 1953.
- HOJO, O.; HOKKA, C. O.; MAIOR, A. M. S. **Ethanol production by a flocculant yeast strain in a CSTR type fermentor with cell recycling.** *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 77-79, p. 535-545, 1999.
- JARZEBSKI, A. B.; MALINOWSKI, J. J.; GOMA, G. **Modeling of ethanol fermentation at high yeast concentrations.** *Biotechnol. Bioeng.*, v. 34, p. 1225-1230, 1989.
- JONES, S. T.; KORUS, R. A.; ADMASSU, W.; HEIMSCH, R. C. **Ethanol fermentation in a continuous tower fermentor.** *Biotechnol. Bioeng.*, v. 26, p. 742-747, 1984.
- Kollerup F, Daugulis AJ. **A Mathematical model for ethanol production by extractive fermentation in a continuous stirred tank fermentor.** *Biotechnol Bioeng.* 1985.
- LAFFORGUE-DELORME C.; DELORME P.; GOMA G. **Continuous Alcoholic Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* Recycle by Tangential Filtration: Key points for process modelling.** v. 16, n.7, p. 741-746, 1994.
- LEE, J. M. **Computer simulation in ethanol fermentation.** In: *Biotechnology Applications and Research*, CHEREMISINOFF, P. N.; ONELLETTE, R. P. (eds.), Technomic Publishing Company Inc., p. 78-87, 1985.
- LIMTONG, S.; NAKATA, M.; FUNAHASHI, H.; YOSHIDA, T.; SEKI, T.; KUMNUANTA, J.; TAGUCHI, H. **Continuous ethanol production by a concentrated culture of flocculating yeast.** *J. Ferment. Technol.*, v. 62, n. 1, p. 55-62, 1984.
- LIMA, Luís Antonio de Oliveira. **Crise do Petróleo e Evolução Recente da Economia Brasileira.** In: *Revista de Administração de Empresas*, FGV, 2010.
- LAFFORGUE-DELORME C.; DELORME P.; GOMA G. **Continuous Alcoholic Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* Recycle by Tangential Filtration: Key points for process modelling.** v. 16, n. 7, p. 741-746, 1994.
- LEVENSPIEL, O. **The Monod equation: A revisit and a generalization to product inhibition situations.** *Biotechnol. Bioeng.* v. 22, p. 1671-1687, 1980.
- LOBATO, F. S. **Controle ótimo da fermentação alcoólica em reator batelada alimentada usando computação bio-inspirada. Tendências em Matemática Básica e Computacional,** v. 1, p. 3-15, 2015.

- LUONG, J. H. T. **Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering***, v. 27, n. 3, p. 280-285, 1985.
- MADALENO, L. **Produção de bioetanol**. Curso de Biocombustíveis. 10/12/2013. Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal.
- MENEZES, J. C.; ALVES, S. S.; LEMOS, J. M.; AZEVEDO, S. F. **Mathematical modelling of industrial pilot-plant penicillin-G fed-batch fermentations**. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, v. 61, p. 123-138, 1994.
- MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R.; SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A. **Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production**. *Biotechnology Advances*, v. 28, n. 6, p. 817–830, 2010.
- NOVAK, M.; STREHAIANO, P.; MORENO, M.; GOMA, G. **Alcoholic fermentation: On the inhibitory effect of Ethanol**. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 23, p. 201-211, 1981.
- OHBA, M.S. **Modelagem matemática da produção de glicoamilase por *Aspergillus awamori* NRRL 3112**. 1998. 213 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo 1998.
- OLIVEIRA, S. C. **Modelagem matemática de um processo contínuo de fermentação alcoólica em reator tipo torre com reciclo de leveduras floculantes**. São Paulo, 2000. Tese (Doutorado) - Escola Politécnica, USP.
- Oliveira SC, Oliveira RC, Tacin MV, Gattás EAL (2016) **Kinetic Modeling and Optimization of a Batch Ethanol Fermentation Process**. *J Bioprocess Biotech* 6: 266.
- OCDE-FAO. **Agricultural Outlook 2021-2030**. OCDE Publishing, Paris, 2021.
- PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. Dissertação. Universidade Federal de Uberlândia. 2010.
- PATERNINA, L. M. C. **Modelagem e simulação do processo de fermentação extrativa a vácuo com uma câmara de flash e separação do CO₂ utilizando uma coluna de absorção**. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. Campinas, São Paulo. 2011.
- RAMKRISHNA, D.; FREDRICKSON, A. G.; TSUCHIYA, H. M. **Dynamics of microbial propagation models considering endogenous metabolism**. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, v. 12, n. 4, p. 311-327, 1966.
- RICCIA, M. *et al.* **Inhibition effects of ethanol on the kinetics of glucose metabolism by *S. cerevisiae*: NMR and modelling study**. *Chemical Physics Letters*, v. 387, v. 4- 6, p. 377–382, 2004.
- SANTOS, F.C. **Métodos de Monitoramento de Fermentação Alcoólica**. – Universidade de São Carlos, 2022.

SANTOS, N. B. **Estudo do número de renovações do volume de dorna para viabilização do fermentador com circulação de vinho.** – João Pessoa, 2019.

SEIDEL, A. Chem. Eng. Sci., v. 45, n. 9, p. 2970-2973.

SCHMIDELL, W. **Transferência de oxigênio em processos fermentativos aeróbios.** In: Curso em Tópicos de Biotecnologia Industrial, 2, Joinville, SC, p. 5.1-6.11, 2001.

SILVA, L. F.; BERNARDINO, C. D.; RÉ, D.; FURTADO, C. H. F.; AMORIM, H. V. **Métodos analíticos para o controle da produção de açúcar e álcool.** 3ª ed, Piracicaba: Fermentec, 2005.

SILVA-FILHO, E. A.; SANTOS, S. K. B.; RESENTE, A. M.; MORAIS, J. O. F.; MORAIS JR, M. A.; SIMÕES D. A.. **Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting.** Antonie van Leeuwenhock, v. 88, p. 13-23, 2005.

SINCLAIR, C. G.; KRISTIANSEN, B. **Fermentation kinetics and modelling.** New York, Taylor & Francis, 1987.

SINCLAIR, C. G. **Cinética de los procesos microbianos.** In: Biotecnologia Basica, BU'LOCK, J.; KRISTIANSEN, B. (eds.), Zaragoza, Editorial Acirial S. A., p. 75-131, 1991.

SOARES, A.; MONASSA J. M.; **O EMPREGO DA LEVEDURA NA INDÚSTRIA FOOD E FEED:** Univem, 2014.

SOUZA, C. S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por linhagem de S. Cerevisiae.** Tese. Universidade de São Paulo/Instituto Butantan/IPT. 2009.

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas.** Tese. Universidade de Campinas, 2001.

THATIPAMALA, R.; ROHANI, S.; HILL, G. A. **Effects of high product and substrate inhibitions on the kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentation.** Biotechnology and Bioengineering, v. 40, n. 2, p. 289-297, 1992.

TOSETTO, G. M. **Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de Etanol.** 2002. 95f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

UDOP (União Nacional da Bioenergia), 2020 – **Do etanol ao açúcar.** Disponível em: < <https://www.udop.com.br/noticia/2020/6/9/do-etanol-ao-acucar.html> > acesso dia 26/12/2023.

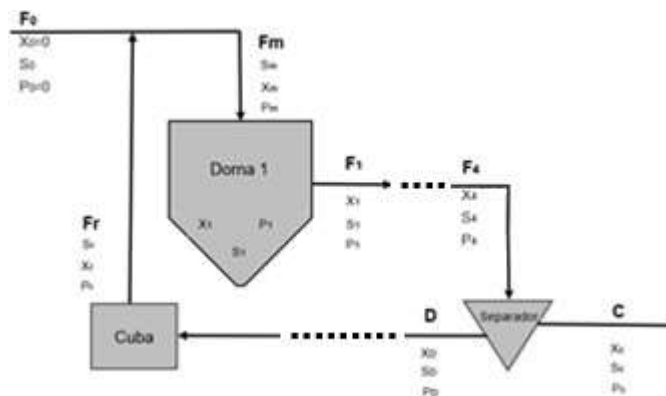
VASCONCELO, J. N. D. **Fermentação Etanólica.** In: SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. Cana-de-açúcar: Bioenergia, Açúcar e etanol. 2. ed. Viçosa: Folha de Viçosa Ltda, 2012. cap. 16. p. 451-487.

VOLESKY, B.; VOTRUBA, J. **Modeling and optimization of fermentation processes.** Amsterdã: Elsevier, 1992. 266 p.

APÊNDICE A – CÁLCULO DAS CONDIÇÕES DE ENTRADA NA DORNA 1

Neste apêndice são apresentadas as equações utilizadas para o cálculo das condições de entrada na dorna 1 (F_m , S_m , X_m , P_m), considerando o fluxograma simplificado mostrado na Figura A1.

Figura A1- Fluxograma simplificado para cálculo das condições de entrada na dorna 1



Fonte: Autor (2024)

$$F_r = RR * F_0 = 0,5 * F_0, RR = \text{Razão de Reciclo} (RR = F_r / F_0 = 0,5)$$

$$F_m = F_0 + F_r = 1,5 * F_0$$

$$X_D = FCC * X_4, FCC = \text{Fator de Concentração na Centrífuga} (FCC = 5)$$

$$D = \frac{(F_r * P_r)}{P_D} = \frac{(F_r * P_r)}{P_4}$$

$$P_r = (^\circ GL)_{cuba} * \rho * FC ; FC = \text{fator de correção} (FC = 10);$$

$$\rho = \text{massa específica do etanol} (\rho = 0,798 \text{ g/cm}^3)$$

$$X_r = \frac{(X_D * D)}{F_r}$$

$$S_m = FD * S_0, FD = \text{Fator de Diluição} (FD = 0,5)$$

$$X_m = \frac{(F_r * X_r)}{F_m}$$

$$P_m = \frac{(F_r * P_r)}{F_m}$$