



RODRIGO FERRAZ ESTAVARENGO

**SIMULAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE
FERMENTAÇÃO EM BATELADA ALIMENTADA DO
HIDROLISADO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR
PARA A PRODUÇÃO DO ETANOL DE SEGUNDA
GERAÇÃO.**

**LAVRAS – MG
Março de 2023**

RODRIGO FERRAZ ESTAVARENGO

**SIMULAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO EM
BATELADA ALIMENTADA DO HIDROLISADO DO BAGAÇO DE CANA-DE-
AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DO ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Engenharia Química, para a obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. João Moreira Neto
Orientador

**Lavras – MG
Março de 2023**

RODRIGO FERRAZ ESTAVARENGO

**SIMULAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO EM
BATELADA ALIMENTADA DO HIDROLISADO DO BAGAÇO DE CANA-DE-
AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DO ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO**

**SIMULATION AND OTIMIZATION OF THE FED BATCH FERMENTATION
OF THE HYDROLISATES FROM SUGARCANE BAGASSE FOR THE
SECOND GENERATION ETHANOL PRODUCTION**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Engenharia Química, para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 10 de março de 2023.

Dr. João Moreira Neto UFLA

Dr. Luciano Jacob Correa UFLA

Dra. Zuy Maria Magriotis UFLA

Prof. Dr. João Moreira Neto
Orientador

**Lavras – MG
Março de 2023**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais Luciane e Marcio por todo o apoio emocional e financeiro para que essa graduação se tornasse possível. Este sonho é nosso.

A minha família, que mesmo de longe seguiu e segue me apoiando nas minhas escolhas.

Aos amigos com quem convivi durante a graduação, especialmente Lucas, Igor e Luiz.

Obrigado pelos estudos coletivos, risadas e parceria durante esse período tão importante nas nossas vidas.

Aos docentes do departamento de engenharia química pelo conhecimento repassado com tamanha excelência.

Ao Professor João pelas inúmeras ajudas durante a confecção deste trabalho.

À UFLA, pelas oportunidades de crescimento pessoal e profissional durante o período em que estive no campus, e também pela ajuda financeira com as bolsas que me foram concedidas durante a graduação.

RESUMO

Frente à um cenário em que se faz necessário o uso de fontes alternativas de energia, otimizar a produção de etanol por hectare plantado de cana-de-açúcar é de extrema importância. Estudos recentes apontam a viabilidade da produção de etanol de segunda geração a partir de subprodutos provenientes de biomassas lignocelulósicas como o bagaço de cana-de-açúcar. Para implementar este processo nas indústrias, é necessário conhecer a cinética da reação considerando os diferentes tipos de pré-tratamentos em que a biomassa pode ser submetida, bem como os parâmetros de inibição causados por subprodutos formados nesse processo. Neste trabalho um modelo cinético foi modificado para representar os dados experimentais de fermentação em batelada nas temperaturas de 30 a 38 °C de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar obtido a partir do pré-tratamento com H₂SO₄ diluído seguido de uma etapa de deslignificação com NaOH. Os parâmetros cinéticos do modelo matemático foram estimados por meio do algoritmo genético “optim_ga” presente na biblioteca do software Scilab. Os parâmetros cinéticos dependentes da temperatura foram re-estimados quando houveram alterações nas temperaturas dos ensaios. A estimativa da vazão de alimentação que maximiza a produtividade de etanol em um processo de fermentação alcoólica em batelada alimentada foi determinada adaptando-se o modelo com parâmetros cinéticos obtidos a partir do ensaio de fermentação conduzido a 38 °C. A vazão de alimentação estimada em 0,24 L/h resultou em uma produtividade de 1,198 g_{etanol}/Lh considerando um bioreator com volume útil de 2 L. O modelo com parâmetros cinéticos ajustados foi capaz de representar de forma satisfatória os perfis de concentração de etanol, substrato e leveduras nos ensaios de fermentação alcoólica na faixa de temperatura considerada.

Palavras-chave: E2G. Pré-tratamento. Algoritmo genético. Estimação de parâmetros.

ABSTRACT

Facing a scenario where alternative energy sources are needed, optimizing the ethanol production per planted area is extremely important. Recent studies are enabling the production of second generation ethanol, made out of lignocellulosic biomass by-products, such as sugar cane bagasse. In order to implement this kind of process in industries, knowing the reaction's kinetics considering different types of pre-treatments in which the biomass might be submitted is needed, as well as the inhibition parameters due to by-products made in this phase. In this present work a kinetic model was modified so it can represent experimental data of a batch fermentation at temperatures of 30 to 38 °C of the sugar cane bagasse hydrolysate obtained from the H₂SO₄ pre-treatment followed by a NaOH delignification. Kinetic parameters were estimated through a genetic algorithm "optim_ga" disponible at the Scilab library. The temperature dependent parameters were re-estimated for each temperature in which the experiment happened. The estimate feeding flow rate that maximizes the production of a fed-batch fermentation's ethanol production was determined adapting the model obtained from the batch reaction conducted at 38 °C. The feeding flow rate estimated at 0,24 L/h resulted in a productivity of 1,198 g_{ethanol}/Lh considering a bioreactor with a 2L volume capacity. The model with the adjusted kinetic parameters was capable of represent satisfactorily the ethanol, substrate and yeast concentration at the temperature rates considered.

Keywords: 2G ethanol. Pre-treatment. Genetic Algorithm,. Parameter estimation..

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma simplificado da produção do etanol de segunda geração a partir da biomassa lignocelulósica.....	5
Figura 2: Pré-tratamento da biomassa deixando os açúcares fermentescíveis expostos às leveduras.....	6
Figura 3: Mecanismo da hidrólise enzimática pelo complexo celulase.....	10
Figura 4: Máximos locais e global da função $f(x) = x\text{sen}(10\pi x)+1$	16
Figura 5: Fluxograma de funcionamento do algoritmo genético.....	17
Figura 6: Recombinação de um ponto (one-point crossover).....	20
Figura 7: Mutação de um cromossomo.....	20
Figura 8: Fluxograma do código implementado no software Scilab para a obtenção do fator de diluição que maximiza a produtividade.....	23
Figura 9: resultado da simulação da fermentação em batelada a 30°C expressa em g/L versus hora.....	29
Figura 10: resultado da simulação da fermentação em batelada a 32°C expressa em g/L versus hora.....	29
Figura 11: resultado da simulação da fermentação em batelada a 34°C expressa em g/L versus hora.....	30
Figura 12: resultado da simulação da fermentação em batelada a 36°C expressa em g/L versus hora.....	30
Figura 13: resultado da simulação da fermentação em batelada a 38°C expressa em g/L versus hora.....	31
Figura 14: comportamento de $\mu_{\text{máx}}$ em função da temperatura.....	32
Figura 15: comportamento de $C_{\text{máx}}$ em função da temperatura.....	33
Figura 16: comportamento de $X_{\text{máx}}$ em função da temperatura.....	33
Figura 17: comportamento de $Y_{\text{P X}}$ em função da temperatura.....	34
Figura 18: resultado da simulação da fermentação em batelada com os parâmetros otimizados a 30°C expressa em g/L versus hora.....	34
Figura 19: resultado da simulação da fermentação em batelada com os parâmetros otimizados a 32°C expressa em g/L versus hora.....	35
Figura 20: resultado da simulação da fermentação em batelada com os parâmetros otimizados a 34°C expressa em g/L versus hora.....	35
Figura 21: resultado da simulação da fermentação em batelada com os parâmetros otimizados a 36°C expressa em g/L versus hora.....	36
Figura 22: resultado da simulação da fermentação em batelada com os parâmetros otimizados a 38°C expressa em g/L versus hora.....	36
Figura 23: Comportamento da produtividade (g/Lh) em função da vazão de alimentação F (L/h) para a fermentação em batelada alimentada a 38°C.....	38
Figura 24: resultado da simulação da fermentação em batelada alimentada com os parâmetros otimizados a 38°C expressa em g/L versus hora, a uma vazão F de 0,24L/h.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Significados de terminologias dos algoritmos genéticos.....	18
Tabela 2: Condições iniciais da fermentação em batelada alimentada adotadas.....	27
Tabela 3: Parâmetros cinéticos utilizados como parâmetros iniciais da simulação.....	28
Tabela 4: Parâmetros otimizados não dependentes da temperatura.....	31
Tabela 5: Parâmetros dependentes da temperatura para reações em batelada nas temperaturas de 30, 32, 34, 36 e 38°C.....	32
Tabela 6: RSD de cada uma das variáveis em função da temperatura.....	37
Tabela 7: Correlação entre os parâmetros ajustados e a temperatura.....	37

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2	OBJETIVOS	3
3	REFERENCIAL TEÓRICO	4
3.1	Bagaço de cana-de-açúcar	4
3.2	A produção do etanol de segunda geração	4
3.3	Pré-tratamento	5
3.3.1	Pré-tratamento físico.....	6
3.3.2	Pré-tratamento biológico	7
3.3.3	Pré-tratamento químico	7
3.3.3.1	Pré-tratamento ácido.....	7
3.3.3.2	Pré-tratamento alcalino.....	8
3.4	Hidrólise enzimática	8
3.5	Fermentação alcoólica	10
3.5.1	Saccharomyces cerevisiae	11
3.5.2	Modelos de fermentação.....	12
3.6	Fatores que afetam a fermentação	13
3.6.1	Produto	14
3.6.2	Substrato	14
3.6.3	Contaminação Bacteriana.....	14
3.7	Crescimento microbiano.....	14
3.8	Formação de produto	16
3.9	Consumo de substrato.....	16
3.10	Otimização.....	16
3.10.1	Algoritmo genético	17
4	METODOLOGIA.....	22
4.1	Dados experimentais.....	22
4.1.1	Matéria prima	22
4.1.2	Pré-tratamento com H ₂ SO ₄ diluído	22
4.1.3	Deslignificação do bagaço pré-tratado	23
4.1.4	Hidrólise enzimática	23
4.2	Métodos matemáticos	24
4.2.1	Importação dos dados	25

4.2.2	Modelagem matemática do processo em batelada.	25
4.2.3	Subrotina ODE	26
4.3	Reestimação de parâmetros	27
4.4	Balço de Massa para a reação em batelada alimentada	27
4.5	Determinação da vazão ótima de alimentação	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
5.1	Simulações iniciais do processo em batelada	29
5.2	Ajuste dos parâmetros cinéticos do processo em batelada	32
5.3	Simulação do processo em batelada alimentada.....	39
6	CONCLUSÕES	42
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
	APÊNDICE	48

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O mundo reconheceu definitivamente a necessidade de se diversificar a sua matriz energética baseada quase que exclusivamente em combustíveis fósseis e lança-se na busca de alternativas que permitam cada vez mais a utilização de energias limpas e renováveis (GOES e MARRA, 2008).

O bioetanol é um combustível de fonte renovável produzido em larga escala mundial e especialmente no Brasil, onde a cultura de cana-de-açúcar é extremamente vantajosa. Porém, há algum tempo, a plantação de cana-de-açúcar para produção de biocombustível é alvo de debates, pois utiliza terra nobre que poderia estar sendo utilizada para cultivo de alimentos como soja e trigo (MOREIRA NETO, 2011).

Neste contexto, onde a otimização da produção de bioetanol por área de cana-de-açúcar plantada é de extrema importância, o etanol de segunda geração, produzido através da biomassa lignocelulósica (e neste trabalho o bagaço da cana-de-açúcar), atraiu a atenção de pesquisadores que, nestas últimas três décadas vêm tentando desenvolver uma série de tecnologias denominadas “hidrólise”, que permitem converter a hemicelulose e celulose em em glicose (LEITE; CORTEZ, 2008).

No atual cenário brasileiro, o bagaço de cana residual da extração do caldo realizado nas moendas das indústrias sucroalcooleiras, tem como destino a caldeira, onde serve como combustível para a geração de vapor, que, posteriormente, será utilizado em outras etapas da produção de açúcar e etanol.

Em termos energéticos, o bagaço e palha representam aproximadamente dois terços da energia potencial da cana-de-açúcar e, seu aproveitamento integral poderá aumentar significativamente a produção de etanol, passando dos atuais 85 litros por tonelada de cana de açúcar para 185 litros de etanol por tonelada de bagaço de cana-de-açúcar (CARPIO e SOUZA, 2017), sem a necessidade de expansão da área de cultivo, além de ser possível diminuir os custos de produção (SANTOS et al., 2014).

Para o aproveitamento energético desta biomassa, faz-se necessário submetê-la a pré-tratamentos antes da etapa da hidrólise, visando aumentar a sua digestibilidade, fazendo com que a celulose presente na biomassa fique mais acessível às enzimas, que a convertam em glicose para posterior fermentação alcoólica (CHANG; NAGWANI; HOLTZAPPLE, 1998). Durante a etapa de pré-tratamento, pode ocorrer a formação de inibidores no hidrolisado, impactando a cinética de fermentação, rendimento e

produtividade do etanol. A presença de inibidores varia de acordo com o pré-tratamento no qual a biomassa foi submetida (ANDRADE, 2012).

O processo de fermentação não está livre de inibição. Segundo Thatipamala et al. (1992), efeitos inibitórios causados pela concentração do substrato começam a ser observados a partir de 150 g/L . Para contornar este fenômeno, mantendo a eficiência do processo, a reação em batelada alimentada é adotada em cerca de 85% das indústrias brasileiras (GODOY et al., 2008). Nesta categoria de regime semiaberto, não só a inibição por altas concentrações de substrato pode ser evitada, sendo o substrato adicionado gradativamente até se completar o volume completo da dorna, mas também a inibição por altas concentrações de produto. Na medida em que o produto é gerado, é também diluído no sistema, por conta do aumento do volume reacional

A modelagem matemática do processo é uma poderosa ferramenta, pois contribui para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos, bem como o desenvolvimento de projetos que visam a otimização do processo em uma bioferinaria (QI e WRIGHT, 2016). Este projeto tem como objetivo o desenvolvimento de um modelo matemático que descreva a fermentação alcoólica a partir do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H_2SO_4 e deslignificado com NaOH diluído e, a partir do modelo desenvolvido, maximizar a produtividade de etanol por meio da determinação da vazão ótima de alimentação da reação em regime batelada alimentada.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi encontrar a vazão ótima de alimentação que se deve adotar em um processo de fermentação do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H_2SO_4 diluído e deslignificado com NaOH para que se obtenha a produtividade máxima. Com os seguintes objetivos específicos:

- Desenvolvimento do modelo matemático para a descrição do processo de fermentação alcoólica do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H_2SO_4 e deslignificado com NaOH diluído;
- Simulação do modelo cinético no software Scilab;
- Ajuste dos parâmetros cinéticos do modelo de fermentação para diferentes temperaturas por meio do algoritmo genético “optim_ga” presente na biblioteca do software Scilab;
- Modelagem matemática do processo em batelada alimentada;
- Otimização da vazão de alimentação que forneça a maior produtividade de etanol.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Bagaço de cana-de-açúcar

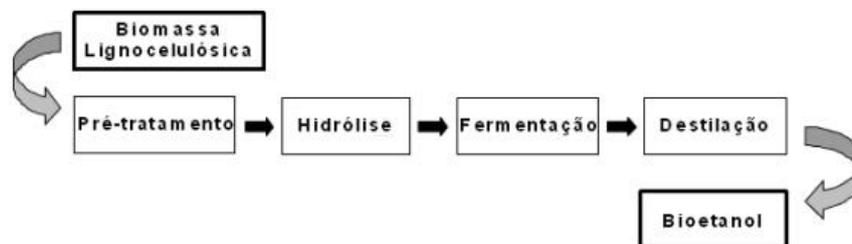
O bagaço de cana-de-açúcar é um subproduto resultante da extração do caldo da cana nas moendas das usinas sucroalcooleiras. É composto basicamente de celulose, sendo este o componente mais abundante, hemiceluloses e lignina. Estes componentes, juntos, formam uma estrutura resistente, sendo responsáveis pela sustentação, suporte estrutural, proteção contra ameaças externas, transporte de nutrientes, etc (FENGEL; WEGENER; GREUNE, 1989). Segundo (CASTRO; PEREIRA JR, 2010), a composição do bagaço de cana-de-açúcar contém 36% de celulose, 28% de hemicelulose e 20% de lignina, e os 16% restantes são compostos por extrativos, que são materiais orgânicos que variam por conta de fatores como genética e clima, e cinzas que são materiais inorgânicos.

3.2 A produção do etanol de segunda geração

O etanol de segunda geração (2G) é produzido a partir de biomassas lignocelulósicas, bem como palha de milho, palha de arroz, resíduos florestais, bagaço de cana-de-açúcar, entre outros. No Brasil, devido a sua disponibilidade nas usinas de açúcar e álcool e a possibilidade de integração com a infraestrutura já existente para a produção de etanol de 1ª geração (1G), o bagaço de cana-de-açúcar é a biomassa lignocelulósica com maior potencial a ser utilizada na produção de etanol 2G .

Este material lignocelulósico é composto majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina e, devido à forte cristalinidade da estrutura que a celulose apresenta, é necessário submeter a biomassa à pré-tratamentos em uma etapa anterior a etapa de hidrólise enzimática e, assim então, a biomassa está preparada para a fermentação (MARTINS, 2015). A Figura 1 abaixo apresenta um fluxograma simplificado com as etapas que compõem o processo de produção do etanol de segunda geração.

Figura 1: Fluxograma simplificado da produção do etanol de segunda geração a partir da biomassa lignocelulósica



Fonte: (KRISTENSEN, 2008)

3.3 Pré-tratamento

O emprego de um algum tipo de pré-tratamento de biomassa data de 1819, onde ácido concentrado era utilizado para a sacarificação da madeira para a produção de etanol (DA SILVA et al., 2013). É a etapa menos tecnologicamente madura do todo o processo (MARTINS, 2015), e é onde ocorre a conversão da biomassa em açúcares fermentescíveis. Para esta etapa ocorrer, é necessário a inclusão de reatores resistentes a corrosão, produtos químicos e uso de utilidades como vapor, acarretando em um alto custo de produção, e uma redução no custo desta etapa ocasionaria um grande impacto no custo final do etanol de segunda geração (MARTÍN; KLINKE; THOMSEN, 2007).

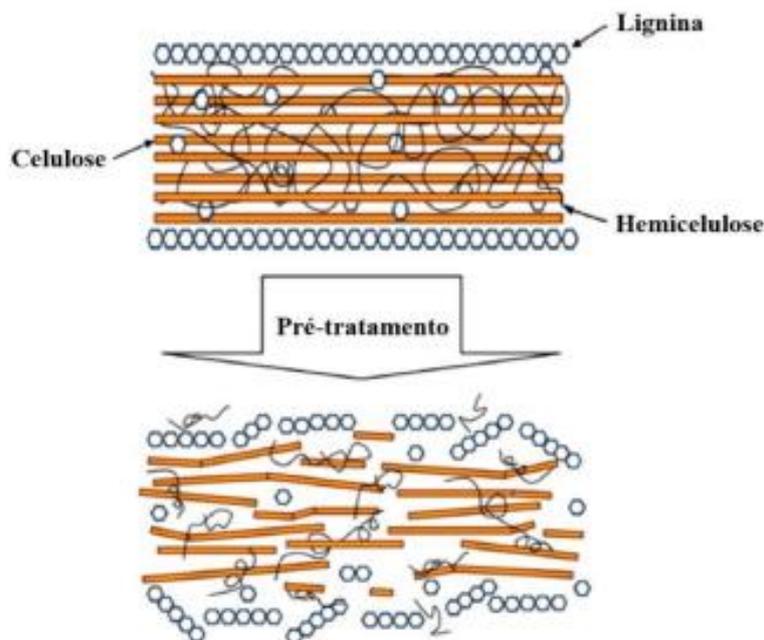
Segundo Cardona e Sánchez (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007), o maior desafio na conversão de biomassa em etanol de segunda geração é a etapa de pré-tratamento. Quando esta etapa é muito severa, os açúcares liberados são degradados em compostos inibitórios para a enzima e levedura, o que ocasiona um menor rendimento para o processo. Para o caso de uma etapa muito branda, o substrato não se tornará acessível para a etapa de fermentação (KELLER; HAMILTON; NGUYEN, 2003).

Os pré-tratamentos incluem métodos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos, bem como combinações de métodos. A escolha do pré-tratamento ideal depende da origem da matéria prima, impacto ambiental e avaliação econômica (MARTINS, 2015).

Para ser considerado eficiente, o pré-tratamento deve diminuir o grau de polimerização e o grau de cristalinidade da celulose, aumentar a área superficial da biomassa e dissociar o complexo lignina-celulose de forma que se tornem mais acessíveis

às enzimas conforme ilustra a Figura 2, preservando a pentose e minimizando a formação de compostos inibidores para as leveduras (ZHANG; LYND, 2004).

Figura 2: Pré-tratamento da biomassa deixando os açúcares fermentescíveis expostos às leveduras



fonte: (MOOD et al., 2013)

3.3.1 Pré-tratamento físico

Os pré-tratamentos físicos são os que atuam na biomassa aumentando a área superficial e tamanho dos poros, diminuindo o grau de polimerização e cristalinidade da celulose (SZCZODRAK; FIEDUREK, 1996). Exemplos de pré-tratamentos físicos são pirólise, irradiação e fragmentação mecânica. Na fragmentação mecânica o tamanho da biomassa é diminuído pela combinação das etapas de lascagem, trituração e moagem (SUN; CHENG, 2002). No processo de pirólise os materiais são expostos à temperaturas extremas, superiores a 300°C, sendo a celulose rapidamente decomposta em produtos gasosos e carvão residual e, em seguida, o carvão residual é lixiviado com água, tendo como principal componente no lixiviado a glicose (SARKAR et al., 2012). O processo de irradiação é um processo mais caro, permite a redução do grau de polimerização e cristalinidade da celulose e a despolimerização parcial da lignina (ZHENG; PAN;

ZHANG, 2009). Estes resultados são alcançados ao irradiar raios gama, ultrassom, e outros raios de alta energia na biomassa.

3.3.2 Pré-tratamento biológico

Os pré-tratamentos biológicos utilizam de microorganismos que possuem capacidade de degradar a celulose, hemicelulose e lignina, sendo a celulose mais resistente ao ataque (CHIARAMONTI et al., 2012). Como exemplo dos microorganismos utilizados, tem-se os fungos de podridão marrom, branca e mole. De acordo com (SUN; CHENG, 2002), os fungos de podridão branca são os considerados mais eficazes para o pré-tratamento biológico de biomassa lignocelulósica.

3.3.3 Pré-tratamento químico

Neste tipo de pré-tratamento são utilizados agentes químicos, podendo ser ácidos, bases ou solventes orgânicos. O objetivo do tratamento químico é aumentar a superfície do substrato ao inchar as fibras e a remoção da hemicelulose e lignina, tornando a celulose mais acessível (MARTINS, 2015).

3.3.3.1 Pré-tratamento ácido

Este tipo de pré-tratamento apresenta uma eficiência de 90% para a remoção da hemicelulose, e permite a desconstrução da estrutura do material lignocelulósico, liberando monômeros de açúcar. Geralmente é conduzido com ácido sulfúrico diluído ou ácido clorídrico, 150°C e pressões de até 10 atm (MARTINS, 2015). Há também estudos com outros ácidos sendo empregados como catalisadores deste pré-tratamento. A utilização de ácidos se mostrou vantajosa porém uma desvantagem é a formação de inibidores provenientes da degradação do açúcar, e a corrosão dos reatores (RODRÍGUEZ-CHONG et al., 2004).

O foco deste trabalho foi o pré-tratamento ácido utilizando ácido sulfúrico diluído, pois este se mostrou bastante eficiente na remoção de hemicelulose (GUO et al., 2009).

No estudo de (VANCOV; MCINTOSH, 2012), ao se tratar a biomassa de palha de sorgo pré-tratada com H_2SO_4 com concentração de 2%, por $121^\circ C$ e 60 minutos de tempo de residência, foi obtido a máxima solubilização das hemiceluloses.

Já no trabalho realizado por (UM; VAN WALSUM, 2009), o mesmo pré-tratamento foi capaz de solubilizar efetivamente a hemicelulose porém a deslignificação atingiu um máximo de 22%.

A presença de lignina restante na biomassa influencia a sacarificação enzimática, acarretando em baixos rendimentos. Para contornar este problema, a combinação de pré-tratamentos é adotada. Após a etapa de pré-tratamento ácido, tem-se a deslignificação onde estudos tem apontado bons rendimentos ao se utilizar NaOH como agente deslignificante (ROCHA et al., 2002).

3.3.3.2 Pré-tratamento alcalino

O pré-tratamento alcalino por si só não é eficiente na obtenção de glicose. Em seu estudo, MODENBACH e NOKES, (2012) obtiveram, com 3h de tempo de residência e 4% (m/m) de NaOH à $70^\circ C$, uma conversão de apenas 39,2% de glicose ao pré-tratar a palha de arroz. BARCELOS et al., (2013) obtiveram em seu trabalho uma conversão de 50% de glicose ao pré-tratar o bagaço de cana-de-açúcar com NaOH 1M. Para um tempo de residência de 30 minutos em pré-tratamentos com diferentes ácidos, uma conversão de mais de 90% foi alcançada.

Para uma etapa de deslignificação o pré-tratamento básico é bastante eficiente, e uma combinação de pré-tratamentos ácido com H_2SO_4 diluído, seguido de pré-tratamento básico com NaOH foi o escolhido para este trabalho.

3.4 Hidrólise enzimática

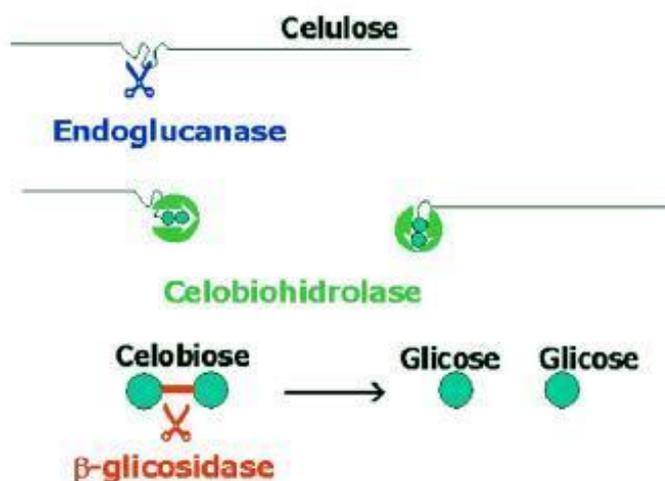
Após a etapa de pré-tratamento, uma etapa de hidrólise é adotada. É nesta etapa que ocorre a quebra da celulose e hemicelulose em açúcares fermentescíveis e é a etapa mais cara do processo, devido ao elevado custo das enzimas. Nesta etapa, diversas inibições podem ocorrer, seja por excesso de substrato, temperatura elevada, pH fora da faixa adequada, entre outros. Este é outro fator motivador para o estudo e otimização do

etanol de segunda geração: para que as etapa de pré-tratamento não ocasione inibição na etapa de hidrólise (MICHELIN et al., 2016). A hidrólise enzimática ocorre em três etapas: adsorção da enzima celulase à superfície da celulose; biodegradação da celulose; e dessorção da celulase (SUN; CHENG, 2002).

A celulase é um complexo enzimático bastante utilizado em diversos setores da indústria, como a indústria têxtil, de alimentos, de detergentes, na preparação do malte nas cervejarias, entre outros. No processo do etanol de segunda geração, a celulase é utilizada como biocatalisadora da etapa de hidrólise e, comparando a hidrólise enzimática com a hidrólise ácida, a primeira apresenta vantagens em aspectos como elevados rendimentos de açúcares, capacidade de trabalhar em condições mais brandas de temperatura e pressão, menor agressividade química para os reatores, e menor acúmulo de substâncias inibitórias para as células microbianas que serão utilizadas na etapa de fermentação (CASTRO; PEREIRA JR, 2010), mas também apresentam desvantagens como o custo elevado da enzima e o longo período para se obter rendimentos altos, no qual é necessário manter os grandes volumes agitados e aquecidos por até 96h (FENGEL; WEGENER; GREUNE, 1989).

Este complexo enzimático é composto por três enzimas que atuam na biomassa em sinergia umas com as outras, sendo elas: endoglucanase (1,4- β -DGlucanglucanoidrolase, EC 3.2.1.4), a exoglucanase (celobiohidrolase, EC 3.2.1.91) e a celobiase (β -glicosidase, EC 3.2.1.21) (ANDERSEN, 2007). A endo e a exoglucanase atuam sobre a celulose, formando glicose e celobiose. Posteriormente, nesta última, atua a celobiase, que cliva a celobiose em glicose (DINÇER; TELEFONCU, 2007). Como diz o nome endo e exo, interior e exterior respectivamente, cada tipo de enzima atua em uma região da celulose. Como mostra a Figura 3 abaixo, a endoglucanase vai agir ao longo da cadeia da celulose, diminuindo o grau de polimerização da mesma, enquanto a exoglucanase age nas extremidades redutoras e não redutoras da cadeia, produzindo principalmente a celobiose, onde atua então a celobiase, clivando a celobiose para a obtenção de glicose (MARTINS, 2015).

Figura 3: Mecanismo da hidrólise enzimática pelo complexo celulase



fonte: (TEBEKA; SILVA; PETRI, 2009)

As enzimas do complexo enzimático não hidrolisam a celulose de forma eficiente quando atuando individualmente, sendo necessário a ação complementar e sinérgica, haja vista que o resultado da ação conjunta é melhor que o resultado da ação individual somadas (MARTINS, 2015).

3.5 Fermentação alcoólica

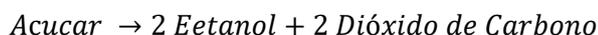
A fermentação alcoólica é uma reação química em que um substrato é convertido em etanol, através do metabolismo anaeróbico das leveduras, ou seja, na ausência de oxigênio as leveduras utilizam do substrato para a sua manutenção celular, e como resultado da reação, é formado etanol e dióxido de carbono. Em presença de oxigênio, os açúcares do substrato são convertidos em biomassa (aumento da quantidade de leveduras), dióxido de carbono e água. (ANDRADE, 2012).

As matérias primas utilizadas para a fermentação podem ser de diversas fontes, como cana-de-açúcar (mais comum no Brasil), beterraba, milho, sorgo, entre outros. No caso de açúcares provenientes de matérias açucaradas, estes podem ser monossacarídeos, que são os açúcares diretamente fermentescíveis, ou dissacarídeos, sendo necessário uma etapa de quebra da molécula, denominada de inversão e que ocorre através da enzima invertase, para que então o açúcar possa ser fermentado pela levedura. As matérias amiláceas e feculentas, que são os grãos, palhas e resíduos agrícolas, necessitam da etapa

de hidrólise, denominada de sacarificação, para que então as leveduras tenham a matéria prima disponível para a fermentação (DA SILVA et al., 2013)

As leveduras são de extrema importância para a indústria. Para que a reação ocorra de forma a se obter um bom rendimento, é necessário que as leveduras tenham uma alta tolerância à etanol, tendo em vista que o próprio produto gerado é um inibidor de crescimento e de fermentação para a levedura (AGUDO, 1985).

A reação química de fermentação alcoólica bem como sua estequiometria está apresentada abaixo:



O processo de transformação da glicose em etanol e CO₂ no interior da célula é formado por 12 reações químicas, e cada uma delas catalisada por uma enzima diferente contida no citoplasma celular das leveduras (DE ALMEIDA LIMA, 2019). Reações paralelas inevitavelmente acontecem, e glicerol e biomassa são obtidos como produtos secundários desta reação, diminuindo a conversão de substrato em etanol para valores menores que o estequiométrico (GUIDINI, 2013).

3.5.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Dentre as leveduras utilizadas na fermentação para a obtenção de etanol, a *S. cerevisiae* é a mais utilizada (LIN; TANAKA, 2006). Também é utilizada em outros processos na indústria bioquímica e alimentícia, como por exemplo a fabricação de pães e cervejas (SILVA, 2018). Esta levedura é comumente utilizada devido à alta resistência ao etanol, produto da fermentação, o que aumenta a produtividade e diminui os custos de produção. Também é tolerante a baixos valores de pH e altas concentrações de açúcar no meio reacional (SCHMIDELL et al., 2001a). Enquanto outras espécies de leveduras cessam a sua atividade ao se atingir concentrações de 6% (v/v), a *S. cerevisiae* suporta concentrações de até 17% (v/v) (SANTOS et al., 2014)

3.5.2 Modelos de fermentação

Na indústria, no que diz respeito ao modo como o processo fermentativo é conduzido, este pode ser classificado como: batelada, semi-contínuo ou contínuo.

3.5.2.1 Batelada

O processo em batelada é aquele em que todos os substratos e nutrientes necessários para o crescimento celular e a formação de produto estão disponíveis e inseridos no meio desde o começo da reação (TODARO; VOGEL, 2014). No quesito assepsia é o mais seguro, pois ao final de cada batelada é necessário realizar a limpeza e esterilização do reator e, ao início de uma nova batelada, recebendo um novo inóculo (SCHMIDELL et al., 2001b).

A fermentação é considerada concluída quando a cuba “morre”, ou seja, quando acaba os nutrientes necessários para a reação, cessando a atividade biológica.

3.5.2.2 Batelada alimentada

Batelada alimentada é a operação na qual um ou mais nutrientes são adicionados continuamente ou intermitentemente após o início da reação. Os produtos gerados são mantidos no meio reacional até o fim da reação. Por conta de ter o substrato sendo adicionado gradativamente conforme o andamento da reação, a levedura sente menos a inibição por elevados índices de açúcar no mosto, o que garante uma maior produtividade, e também dilui o etanol à medida em que o produto é formado, sendo menos tóxico para as células (AMARAL, 2009). Além desse fator, poder controlar a quantidade de substrato que está presente no meio é vantajoso pelo fato de ser possível desta forma direcionar a reação para o produto desejado (CARVALHO; SATO, 2001).

3.5.2.3 Contínuo

A reação em modelo contínuo ocorre quando todas as espécies químicas da reação são mantidas em taxas constantes de entrada e saída, e demanda um controle muito grande do processo para que não haja desvio no processo, ocasionando morte das leveduras e, conseqüentemente, elevados custos de produção (ATALA et al., 2000). Segundo PACHECO, (2010), algumas das vantagens de se conduzir o processo de forma contínua podem ser listadas como sendo:

- Maior produtividade;
- Menor volume de equipamentos;
- Redução do consumo de insumos;
- Trabalhar no estado estacionário.

Porém também existem desvantagens, que são elas:

- Dificuldade de operação do processo em estado estacionário;
- Dificuldade de manutenção e assepsia;
- Investimento alto em automação e controle de processo.

3.6 Fatores que afetam a fermentação

Muitos são os fatores que afetam o processo de fermentação alcoólica. Parâmetros como temperatura e pH têm enorme importância no andamento da reação. As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* são substâncias mesófilas, o que significa que a produção de etanol têm uma faixa de temperatura entre 26 e 35°C, podendo chegar até 38°C nas indústrias. O acréscimo de temperatura aumenta a produtividade das leveduras, mas também aumenta a sua sensibilidade quanto à toxicidade do etanol (DE ALMEIDA LIMA, 2019).

Assim como a temperatura, o controle do pH tem um papel importante para a fermentação. Em meios ácidos, altos rendimentos de etanol são alcançados devido à redução da produção de glicerol e da contaminação bacteriana. A faixa adequada de pH para a fermentação é entre 4 a 5 (DE ALMEIDA LIMA, 2019).

O processo de fermentação alcoólica pode sofrer inibição de diferentes tipos.

3.6.1 Produto

O etanol é o principal produto da fermentação de açúcares por leveduras, e seu efeito inibitório acontece a partir de concentrações de 40g/L. Alguns fatores interferem na sensibilidade da levedura ao etanol, como por exemplo a temperatura, e o efeito inibitório pode parar por completo o crescimento microbiano ao atingir a concentração de 90g/L. A medida que o produto é acumulado no meio reacional, se torna agente causador de estresse para as leveduras (FERNANDES, 2008).

3.6.2 Substrato

As leveduras também sofrem efeitos inibitórios causados pelo excesso de substrato no meio reacional, pois apresentam uma osmotolerância limitada. O estresse causado pelo aumento da concentração externa à levedura leva a redução em crescimento e a perda de viabilidade celular. Esta inibição pode ocorrer em faixas de concentração superiores à 150g/L de substrato (GUIDINI, 2013).

3.6.3 Contaminação Bacteriana

Durante a fermentação, microrganismos contaminantes podem se desenvolver na dorna a depender de condições de operação como pH, assepsia, concentração de açúcares, etc. Estes microrganismos competem com a levedura pelo substrato, geram subprodutos que inibem o seu crescimento, aumenta a acidez do caldo, forma espumas e promovem a floculação das leveduras, além de produzirem substâncias que aumentam o estresse celular como ácido lático (DARÉ, 2008).

3.7 Crescimento microbiano.

Existem vários modelos que representam o crescimento microbiano na literatura, sendo o mais simples o modelo proposto por MONOD (1942). Este modelo apresentado

abaixo relaciona a velocidade específica de crescimento do microrganismo com a concentração de substrato.

$$\mu_x = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{(K_S+S)} \quad (3.1)$$

Onde $\mu_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima de crescimento e K_S a constante de saturação, sendo que ambos são obtidos empiricamente.

Monod não considerou, em seu trabalho, nenhum tipo de inibição, e posteriormente diversos outros estudos que levavam em conta inibições causadas por diversos fatores foram desenvolvidos e outros modelos foram publicados.

O modelo proposto por LEVENSPIEL, (1980) considera a concentração de produto como inibidora, ANDREWS, (1968) propôs um modelo com inibição por substrato e Lee et al., (1983) propôs um modelo que considerava inibição por concentração de células. Com uma combinação dos três modelos propostos, foi desenvolvido o modelo de inibição mista apresentado na Equação 3.2:

$$r_x = \mu_{m\acute{a}x} \exp(-K_i S) \frac{S}{K_S+S} \left(1 - \frac{X}{X_{m\acute{a}x}}\right)^m \left(1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}}\right)^n X \quad (3.2)$$

Onde K_i é a constante de inibição pelo substrato, K_S a constante de saturação, $X_{m\acute{a}x}$ é concentração de células quando a reação cessa, $P_{m\acute{a}x}$ é a concentração de produto quando a reação cessa, m é o parâmetro para descrição da inibição celular e n o parâmetro para a inibição por produto.

RAMOS DE ANDRADE et al., (2013) acrescentou à equação 3.2, em seu trabalho, um termo que contabiliza a inibição por ácido acético que está apresentada na equação 3.3.

$$r_x = \mu_{m\acute{a}x} \exp(-K_i S) \frac{S}{K_S+S} \left(1 - \frac{X}{X_{m\acute{a}x}}\right)^m \left(1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}}\right)^n X \left(1 - \frac{C_{Ac}}{C_{Ac\ m\acute{a}x}}\right)^{nn} \quad (3.3)$$

Onde C_{Ac} é a concentração de ácido acético, $C_{Ac\ m\acute{a}x}$ é a concentração de ácido acético quando a reação cessa por conta da inibição e nn é o parâmetro para inibição por ácido acético.

3.8 Formação de produto

Para representar a taxa de formação de produto r_P , o modelo de (LEUDEKING-PIRET, 1959) é um dos mais utilizados, pois apresenta um bom ajuste para diversos tipos de fermentação (ANDRADE, 2007).

$$r_P = Y_{P/X}r_X + m_P X \quad (3.4)$$

Sendo $Y_{P/X}$ o rendimento de produto baseado em células e m_P a produção de etanol não associada ao crescimento.

3.9 Consumo de substrato

Segundo (JAMES; JAMES; OLLIS DAVID, 1986), no caso da fermentação alcoólica em processos em batelada, o consumo de substrato (Eq. 3.4) acontece junto com o crescimento microbiano, sendo esta cinética chamada de associada ao crescimento.:

$$r_S = \frac{R_X}{Y_X} + m_X X \quad (3.5)$$

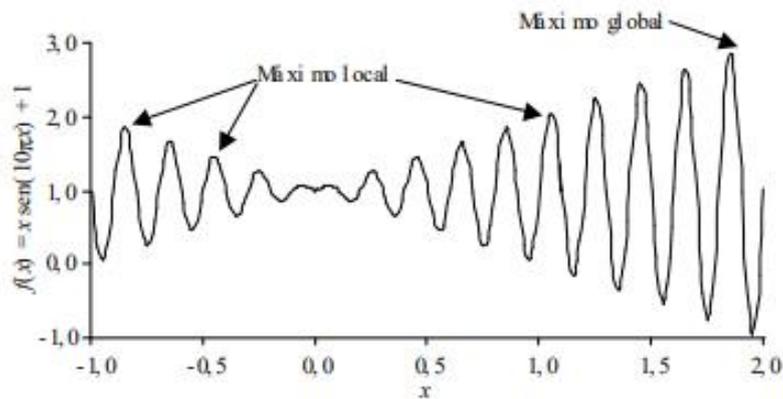
Sendo Y_X o coeficiente global de células, e m_X o parâmetro de manutenção.

3.10 Otimização

O conceito de otimização é definido como sendo o processo de busca da melhor solução dentro de um conjunto de possíveis soluções. Métodos de otimização são de extrema importância, uma vez que são empregados em diversos problemas para encontrar o maior valor de uma função, ou o menor custo de um determinado projeto.

Pode-se dividir os algoritmos de otimização em globais e locais. Algoritmos de otimização globais são os que encontram a solução ótima a partir de qualquer ponto do espaço de busca, enquanto os algoritmos locais encontram os valores de máximo ou mínimo locais de uma função, sendo dependentes de configurações iniciais (RENÓ, 2007). Na Figura 4 está ilustrado máximos locais e global de uma função.

Figura 4: Máximos locais e global da função $f(x) = x \sin(10\pi x) + 1$

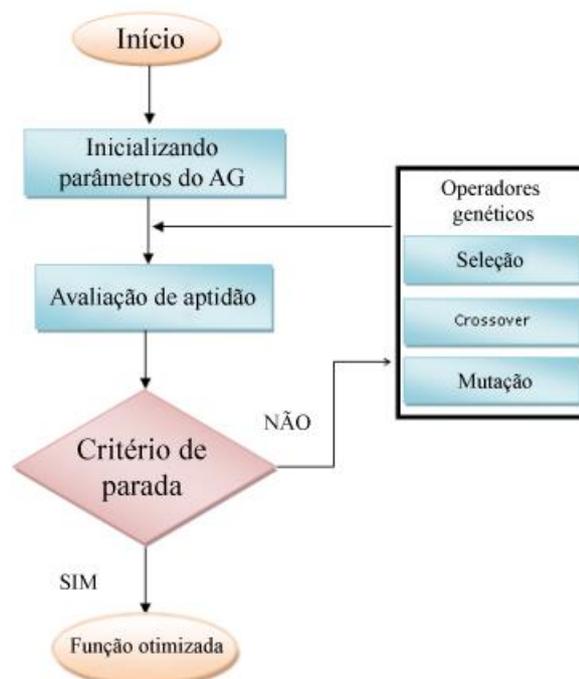


Fonte: (DE LACERDA; DE CARVALHO, 1999)

3.10.1 Algoritmo genético

Algoritmos genéticos (AG) são métodos que tomam como inspiração a evolução e sobrevivência dos mais fortes, princípio darwiniano de seleção natural. Desenvolvido por John Holland, o algoritmo segue os princípios da natureza nos quais os indivíduos mais aptos são privilegiados, portanto com maior probabilidade de reprodução e desta forma, maiores chances de perpetuar seus códigos genéticos para as próximas gerações (PACHECO, 1999). O funcionamento do algoritmo genético e sua estrutura geral está ilustrada na Figura 5 abaixo:

Figura 5: Fluxograma de funcionamento do algoritmo genético



fonte: adaptado de (SHABIR; SINGLA, 2016)

Os AGs tratam da evolução dos indivíduos (cromossomos) a partir de uma população inicial, selecionando e analisando a aptidão individual e aplicando operadores genéticos (mutação, crossover) até que se tenha a solução ótima para o problema. Assim como o algoritmo genético é inspirado na biologia, a terminologia também o é. A tabela 1 abaixo representa o termo e seu respectivo significado, disponível em (DE LACERDA; DE CARVALHO, 1999).

Tabela 1: Significados de terminologias dos algoritmos genéticos

Termo	Significado
Cromossomo	Estrutura de dados que codifica uma solução para o problema
Indivíduo	Cromossomo e sua aptidão
População	Conjunto de indivíduos, ou seja, pontos e candidatos a solução do problema
Gene	Parametro codificado no cromossomo. Elemento que descreve certa variável
Geração	Iterações executadas pelo algoritmo
Operações Genéticas	Operações realizadas pelo algoritmo sobre os cromossomos (crossover e mutação)
Mutação	Modificação aleatória do cromossomo com intuito de gerar novos indivíduos (novas possíveis soluções)
Genótipo	Informação contida no cromossomo
Alelo	Valores que o gene pode assumir

Algumas vantagens podem ser destacadas ao se usar algoritmos genéticos, como por exemplo usar diretamente a função a ser otimizada, sem necessidade de encontrar derivadas de funções complexas (SHAPIRO, 1999).

3.10.1.1 População inicial

A população inicial de indivíduos é comumente gerada de forma aleatória, podendo também ser geradas dentro de um intervalo conhecido de onde a solução ótima se encontra. Implementar restrições acelera a solução do problema, porém segundo GOLDBERG (1989) isso não é obrigatório, desde que a população inicial contenha cromossomos suficientes.

3.10.1.2 Seleção

Inspirado no modelo de seleção natural dos mais aptos, o algoritmo genético seleciona os melhores cromossomos da população inicial para gerar cromossomos filhos através de operações genéticas de mutação e crossover. Geralmente os pais são selecionados com probabilidade proporcional à sua aptidão (DE LACERDA; DE CARVALHO, 1999).

Existem diferentes algoritmos para a seleção dos pais, podendo ser pela roleta onde os cromossomos são ordenados de forma a preencherem uma roleta com área proporcional à sua aptidão, tendo mais chance de ser escolhidas em cada rodada da roleta os cromossomos que possuem maior área, até que se complete o número necessário de cromossomos para as operações genéticas. (RIVERA, 2017).

No método de seleção por torneio, são escolhidos n ($n \geq 2$, porém normalmente $n = 3$) ao acaso com iguais probabilidades, e o de maior aptidão é selecionado enquanto o restante é descartado, até que se complete o número necessário para as operações genéticas (DE LACERDA; DE CARVALHO, 1999).

O melhor cromossomo pode ser perdido de uma iteração para outra devido ao corte do crossover ou a ocorrência de mutação. Desta forma é interessante transferir o melhor cromossomo de uma geração para a outra para que o melhor resultado encontrado até o momento não se perca. Esta metodologia é chamada de elitismo (MOREIRA NETO, 2011).

3.10.1.3 Operadores genéticos

Os operadores genéticos são funções aplicadas em indivíduos de cada geração para se obter uma população nova. Dois tipos de operadores genéticos são mais utilizados, sendo eles (PACHECO, 1999):

- **Crossover:** Este operador é responsável por combinar características dos pais em novos indivíduos que vão herdar estas características. A ideia é que os herdeiros sejam melhores que os progenitores.
- **Mutação:** Processo pelo qual os indivíduos que foram recombinados na etapa de crossover são submetidos. Este operador modifica o valor de um ou mais genes do indivíduo com o objetivo de aumentar a diversidade da população.

De uma forma simplificada, os indivíduos selecionados na etapa de seleção se reproduzem e a nova geração herda os genes dos progenitores. Os novos indivíduos são submetidos aos operadores genéticos onde são recombinados (crossover) com uma probabilidade p_c , e passam pelo processo de mutação com probabilidade p_m , conforme mostra as Figuras 6 e 7 abaixo.

Figura 6: Recombinação de um ponto (one-point crossover)

				ponto de corte aleatório
G1	1	1	0	0 0 0
G2	0	0	0	1 0 0
D1	1	1	0	1 0 0
D2	0	0	0	0 0 0

fonte: (PACHECO, 1999)

Figura 7: Mutação de um cromossomo

C1	1	1	1	1	0	0	antes
C1	1	1	1	1	0	1	depois da mutação



fonte: (PACHECO, 1999)

3.10.1.4 Critérios de parada

Critérios de parada são condições que quando atingidas, encerra a execução do algoritmo. Segundo LACERDA e CARVALHO, (1999):

- Quando um determinado número de iteração é alcançado, tendo ou não chegado ao resultado ótimo para a função, o algoritmo é interrompido;
- Quando as iterações apresentam valores suficientemente próximos aos obtidos nas iterações anteriores (convergência);
- Quando se conhece o valor da função objetivo e este valor é alcançado, o algoritmo é interrompido.

4 METODOLOGIA

4.1 Dados experimentais

Os dados experimentais utilizados neste trabalho são dados de fermentação alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae* utilizando hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento com H₂SO₄ diluído e deslignificado com NaOH. As fermentações foram realizadas nas temperaturas de 30, 32, 34, 36 e 38°C sendo estes resultados obtidos da tese de MARTINS (2015). A tese foi desenvolvida no Laboratório de Engenharia de Processos Fermentativos e Enzimáticos presente na Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, e abaixo está apresentada a metodologia realizada pela autora do trabalho para a obtenção dos dados:

4.1.1 Matéria prima

Os ensaios foram conduzidos com bagaço de cana-de-açúcar fornecido pela Usina da Pedra, doada pelo Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE), situado na cidade de Campinas-SP. A matéria foi seca em temperatura ambiente até uma umidade de 6 a 10%.

4.1.2 Pré-tratamento com H₂SO₄ diluído

O bagaço de cana foi pesado e teve o teor de umidade descontado, e em seguida, variando condições de concentração de sólidos e tempo de reação, foram transferidos para frascos com volume reacional de 100mL de com concentração de 1% (m/v) de ácido sulfúrico, e estes frascos foram então transferido para a autoclave na condição de 121°C e 1 atm. Após a despressurização da autoclave, os frascos foram resfriados por 15 minutos e em seguida o bagaço pré-tratado foi filtrado para a retirada do licor do pré-tratamento. Após filtrado, o bagaço foi lavado com água corrente até o pH neutro. Posteriormente, o bagaço foi secado e armazenado em sacos protegidos de umidade e onde tiveram a composição química do bagaço pré-tratado analisada

4.1.3 Deslignificação do bagaço pré-tratado

O bagaço pré-tratado com H_2SO_4 diluído, com 20% de volume de sólidos e 150 minutos (ensaio 3 do trabalho de Martins (2015)) foi submetido ao tratamento com NaOH 1% (m/v). Para isto, o material foi seco a temperatura ambiente até que fosse atingido uma umidade menor que 10%. Em seguida o material foi pesado e, descontando o valor da umidade, foi adicionado à solução 1% (m/v) de NaOH. Os frascos dos diferentes ensaios com diferentes condições de concentração de sólidos foram então fechados e levados à autoclave e mantido a 100°C por 1 hora. Após a reação, o material sólido foi separado do líquido pelo processo de filtração e lavado com água até atingir o pH neutro. O processo de lavagem foi realizado sobre uma peneira ultrafina para evitar a perda de massa.

4.1.4 Hidrólise enzimática

Nesta etapa o bagaço pré-tratado e deslignificado foi hidrolisado em uma concentração de 10, 20 e 30% de sólidos em solução tampão de citrato de sódio com um pH 4,8 a 0,05g/L complementado com 0,07% de azida sódica para cada grama de bagaço. Foram utilizados 15 FPU de celulase (EC 3.2.1.91) por grama de biomassa, e 25 CBU de β -glicosidase (3.2.1.21) por grama de biomassa no substrato da reação, que foi conduzida em um Erlenmeyer de 250 mL. Os frascos foram mantidos agitados a 150 rpm e a temperatura de 50°C. As análises da composição química do hidrolisado para o ensaio de 10% apresentou concentração de 54,52 g/L de glicose, um aumento de 43,06% frente ao resultado encontrado na hidrólise do bagaço pré-tratado apenas com H_2SO_4 que foi de 38,11 g/L.

4.1.5 Ensaio de fermentação

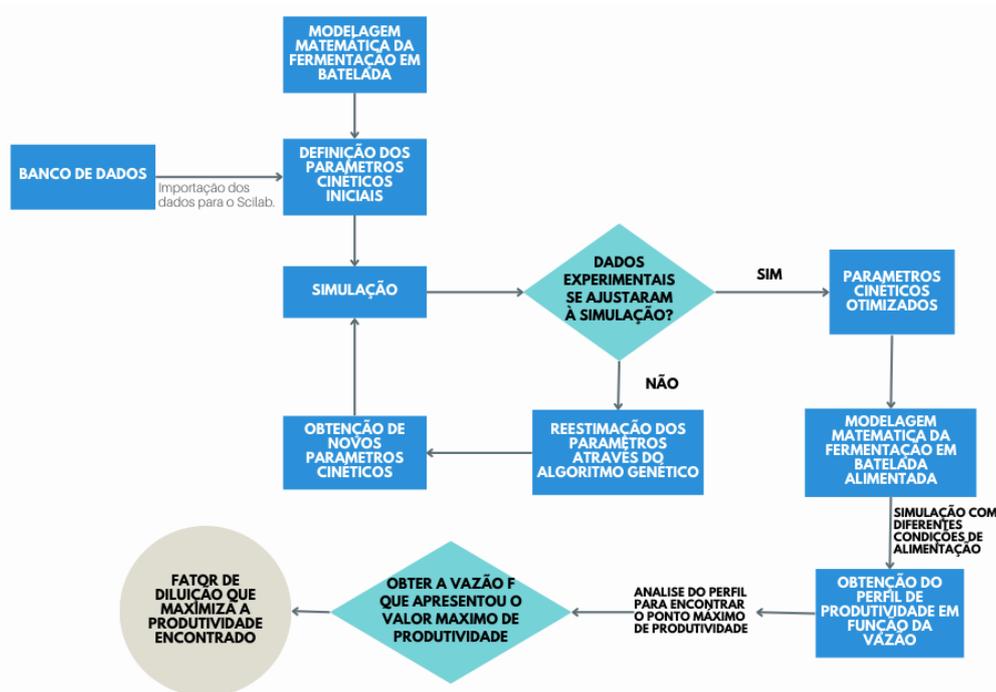
A etapa de fermentação ocorreu no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. O microrganismo utilizado foi obtido pela Usina Santa Adélia S/A, localizada em Jaboticabal – SP.

Foi preparado o meio de ativação e de crescimento do microrganismo, e após a esterilização do hidrolisado, deu-se início à etapa de fermentação, onde o inóculo crescido em meio sintético foi transferido para o Erlenmeyer contendo o hidrolisado, com uma concentração de glicose de aproximadamente 60 g/L. O volume reacional foi de 100 mL. Amostras de 2 mL foram retiradas para análises gravimétricas durante o período de 24 h. Os ensaios foram realizados nas temperaturas de 30, 32, 34, 36 e 38 °C.

4.2 Métodos matemáticos

Nesta parte do trabalho serão apresentados os métodos de tratamento dos dados experimentais, desde a importação do banco de dados até a simulação e estimação dos parâmetros cinéticos do modelo. O fluxograma está apresentado na Figura 8:

Figura 8: Fluxograma do código implementado no software Scilab para a obtenção do fator de diluição que maximiza a produtividade de etanol.



Fonte: Arquivo pessoal

4.2.1 Importação dos dados

Os dados de fermentação obtidos do trabalho de MARTINS, (2015) foram importados de uma planilha do Excel para o software Scilab através da subrotina *readxls*.

4.2.2 Modelagem matemática do processo em batelada.

Para a modelagem do processo de fermentação em batelada é necessário realizar o balanço de massa para todos os componentes presentes no meio reacional. A equação geral do balanço de massa está apresentada na equação 4.1.

$$\text{Acúmulo} = \text{Entra} - \text{Sai} + \text{Geração} - \text{Consumo} \quad (4.1)$$

Em um processo em batelada, não há entrada e nem saída de produtos e/ou substratos, dessa forma, a Eq. 4.1 pode ser simplificada para a eq. 4.2.

$$\frac{d(VC_i)}{dt} = Vr_i \quad (4.2)$$

Em que V é o volume reacional, C_i é a concentração do componente i, r_i é a velocidade de formação do componente i.

Ao assumir que o volume não sofre alterações significativas durante a reação, pois a coleta de amostras retira quantidades muito pequenas do meio, e as perdas dos gases para a atmosfera também são desprezíveis (ANDRADE, 2007), temos a Eq.4.3 para o componente i:

$$\frac{dC_i}{dt} = r_i \quad (4.3)$$

Aplicando a Eq. 4.3 para o perfil de concentração de células (X), produto (P) e substrato (S) ao longo do tempo de fermentação, obtém-se as Eqs. 4.4 a 4.6:

$$\frac{dX}{dt} = r_X \quad (4.4)$$

$$\frac{dP}{dt} = r_P \quad (4.5)$$

$$\frac{dS}{dt} = -r_S \quad (4.6)$$

Onde r_x , r_p e r_s são, respectivamente, a taxa de crescimento celular, formação de produto e consumo de substrato. A integral com relação ao tempo destas equações fornece o perfil de concentração de cada componente da fermentação.

Para a implementação deste sistema de EDOs no Scilab, foram utilizados as equações 3.2, 3.3 e 3.4 para as taxas r_x , r_p e r_s , respectivamente.

4.2.3 Subrotina ODE

Em posse do sistema de EDOs obtidos através do balanço de massa deste sistema, foi utilizada a sub-rotina ODE (Ordinary Differential Equations, ou Equações Diferenciais Ordinárias em português) disponível na biblioteca do Scilab. Esta sub-rotina utiliza um algoritmo de integração baseado no método de Runge-Kutta de 4ª ordem. A subrotina ODE recebe como variáveis de entrada um vetor contendo as condições iniciais do sistema de EDOs a ser resolvido, o tempo inicial dos ensaios, um vetor contendo o intervalo de integração desejado, 0 a 24 h com incremento de 0,01 entre cada tempo t_i , e a função a ser integrada, neste caso o sistema de EDOs obtido anteriormente na etapa de modelagem.

4.2.3.1 Estimativa dos parâmetros cinéticos por algoritmo genético

Os parâmetros cinéticos do modelo foram estimados por meio do algoritmo genético “optim_ga” presente na biblioteca do software Scilab. Nessa subrotina os parâmetros, dependentes e não dependentes da temperatura, são estimados pela minimização de uma função objetivo $E(\theta)$. θ é o vetor que contém todos os parâmetros cinéticos a serem otimizados. O objetivo da otimização é encontrar θ pela minimização da função objetivo (Equação 4.7)

$$E(\theta) = \sum_{n=1}^{np} \left[\frac{(X_n - X_{e_n})^2}{X_{e_{máx}}^2} + \frac{(S_n - S_{e_n})^2}{S_{e_{máx}}^2} + \frac{(P_n - P_{e_n})^2}{P_{e_{máx}}^2} \right] \quad (4.7)$$

Na Equação 4.7 np representa o número de amostras colhidas em cada experimento, X_{e_n} , S_{e_n} e P_{e_n} são dados experimentais de concentração de células, glicose (substrato) e etanol nos tempos de amostragem. X_n , S_n e P_n são as concentrações de células, glicose (substrato) e etanol preditas pelo modelo nos tempos de amostragem e os

subscritos *max* correspondem à maior concentração para cada variável, X, S e P, medidos experimentalmente.

4.3 Reestimação de parâmetros

Uma vez feita a estimação dos parâmetros do modelo matemático para os dados de fermentação em batelada conduzida a 30 °C, foi feita a reestimação dos parâmetros dependentes da temperatura ($\mu_{m\acute{a}x}$, $X_{m\acute{a}x}$, $P_{m\acute{a}x}$, Y_x , $Y_{P|X}$, C_{max} e n) para os ensaios conduzidos a 32, 34, 36 e 38°C.

4.4 Balanço de Massa para a reação em batelada alimentada

Para esta etapa do trabalho, o modelo cinético (Eqs. 4.4 a 4.6) foi adaptado para descrever o processo em batelada alimentada. Tendo em vista que o processo em batelada alimentada possui variação no volume reacional ao longo do tempo de reação, ao resolver a equação 4.1 para o balanço de massa global, temos:

$$\frac{d\rho V}{dt} = \rho F_0 - \rho F_s$$

Sendo ρ a densidade, F_0 a vazão volumétrica na alimentação e F_s a vazão volumétrica na saída do reator. Considerando a densidade constante durante o processo, e zerando o termo de saída, temos a equação 4.9

$$\frac{dV}{dt} = F \tag{4.8}$$

Realizando o balanço de massa para os demais componentes da reação, temos o seguinte sistema de equações diferenciais:

$$\frac{dX}{dt} = r_x - \frac{XF}{V} \tag{4.9}$$

$$\frac{dP}{dt} = r_P - \frac{PF}{V} \tag{4.10}$$

$$\frac{dS}{dt} = -r_S + \frac{F(S_{alim} - S)}{V} \tag{4.11}$$

Onde S_{alim} corresponde a concentração de substrato na vazão de alimentação, e V o volume reacional. As taxas de formação e consumo de cada componente foram as mesmas utilizada na modelagem do processo em batelada.

4.5 Determinação da vazão ótima de alimentação

O sistema de EDOs obtido no seção 4.4 foi implementado no software Scilab a fim de determinar o valor de F que maximiza a função objetivo descrita pela equação (4.12).

$$Prod = \frac{P_{final}}{t_{total}} \quad (4.12)$$

O comportamento da produtividade, ao ser alterada a vazão de alimentação, teve a tendência analisada, e desta forma foi definida a vazão que apresentou maior produtividade. As condições iniciais do problema adotadas nesta etapa do trabalho estão apresentadas na Tabela 2 abaixo:

Tabela 2: Condições iniciais da fermentação em batelada alimentada adotadas.

V_0 (L)	X_0 (g/L)	S_0 (g/L)	S_{alim} (g/L)
0,2	1,1	0	58

Fonte: Arquivo pessoal

Estes valores foram adotados simulando um biorreator de bancada, com volume útil de 2L, simulando as condições de operação industriais onde inicialmente, as dornas são preenchidas com o inóculo em aproximadamente 10% do volume do biorreator. Para um resultado mais confiável, foi adotado valores de concentração de substrato e levedura próximos aos valores do banco de dados utilizado para o ajuste dos parâmetros cinéticos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Simulações iniciais do processo em batelada

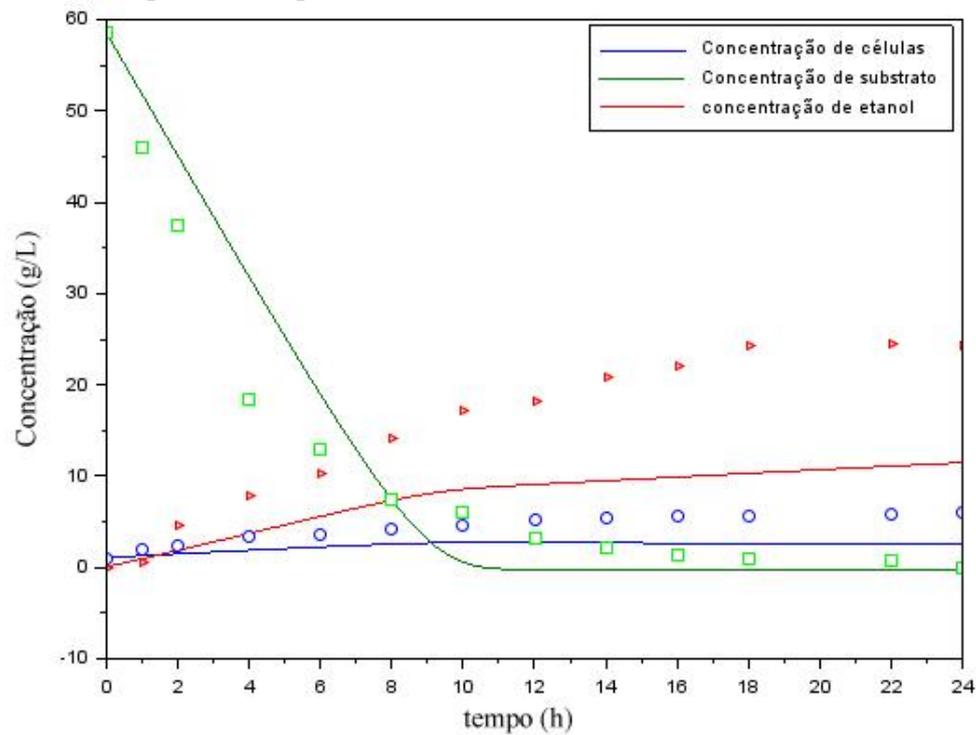
Foram realizadas simulações do processo de fermentação alcoólica, onde o mosto utilizado no processo foi o hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar submetido ao pré-tratamento com H_2SO_4 diluído e posteriormente deslignificado com NaOH 1% (m/v). As fermentações foram conduzidas a 30, 32, 34, 36 e 38°C. As simulações iniciais para cada temperatura foram feitas utilizando os parâmetros cinéticos determinados por Andrade (2012) apresentados na Tabela 3, que foram obtidos através do ajuste de parâmetros cinéticos de uma fermentação em regime batelada do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com peróxido de hidrogênio, e as concentrações iniciais de massa seca (células de leveduras), glicose e etanol ao início de cada fermentação do banco de dados a tese de Martins (2015) foram adotadas como condições iniciais da simulação. Os resultados apresentados para cada simulação, assim como os dados experimentais, estão apresentados nas Figuras 10 a 14.

Tabela 3: Parâmetros cinéticos utilizados como parâmetros iniciais da simulação.

Parâmetro	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1})	$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	$P_{m\acute{a}x}$ (g/L)	Y_x	$Y_{p/x}$	K_s (g/L)	K_i (g/L)	m_x	m	n	m_p
Valor adotado	0,224	79,936	129,915	0,045	3,967	4,10	0,004	0,20	1,00	1,5	0,10

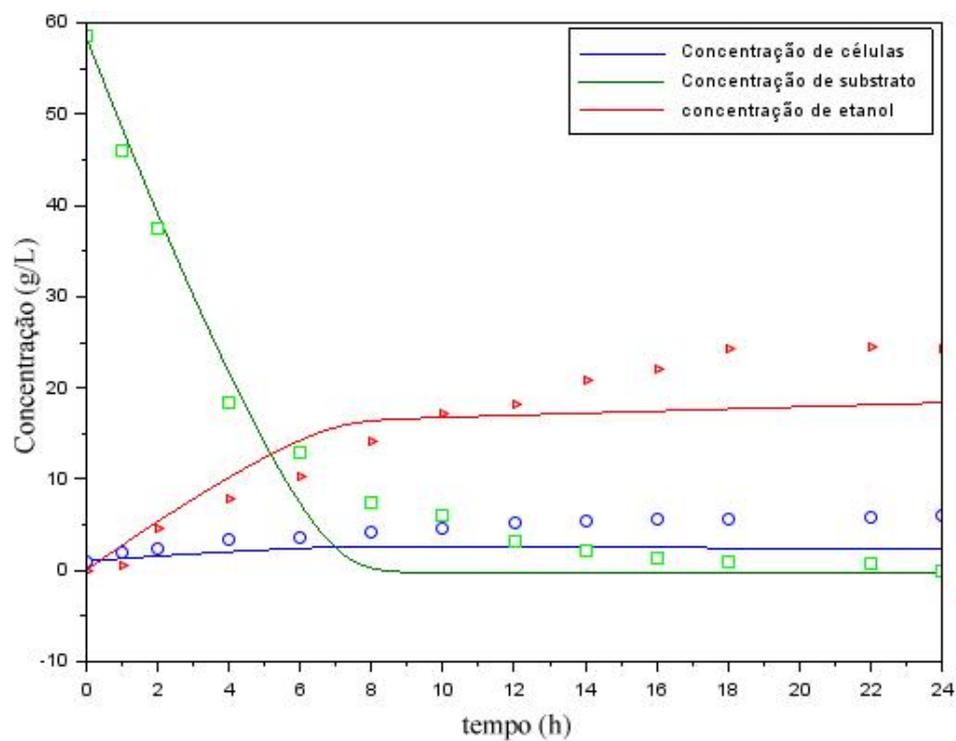
Fonte: adaptado de ANDRADE (2012)

Figura 9: Resultado da simulação da fermentação em batelada a 30°C expressa em g/L versus tempo (h) com parâmetros cinéticos obtidos de Andrade et al (2012).



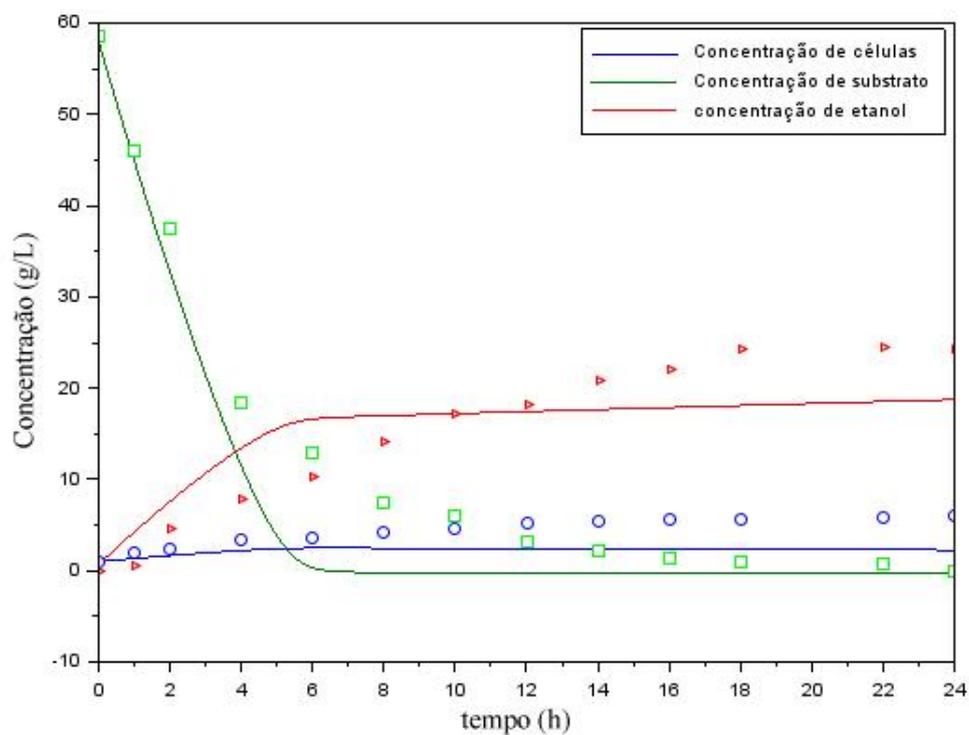
fonte: Arquivo pessoal

Figura 10: Resultado da simulação da fermentação em batelada a 32 °C expressa em g/L versus tempo (h) com parâmetros cinéticos obtidos de Andrade et al (2012).



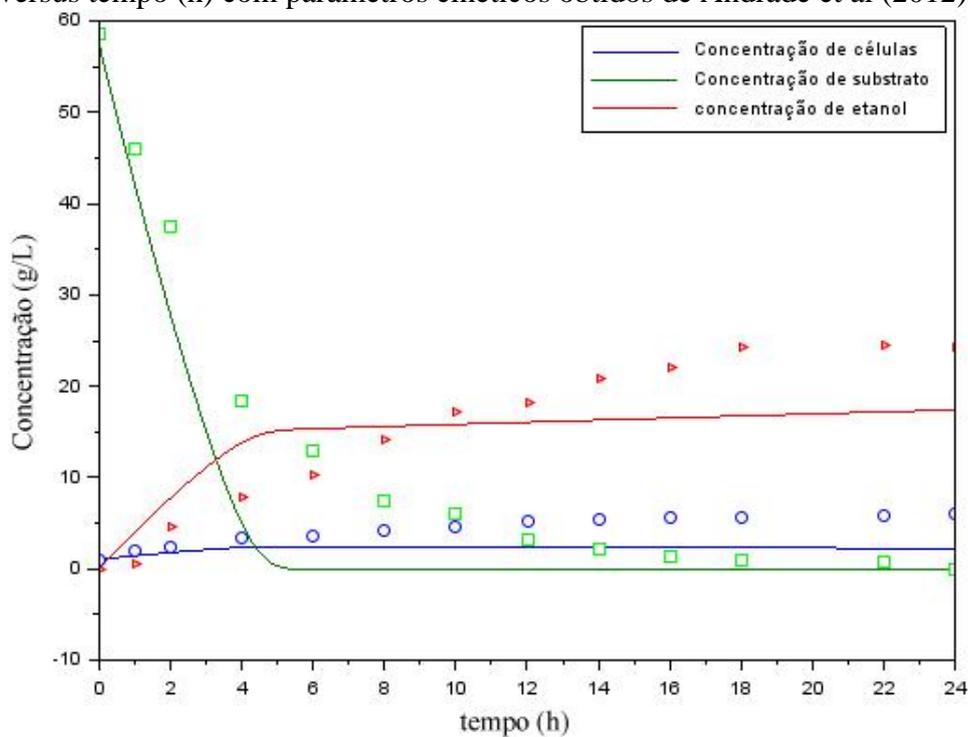
fonte: Arquivo pessoa

Figura 11: Resultado da simulação da fermentação em batelada a 34 °C expressa em g/L versus tempo (h) com parâmetros cinéticos obtidos de Andrade et al (2012).



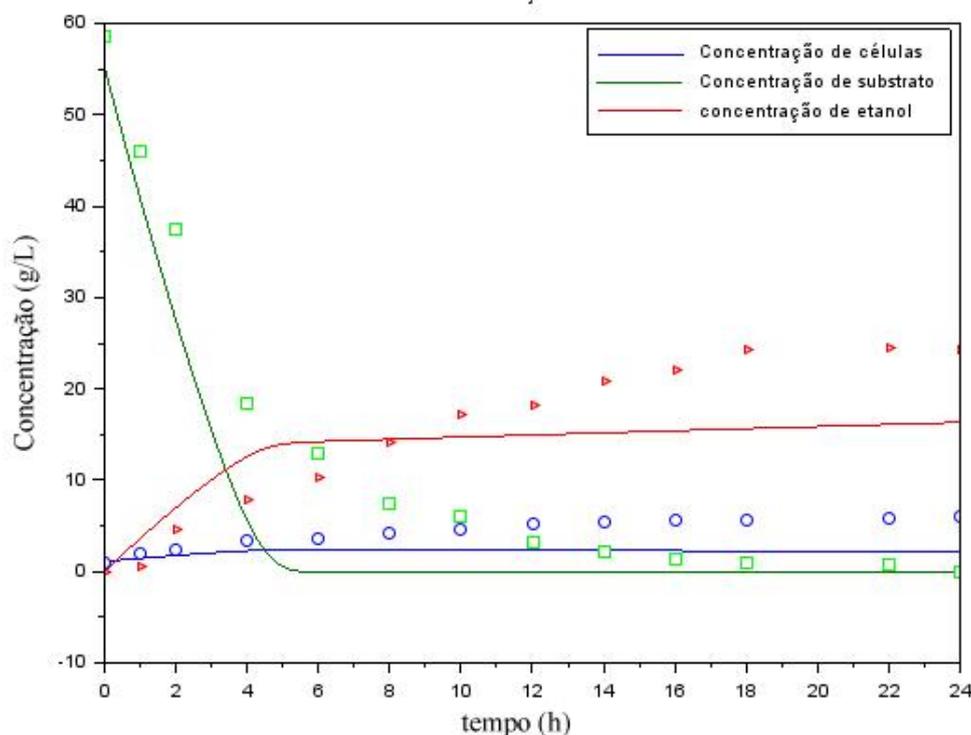
fonte: Arquivo pessoal

Figura 12: Resultado da simulação da fermentação em batelada a 36 °C expressa em g/L versus tempo (h) com parâmetros cinéticos obtidos de Andrade et al (2012).



fonte: Arquivo Pessoal

Figura 13: Resultado da simulação da fermentação em batelada a 38 °C expressa em g/L versus tempo (h) com parâmetros cinéticos obtidos de Andrade et al (2012).



fonte: Arquivo Pessoal

Como esperado, as simulações com os parâmetros iniciais não apresentaram resultados suficientemente próximos aos obtidos nos ensaios experimentais e, desta forma, foi realizada a etapa de otimização.

5.2 Ajuste dos parâmetros cinéticos do processo em batelada

Com o auxílio do software Scilab, e das sub-rotinas ODE e optim_ga de sua biblioteca, foram determinados os parâmetros que minimizaram a função objetivo (Eq. 4.7). Os parâmetros independentes da temperatura foram determinados para a temperatura de 32°C e posteriormente fixados para a simulação da reação em batelada nas demais temperaturas.

Tabela 4: Parâmetros otimizados não dependentes da temperatura.

Parametros não dependentes da temperatura					
K_s	K_i	M_p	M_x	M	n
4,581	0,010	0,104	0,141	1,178	1,522

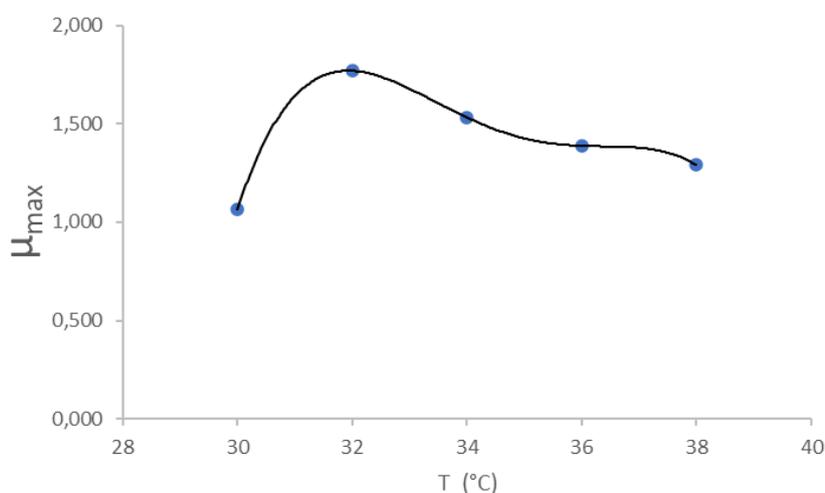
Os valores para os parâmetros não dependentes da temperatura obtidos estão próximos aos obtidos por ATALA et al. (2001), que foram obtidos através do ajuste de parâmetros cinéticos do modelo aos dados experimentais de um processo de fermentação do melaço de cana-de-açúcar com altas concentrações de biomassa considerando o efeito da temperatura. Os parâmetros dependentes da temperatura foram obtidos e seus valores estão apresentados na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5: Parâmetros dependentes da temperatura para reações em batelada nas temperaturas de 30, 32, 34, 36 e 38°C.

T (°C)	μ_{\max}	X_{\max}	P_{\max}	$Y_{p x}$	Y_x	C_{\max}	Nn
30	1,065	68,385	17,715	3,087	0,086	2,301	2,273
32	1,769	60,573	17,697	3,521	0,081	1,785	1,852
34	1,532	31,103	18,941	3,052	0,089	1,553	2,901
36	1,388	15,105	19,114	3,131	0,089	1,392	5,503
38	1,290	12,110	19,040	3,113	0,093	1,500	5,544

O comportamento obtido para o parâmetro μ_{\max} foi de um aumento inicial ao aumentar a temperatura, seguido de uma queda para temperaturas mais elevadas, conforme mostrado na Figura 14, esse é um comportamento esperado de um processo fermentativo. Os valores obtidos, porém, foram ligeiramente mais altos que os obtidos por Atala et. al (2001). Essa diferença pode ter se dado pois, na ocasião, a fermentação foi conduzida a partir do melaço, que contém altas concentrações de substrato, o que pode ter ocasionado inibição às células.

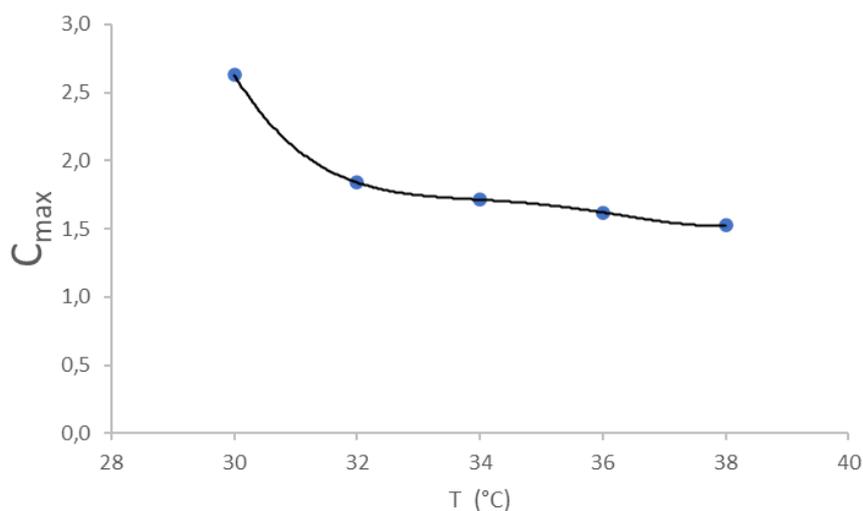
Figura 14: comportamento de μ_{\max} em função da temperatura



fonte: Arquivo pessoal

O parâmetro $C_{\text{máx}}$ apresentou tendência de queda com o aumento da temperatura, o que pode ser explicado pelo fato de que elevadas temperaturas deixam as leveduras mais sensíveis a substâncias tóxicas à elas, fazendo com que seja menor a quantidade máxima destes produtos no meio reacional, conforme mostra a Figura 15.

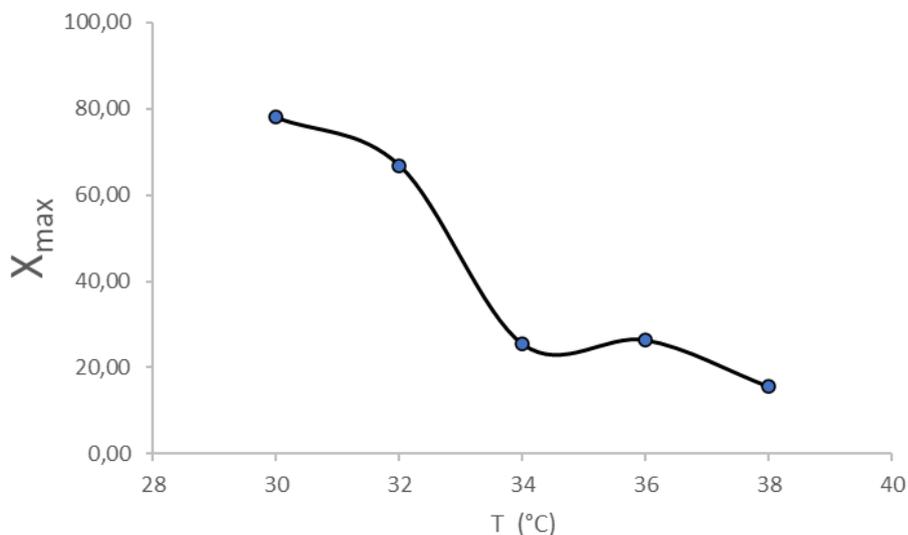
Figura 15: comportamento de $C_{\text{máx}}$ em função da temperatura



fonte: Arquivo pessoal

Devido ao aumento da sensibilidade das leveduras à substâncias tóxicas com o aumento da temperatura, o comportamento do $X_{\text{máx}}$ também diminuiu com a temperatura, tendo em vista que o meio reacional fica mais tóxico para as leveduras, a atividade celular também diminuiu, o que está mostrado na Figura 16.

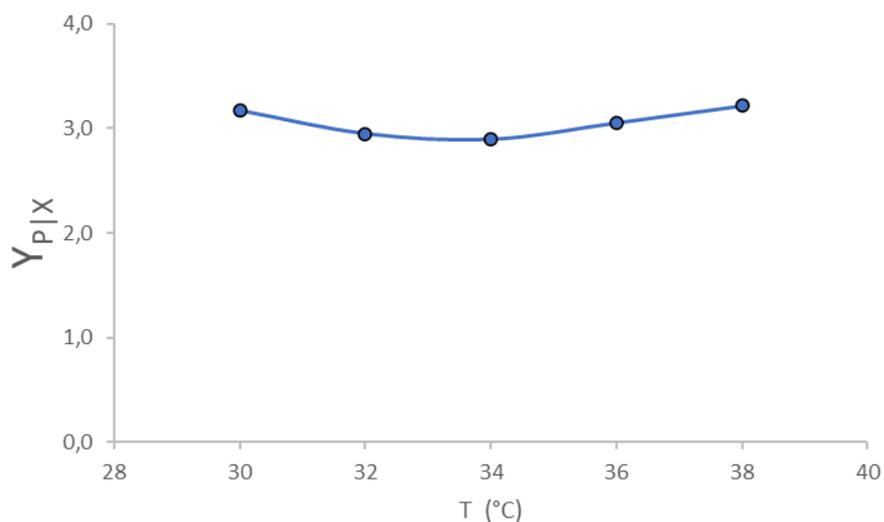
Figura 16: comportamento de $X_{\text{máx}}$ em função da temperatura



fonte: Arquivo pessoal

Com o aumento da temperatura a levedura tende a produzir mais etanol, alterando a produtividade $Y_{P|X}$. Conforme a Figura 17 abaixo, observou-se um pequeno aumento de produtividade com a temperatura para os ensaios a partir de 34°C.

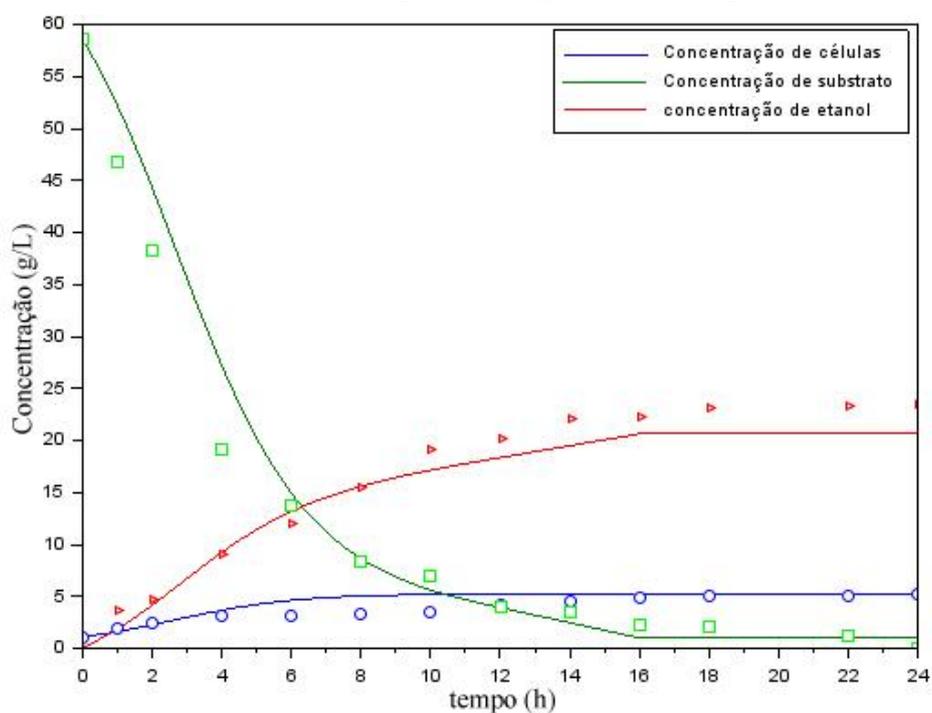
Figura 17: comportamento de $Y_{P|X}$ em função da temperatura



fonte: Arquivo pessoal

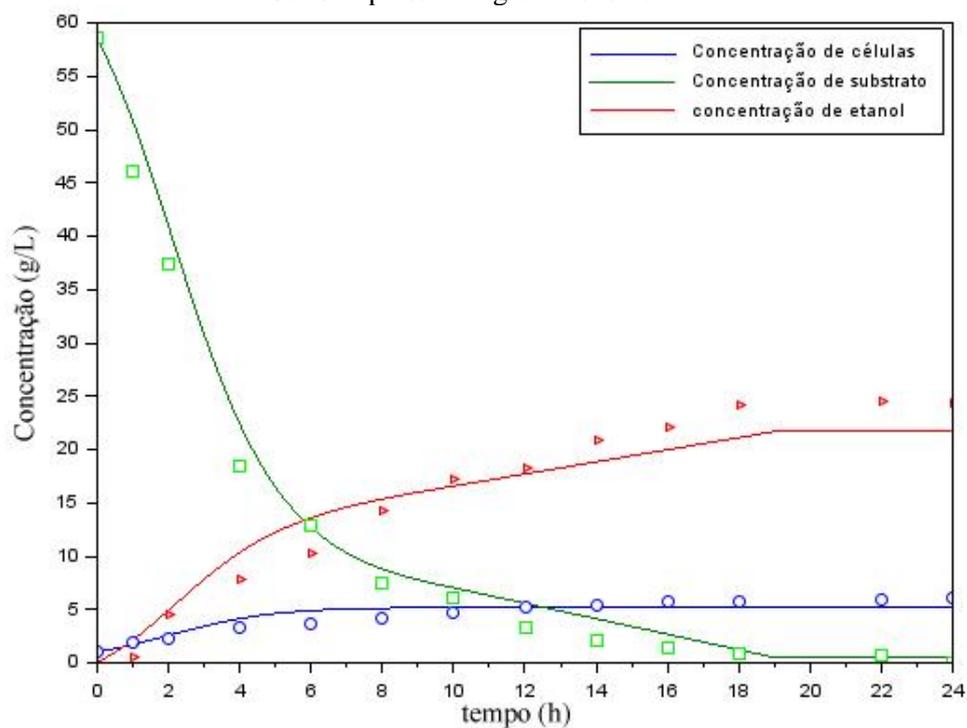
Os perfis de concentração obtidos para a reação em batelada, com os parâmetros ajustados, estão apresentados nas Figuras 18 a 22 .

Figura 18: resultado da simulação da fermentação em batelada com os parâmetros otimizados a 30°C expressa em g/L versus tempo (h).



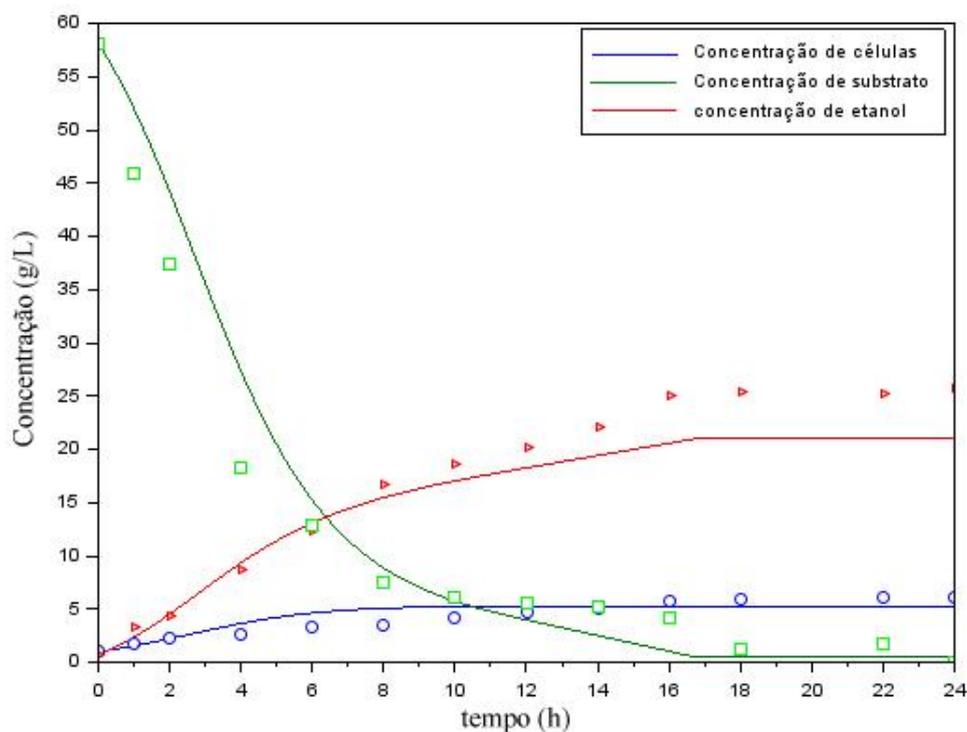
fonte: Arquivo pessoal

Figura 19: resultado da simulação da fermentação em batelada com os parâmetros otimizados a 32°C expressa em g/L versus hora.



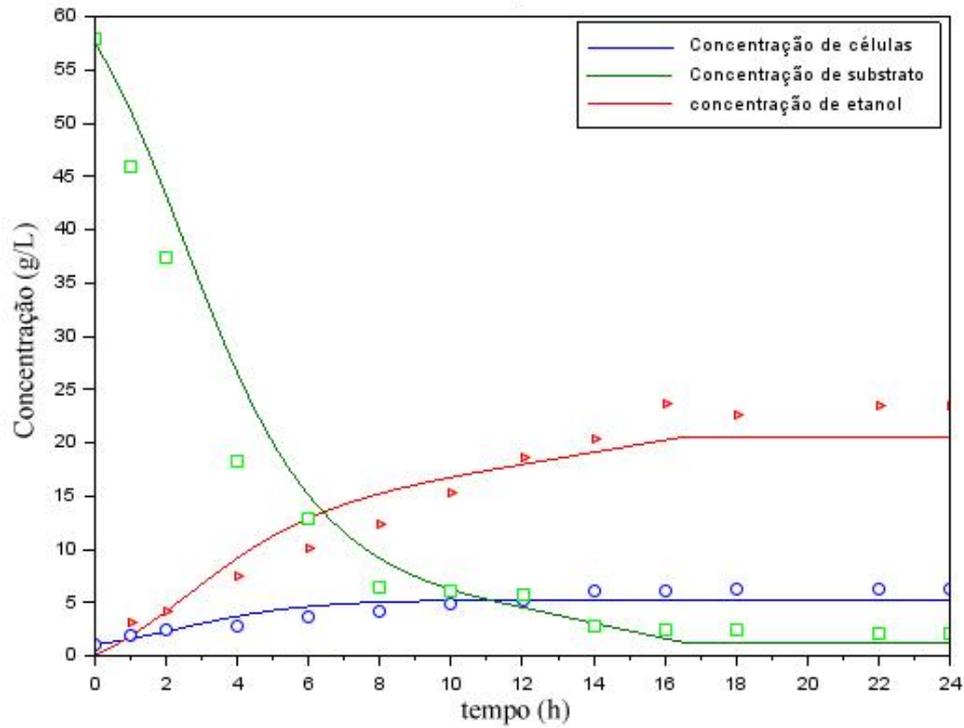
fonte: Arquivo pessoal

Figura 20: resultado da simulação da fermentação m batelada com os parâmetros otimizados a 34°C expressa em g/L versus hora.



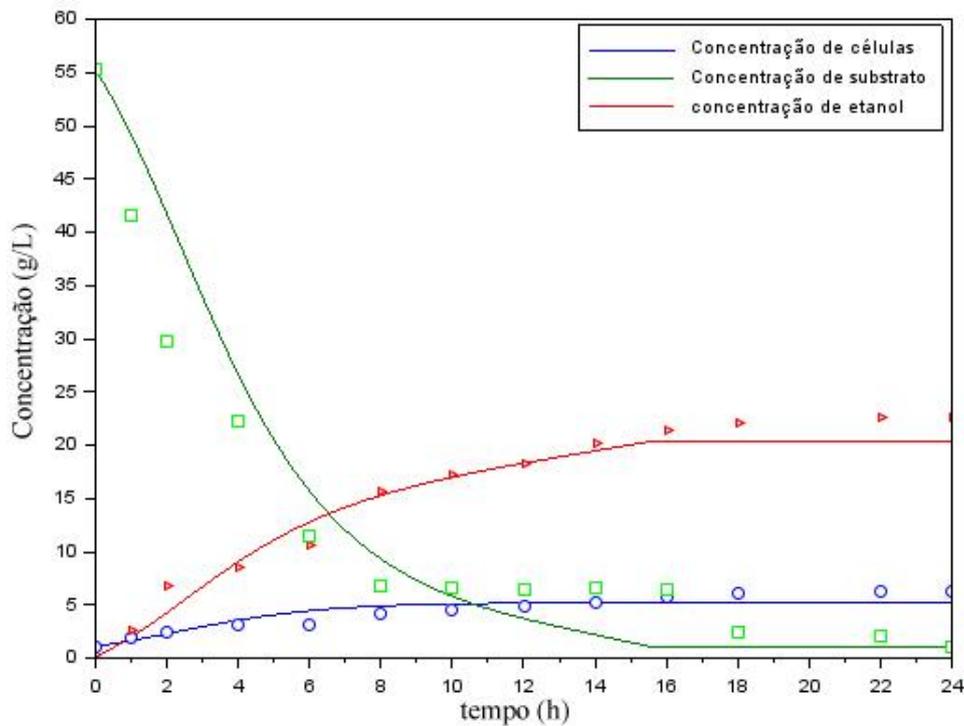
fonte: Arquivo pessoal

Figura 21: resultado da simulação da fermentação em batelada com os parâmetros otimizados a 36°C expressa em g/L versus hora



fonte: Arquivo pessoal

Figura 22: resultado da simulação da fermentação em batelada com os parâmetros otimizados a 38°C expressa em g/L versus hora.



fonte: Arquivo pessoal

A qualidade da previsão do modelo utilizando os parâmetros ajustados foi caracterizada utilizando o desvio-padrão residual (*RSD*), representado pela equação 5.1. A magnitude do *RSD* varia de acordo com a magnitude da variável, dado isso, o valor percentual é mais fácil para tomar as análises.

$$RSD (\%) = \frac{\sqrt{RSD}}{\bar{y}_i} * 100 \quad (5.1)$$

Onde:

$$RSD = \left(\sum_{i=1}^n \frac{(y_i - y_{pi})^2}{n} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (5.2)$$

No qual y_i é o valor experimental, y_{pi} o valor predito pelo modelo, n é o número de pontos experimentais e \bar{y}_i é a média dos valores experimentais.

Tabela 6: *RSD* de cada uma das variáveis em função da temperatura.

T°C	Células	Substrato	Produto
30	23,61%	22,23%	11,46%
32	14,39%	20,89%	13,18%
34	18,54%	19,57%	17,73%
36	16,99%	19,55%	14,26%
38	17,04%	9,67%	12,68%

Fonte: arquivo pessoal

Os valores abaixo de 25%, para o conjunto de dados, é considerado aceitável, segundo RIVERA et al. (2007). Desta forma, o modelo se ajustou de forma satisfatória aos dados experimentais.

A Tabela 7 abaixo apresenta o coeficiente de correlação entre os parâmetros ajustados obtidos e a temperatura. Este coeficiente é obtido através da equação (5.3), onde x e y são dois conjuntos de dados que se tem interesse em conhecer a correlação.

$$Correl(X, Y) = \frac{\sum(x-\bar{x})(y-\bar{y})}{\sqrt{\sum(x-\bar{x})^2 \sum(y-\bar{y})^2}} \quad (5.3)$$

Tabela 7: Correlação entre os parâmetros ajustados e a temperatura.

μ_{max}	X_{max}	P_{max}	$Y_{p x}$	Y_x	C_{max}	nn
-0,09	-0,93	0,51	0,21	0,71	-0,87	0,96

Valores próximos de 1 indicam que o parâmetro apresenta uma correlação linear com a temperatura, ou seja, aumenta sempre que a temperatura aumenta. Valores próximos de -1 apresentam correlação linear inversa com a temperatura, sendo diminuído com o incremento da temperatura. Valores próximos de 0 representam parâmetros que

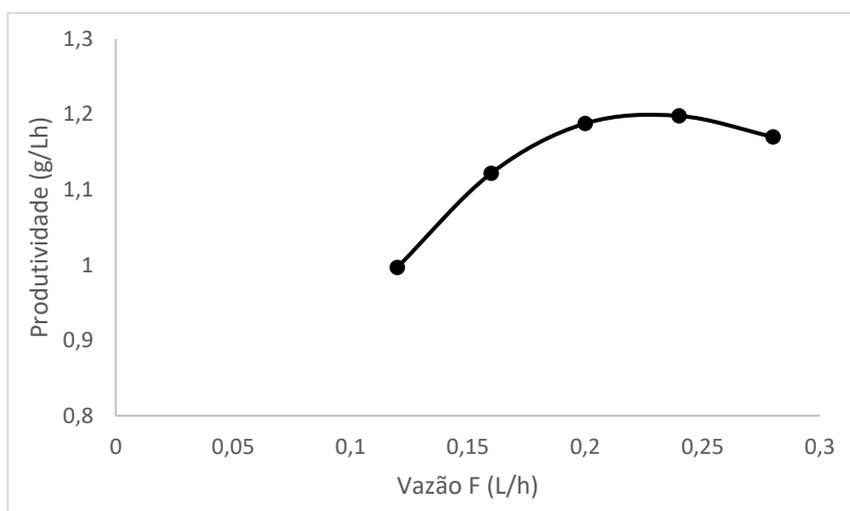
não possuem uma correlação linear com a temperatura, porém podem ser dependentes de outra forma.

Analisando estes valores, observa-se que o parâmetro P_{\max} não apresentou o comportamento esperado, que seria uma correlação negativa, o que significa que deveria diminuir ao se aumentar a temperatura o que pode ser o motivo dos valores de RSD elevados para algumas variáveis.

5.3 Simulação do processo em batelada alimentada

Com os parâmetros cinéticos obtidos na etapa anterior, para a temperatura de 38°C, que foi a que apresentou o melhor ajuste, foi implementado o modelo em batelada alimentada no software Scilab conforme apêndice II, adotando as condições iniciais apresentadas na Tabela 2. A simulação foi realizada adotando um biorreator hipotético de bancada com o volume útil de 2L, sendo completado durante a fase de alimentação até o 70% de seu volume, com a reação durando até a “morte” da dorna, onde o meio reacional não apresenta mais concentração de substrato suficiente para que a formação de etanol continue a ocorrer. A faixa do parâmetro F para a avaliação da produtividade foi de 0,12 a 0,28 L/h, que correspondem a tempos de enchimento de 4,3 a 10h, tendo em vista que nas indústrias, o tempo de enchimento das dornas no processo Melle-Boinot está dentro deste intervalo. A tendência da produtividade em função da vazão F está apresentada na Figura 23.

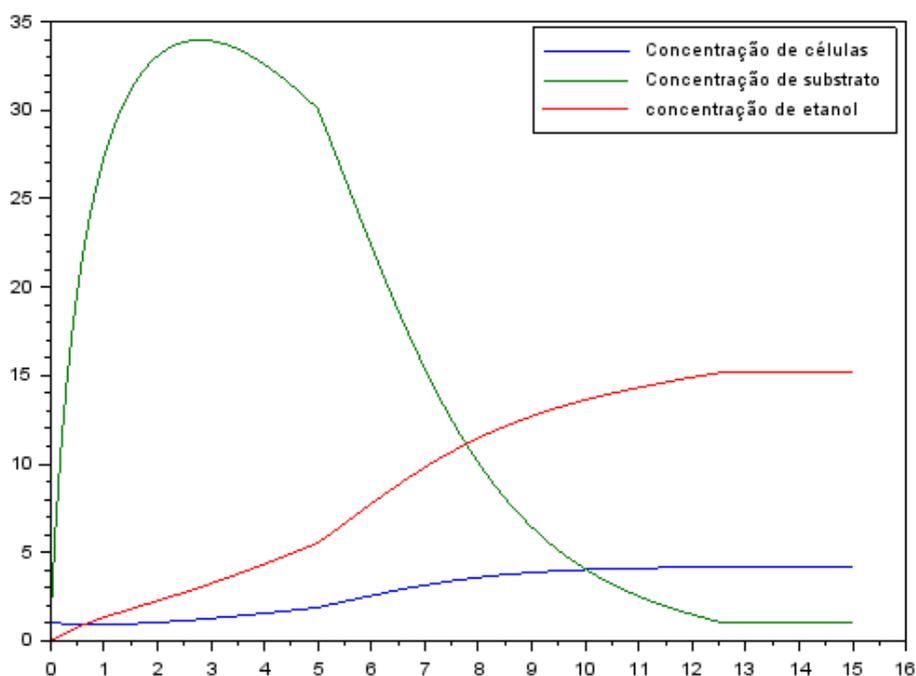
Figura 23: Comportamento da produtividade (g/Lh) em função da vazão de alimentação F (L/h) para a fermentação em batelada alimentada a 38°C.



Fonte: Arquivo pessoal

Analisando o comportamento da Figura 23, a produtividade máxima é em torno de $1,198 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{Lh}$, correspondendo a uma vazão de alimentação de aproximadamente $0,24 \text{ L/h}$, que foi o valor de vazão considerado como sendo o ótimo. Nesta vazão, a dorna leva cinco horas para ser preenchida até 70% do seu volume, e outras $7,7\text{h}$ para que todo o substrato seja consumido, gerando $15,212 \text{ g/L}$ de etanol ao fim da reação, em uma produtividade de $1,198\text{g/Lh}$, uma melhora de $27,31\%$ com relação a produtividade da reação no modelo em batelada para as mesmas condições, que foi $0,941 \text{ g/Lh}$. O perfil simulado para este processo está apresentado na Figura 24.

Figura 24: resultado da simulação da fermentação em batelada alimentada com os parâmetros otimizados a 38°C expressa em g/L versus hora, a uma vazão F de $0,24\text{L/h}$.



fonte: Arquivo pessoal

Os perfis de concentração simulados tiveram o comportamento esperado, onde a concentração de substrato aumentou durante o período de alimentação e, ao cortar a vazão F , teve um comportamento descendente pois, o que restou no meio reacional, passou a ser consumido. Já a concentração de etanol foi aumentando de forma contida durante a etapa de alimentação, sendo o etanol presente no mosto diluído conforme se é alimentado substrato à dorna, e após esta etapa, o crescimento foi mais acentuado. A concentração de células decaiu durante a etapa de alimentação e, após esta etapa, conforme o esperado para a simulação, aumentou com o tempo de reação. Estes comportamentos mostram que os parâmetros cinéticos encontrados durante a etapa de otimização deste trabalho estão dentro do esperado para a reação de fermentação do etanol de segunda geração a partir

do hidrolisado pré-tratado. Vale ressaltar que estas condições de reação foram simuladas com os parâmetros obtidos a partir de uma banco de dados experimentais e desta forma não se pode simular condições distantes das que foram validadas experimentalmente. Em uma reação Melle-Boinot na indústria, a concentração de células no inóculo é de aproximadamente 60g/L. Simulações com estas condições iniciais resultariam em produtividades mais altas, porém os parâmetros cinéticos poderiam ser diferentes por conta de diferentes comportamentos das células em cada ambiente em que se é utilizada.

6 CONCLUSÕES

A metodologia adotada para ajuste dos parâmetros cinéticos para a fermentação em batelada do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar para a obtenção do etanol de segunda geração foi satisfatório à luz do parâmetro RSD, que foi aceitável para todas as temperaturas e variáveis medidas. A Simulação do processo em batelada alimentada seguiu conforme esperado, podendo prever resultados de reações que sejam realizadas perto adotadas para a etapa de simulação deste trabalho. A produtividade encontrada foi de 1,198g/Lh ao fim do processo, confirmando a teoria sobre as vantagens de se seguir uma reação no modelo de Melle-Boinot. Valores mais baixos de vazão, e consequentemente tempos mais baixos de alimentação, tendem a resultar em uma concentração de etanol mais alta no mosto ao fim da reação, porém não se faz vantajoso devido ao tempo total de reação que também aumenta, influenciando na produtividade do processo. Para valores mais altos de concentração de substrato no mosto e concentração de células no inóculo, a produtividade também seria maior. Porém com os parâmetros obtidos a partir do banco de dados de Martins, (2015), não se pode prever com confiança qual seria o comportamento do processo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUDO, L. DEL C. Genetic aspects of ethanol tolerance and production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 41–44, 1985.
- AMARAL, F. S. Influência conjunta do pH, temperatura e concentração de sulfito na fermentação alcoólica de mostos de sacarose. 2009.
- ANDERSEN, N. Enzymatic hydrolysis of cellulose: experimental and modeling studies. 2007.
- ANDRADE, R. R. DE. Procedimento para o desenvolvimento de um modelo matemático robusto para o processo de fermentação alcoólica. 2007.
- ANDRADE, R. R. DE. Modelagem cinética do processo de produção de etanol a partir de hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar concentrado com melaço considerando reciclo de células. 2012.
- ANDREWS, J. F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. **Biotechnology and bioengineering**, v. 10, n. 6, p. 707–723, 1968.
- ATALA, D. I. et al. **Fermentação Alcoólica com alta densidade celular: Modelagem cinética e convalidação de parâmetros**. . Em: LIVRO DE RESUMOS DO XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA. 2000.
- ATALA, D. I. P. et al. Kinetics of ethanol fermentation with high biomass concentration considering the effect of temperature. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91, n. 1, p. 353–365, 1 mar. 2001.
- BARCELOS, C. A. et al. The essentialness of delignification on enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse cellulignin for second generation ethanol production. **Waste and Biomass Valorization**, v. 4, p. 341–346, 2013.
- CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, Ó. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresource technology**, v. 98, n. 12, p. 2415–2457, 2007.
- CARPIO, L. G. T.; SIMONE DE SOUZA, F. Optimal allocation of sugarcane bagasse for producing bioelectricity and second generation ethanol in Brazil: Scenarios of cost reductions. **Renewable Energy**, v. 111, p. 771–780, 1 out. 2017.
- CARVALHO, J. DE; SATO, S. Fermentação descontínua. **SCHMIDELL, W; LIMA, UA; AQUARONE, E; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial–Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgard Blucher**, v. 2, p. 193–204, 2001.
- CASTRO, A. M. DE; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 181–188, 2010.

CHANG, V. S.; NAGWANI, M.; HOLTZAPPLE, M. T. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 135–159, 1998.

CHIARAMONTI, D. et al. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. **Biomass and bioenergy**, v. 46, p. 25–35, 2012.

DA SILVA, A. S. et al. **Sugarcane and woody biomass pretreatments for ethanol production**. [s.l.] ISBN, 2013.

DARÉ, R. M. Avaliação de coeficientes de rendimento e modelagem do processo fermentativo de produção de etanol.(2008). 67 f. 2008.

DE ALMEIDA LIMA, U. **Biotecnologia Industrial-Vol. 3: Processos fermentados e enzimáticos**. [s.l.] Editora Blucher, 2019. v. 3

DE LACERDA, E. G.; DE CARVALHO, A. Introdução aos algoritmos genéticos. **Sistemas inteligentes: aplicações a recursos hídricos e ciências ambientais**, v. 1, p. 99–148, 1999.

DINÇER, A.; TELEFONCU, A. Improving the stability of cellulase by immobilization on modified polyvinyl alcohol coated chitosan beads. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, n. 1–2, p. 10–14, 2007.

FENGEL, D.; WEGENER, G.; GREUNE, A. Studies on the delignification of spruce wood by organosolv pulping using SEM-EDXA and TEM. **Wood Science and Technology**, v. 23, n. 2, p. 123–130, 1989.

FERNANDES, A. P. F. V. Leveduras isoladas de produtos frutícolas: Capacidade fermentativa e estudos sobre a H⁺-ATPase da membrana plasmática. 2008.

GOES, T.; MARRA, R. Biocombustíveis – Uma alternativa para o mundo, uma oportunidade para o Brasil. p. 8, [s.d.].

GUIDINI, C. Z. Fermentação alcoólica em batelada alimentada empregando *Saccharomyces cerevisiae* de características floculantes. 2013.

GUO, G.-L. et al. Characterization of enzymatic saccharification for acid-pretreated lignocellulosic materials with different lignin composition. **Enzyme and microbial technology**, v. 45, n. 2, p. 80–87, 2009.

JAMES, B.; JAMES, B.; OLLIS DAVID, F. **Biochemical engineering fundamentals**. [s.l.] Mc Grow Hill Book Company, 1986.

KELLER, F. A.; HAMILTON, J. E.; NGUYEN, Q. A. Microbial pretreatment of biomass. Em: **Biotechnology for Fuels and Chemicals**. [s.l.] Springer, 2003. p. 27–41.

KRISTENSEN, J. B. Enzymatic hydrolysis of lignocellulose: substrate interactions and high solids loadings. 2008.

- LEE, J.; POLLARD, J.; COULMAN, G. Ethanol fermentation with cell recycling: computer simulation. **Biotechnology and bioengineering**, v. 25, n. 2, p. 497–511, 1983.
- LEITE, R. C.; CORTEZ, L. A. B. O Etanol Combustível no Brasil. p. 15, [s.d.].
- LEUDEKING-PIRET, E. A kinetic study of the lactic acid fermentation batch process at controlled pH. **Biochemical Microbiological Tech Eng**, v. 1, p. 393–412, 1959.
- LEVENSPIEL, O. The Monod equation: a revisit and a generalization to product inhibition situations. **Biotechnology and bioengineering**, v. 22, n. 8, p. 1671–1687, 1980.
- LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 69, n. 6, p. 627–642, 2006.
- MARTÍN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 3, p. 426–432, 2007.
- MARTINS, L. H. DA S. Avaliação de diferentes pré-tratamentos do bagaço de cana de açúcar considerando altas cargas de sólidos. 2015.
- MICHELIN, M. et al. Effect of phenolic compounds from pretreated sugarcane bagasse on cellulolytic and hemicellulolytic activities. **Bioresource technology**, v. 199, p. 275–278, 2016.
- MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. The use of high-solids loadings in biomass pretreatment—a review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 6, p. 1430–1442, 2012.
- MONOD, J. Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes. 1942.
- MOOD, S. H. et al. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, 2013.
- MOREIRA NETO, J. Modelagem matemática do processo de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar submetido a diferentes pré-tratamentos. 2011.
- PACHECO, M. A. C. Algoritmos genéticos: princípios e aplicações. **ICA: Laboratório de Inteligência Computacional Aplicada. Departamento de Engenharia Elétrica. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Fonte desconhecida**, v. 28, 1999.
- QI, F.; WRIGHT, M. A novel optimization approach to estimating kinetic parameters of the enzymatic hydrolysis of corn stover. **AIMS Energy**, v. 4, n. 1, p. 52–67, 2016.
- RAMOS DE ANDRADE, R. et al. Evaluation of the alcoholic fermentation kinetics of enzymatic hydrolysates from sugarcane bagasse (*Saccharum officinarum* L.). **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 88, n. 6, p. 1049–1057, 2013.

RENÓ, M. L. G. Uso de técnicas de otimização robusta multi-objetivos na produção de cimento. **M. Sc. Diss., Univ. Fed. Itajubá**, 2007.

RIVERA, E. A. C. **Otimização de bioprocessos: avaliação de desempenho das abordagens determinísticas e por algoritmos genéticos**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Engenharia Química, 2017.

ROCHA, G. et al. Obtainment and characterization of cellulose from sugarcane bagasse pretreated in acid medium for the synthesis of hydroxypropylmethyl cellulose. **Brazil faculdade de Engenharia Qulmica de Lorena, FAENQUIL**, p. 1–5, 2002.

RODRÍGUEZ-CHONG, A. et al. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. **Journal of food Engineering**, v. 61, n. 2, p. 143–152, 2004.

SANTOS, F. A. et al. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. **Química nova**, v. 37, n. 1, p. 56–62, 2014.

SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renewable energy**, v. 37, n. 1, p. 19–27, 2012.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia industrial-vol. 2: engenharia bioquímica**. [s.l.] Editora Blucher, 2001a. v. 2

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia industrial-vol. 2: Engenharia bioquímica**. [s.l.] Editora Blucher, 2001b. v. 2

SHABIR, S.; SINGLA, R. A comparative study of genetic algorithm and the particle swarm optimization. **International Journal of electrical engineering**, v. 9, n. 2016, p. 215–223, 2016.

SHAPIRO, J. **Genetic algorithms in machine learning**. . Em: ADVANCED COURSE ON ARTIFICIAL INTELLIGENCE. Springer, 1999.

SILVA, M. D. DA. Produção de etanol de segunda geração por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 a partir da hidrólise ácida de sabugo de milho (*Zea mays* L.). 2018.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource technology**, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.

SZCZODRAK, J.; FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 10, n. 5, p. 367–375, 1 jan. 1996.

TEBEKA, I. R.; SILVA, A. G.; PETRI, D. F. Hydrolytic activity of free and immobilized cellulase. **Langmuir**, v. 25, n. 3, p. 1582–1587, 2009.

TODARO, C. C.; VOGEL, H. C. **Fermentation and biochemical engineering handbook**. [s.l.] William Andrew, 2014.

UM, B.-H.; VAN WALSUM, G. P. Acid hydrolysis of hemicellulose in green liquor pre-pulping extract of mixed northern hardwoods. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 153, n. 1, p. 127–138, 2009.

VANCOV, T.; MCINTOSH, S. Mild acid pretreatment and enzyme saccharification of Sorghum bicolor straw. **Applied Energy**, v. 92, p. 421–428, 2012.

ZHANG, Y. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797–824, 2004.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International journal of agricultural and biological engineering**, v. 2, n. 3, p. 51–68, 2009.

APÊNDICE I –CÓDIGO DE OTIMIZAÇÃO DOS PARAMETROS

```

//Importação dos dados experimentais
readxls("diretório da planilha do banco de dados")
sheets1=sheets(1)
tempo = sheets1(3:15,3)
celulas = sheets1(3:15,4) // concentração de biomassa g/L
glicose = sheets1(3:15,6) // concentração de substrato
etanol = sheets1(3:15,5) // concentração de etanol
Cac = 1.18 //valor médio de Cac no ensaio
//Parametros não dependentes da temperatura

// CHAMADA DA FUNÇÃO BAT
function [dw]=Bat(t, y)
    //EDOs do modelo cinético
    Xn = y(1)
    Sn = y(2)
    Pn = y(3)
    //Definição das taxas
    if Pn > pmax then
        rx=0 // a biomassa não se multiplica mais, já que já foi formada a quantidade max.
        de produto
    else
        rx = (umax*(Sn/(Ks+Sn))*exp(-Ki*Sn)*((1-(Xn/xmax))^m)*((1-
(Pn/pmax))^n)*Xn)*(1-((Cac/Cmax)^nn))
    end
    rs = (rx/yx)+(Mx*Xn)
    rp = (ypx*rx)+(Mp*Xn)
    if Sn < 0.5 then //concentração de substrato na qual a reação cessa por falta de
substrato
        dw(1)= 0
        dw(2)= 0
        dw(3)= 0
    end
    dw(1)= rx
    dw(2)= -rs
    dw(3)= rp

endfunction

// Chamada da função custo
function [Custo]=cost(par)
    //declarando os parametros do modelo cinético
    umax = par(1)
    xmax = par(2)
    pmax = par(3)
    ypx = par(4)
    yx = par(5)
    Cmax = par(6)

```

```

nn = par(7)
Ks = par(8)
Ki = par(9)
Mp = par(10)
Mx = par(11)
m = par(12)
n = par(13)
X0= [X0;S0;P0] //condições iniciais da simulação
t=[0:0.1:24] //intervalo de integração da simulação (0 a 24h, passo de 0,1h)
t0=0 //tempo inicial
y=ode(X0,t0,t,Bat) //chamada da função que resolve o sistema de equações
diferenciais

//estrutura para comparar o valor de cada variável (X, P e S) obtido pela simulação e o
obtido experimentalmente

for i=1:length(tempo)
    for j=1:length(t)
        if t(j)== tempo(i) then
            tempo_sim($+1)=tempo(i)
            celulas($+1)= y(1,j)
            substrato($+1)= y(2,j)
            produto($+1)= y(3,j)
        end
    end
end
end
//calculo do custo a ser minimizado
E=[tempo_sim,celulas,substrato,produto]
o2 = sum(((E(:,2)-(dados(:,2))))^2/max(dados(:,2))^2) // parte 1 eq
o3 = sum(((E(:,3)-(dados(:,3))))^2/max(dados(:,3))^2) // parte 2 eq
o4 = sum(((E(:,4)-(dados(:,4))))^2/max(dados(:,4))^2) // parte 3 eq
Custo = o2+o3+o4 //função a ser minimizada
disp([par(1),par(2),par(3),par(4),par(5),par(6),par(7),Custo])
disp(E) //programa imprime o valor do erro a cada ieração
endfunction

// OTIMIZAÇÃO DOS PARAMETROS

PopSize= 100 // o tamanho da população de indivíduos (valor padrão: 100).
Proba_cross= 0.7 // a probabilidade de cruzamento (valor padrão: 0,7).
Proba_mut= 0.1 // a probabilidade de mutação (valor padrão: 0,1).
NbGen = 20 // o número de gerações a ser calculado (valor padrão: 10).
Log = %T // se% T, chamará a função de saída no final de cada iteração

// Dados de inicialização do algoritmo de minimização do custo
ga_params = init_param()
ga_params = add_param(ga_params,"minbound",[1.0; 10; 10; 2; 0.05; 1; 5.5]) //limite
inferior de cada parametro
ga_params = add_param(ga_params,"maxbound",[1.2; 25; 20; 4; 0.09; 2; 6.5]) //limite
superior de cada parametro
ga_params = add_param(ga_params,"dimension",3)

```

```
[pop_opt,fobj_pop_opt]=  
optim_ga(cost,PopSize,NbGen,Proba_mut,Proba_cross,Log,ga_params) //fornecendo os  
parametros à função optim_ga  
disp(pop_opt,fobj_pop_opt) //programa imprime o resultado dos parametros  
otimizados e o valor da função objetivo minimizada.
```

APÊNDICE II – SIMULAÇÃO DA FERMENTAÇÃO EM BATELADA ALIMENTADA

```

//Parametros dependentes da temperatura para a temperatura de 38 °C
umax =1.585
Xmax =66.857
Pmax =16.387
Ypx =2.949
Yx =0.090
Cmax =1.839
nn = 2.159
//Parametros não dependentes da temperatura
Ks =4.5812763
Ki =0.0096774
Mp =0.1104124
Mx =0.1410991
m =1.1777395
n =1.5216676
Cac = 1.11
F =0.24 //Vazão de alimentação
Sa =58 //concentração de substrato na alimentação

//modelagem matemática do sistema em batelada alimentada
function [dw]=FedBatch(t, y)
//EDO's do modelo cinético
Xn = y(1)
Sn = y(2)
Pn = y(3)
Vn = y(4)

//Definição das taxas
if Pn>Pmax then
rx = 0 //cessa a reação por conta do elevado volume de produto
else
rx = (umax*(Sn/(Ks+Sn))*exp(-Ki*Sn)*((1-(Xn/Xmax))^m)*((1-
(Pn/Pmax))^n)*Xn)*(1-((1.11/Cmax)^nn))
end
rs =-(rx/Yx)-(Mx*Xn)
rp = (Ypx*rx)+(Mp*Xn)
if Vn>1.4 then //alimentação zera após 70% do volume útil.
F=0
end
if Sn<1 then // reação cessa por falta de substrato no mosto.
dw(1)= 0
dw(2)= 0
dw(3)= 0
dw(4)=F
else
dw(1)= rx - Xn*F/Vn

```

```
dw(2)= rs + F*(Sa-Sn)/Vn  
dw(3)= rp - Pn*F/Vn  
dw(4)=F  
end
```

```
endfunction
```

```
t0 = 0;  
x0 = [1.1;1;0;0.2];  
t = [0:0.1:15];  
y=ode(x0,t0,t,FedBatch)' //resolução do sistema de EDOs.  
dados = [y(:,1),y(:,2),y(:,3)]
```

```
plot(t,dados) //plotagem do perfil de concentração em batelada alimentada;
```