

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

WILLIAM EDUARDO HERRERA AGUDELO

MODELAGEM E CONTROLE DE PROCESSOS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL DE PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÃO APLICANDO REDES NEURAIS

MODELING AND CONTROL PROCESS OF FIRST AND SECOND GENERATION ETHANOL PRODUCTION APPLYING NEURAL NETWORKS

CAMPINAS

2017

WILLIAM EDUARDO HERRERA AGUDELO

MODELAGEM E CONTROLE DE PROCESSOS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL DE PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÃO APLICANDO REDES NEURAIS

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Thesis presented to the School of Chemical Engineering of the University of Campinas as part of the requirements demanded to obtain a PhD Degree in Chemical Engineering.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Maciel Filho

Co-orientador: Dr. Elmer Ccopa Rivera

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO WILLIAM EDUARDO HERRERA AGUDELO, E ORIENTADO PELO PROF. DR. RUBENS MACIEL FILHO

CAMPINAS

Ficha catalográfica Universidade Estadual de Campinas Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

H433m	Herrera Agudelo, William Eduardo, 1982- Modelagem e controle de processos para a produção de etanol de primeira e segunda geração aplicando redes neurais / William Eduardo Herrera Agudelo. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.
	Orientador: Rubens Maciel Filho. Coorientador: Elmer Ccopa Rivera. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.
	1. Bioetanol. 2. Fermentação - Modelos matemáticos. 3. Fermentação - Monitoramento On-line. 4. Controle de processos químicos. 5. Inteligencia artificial. I. Maciel Filho, Rubens, 1958 II. Ccopa Rivera, Elmer. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Modeling and control process of first and second generation ethanol production applying neural networks Palavras-chave em inglês: Bioethanol Mathematical models Soft-sensor Process control Artificial intelligence Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos Titulação: Doutor em Engenharia Química Banca examinadora: Rubens Maciel Filho [Orientador] Carlos Eduardo Vaz Rossell Adriano Pinto Mariano Solange Inês Mussato Dragone Daniel Ibraim Pires Atala Data de defesa: 27-09-2017 Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Folha de Aprovação

Tese de Doutorado defendida por William Eduardo Herrera Agudelo e aprovada em 27 de setembro de 2017 pala banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. Rubens Maciel Filho - Orientador

Prof. Dr. Carlos Eduardo Vaz Rossell

Prof. Dr. Adriano Pinto Mariano

Prof. Dra. Solange Inês Mussato Dragone

Prof. Dr. Daniel Ibraim Pires Atala

A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

DEDICATÓRIA

Dedico minha tese de doutorado

Às pessoas pelas que cada dia, me dão alegria, pelas que nunca me deixaram de apoiar. Às pessoas pelas que vale a pena estar nesse mundo!

Janaína, meu amor a mulher da minha vida, obrigado pela enorme alegria, apoio e pela paciência de tantos anos, seus conselhos e suas palavras doces fazem minha vida genial! Aminta, minha Mami, pelo amor, compreensão e trabalho duro que você entregou durante toda a sua vida para poder ter filhos dos que você seguramente está orgulhosa.

Eduardo, meu Papi, pelas palavras sabias e ações no momento certo, pela inesgotável alegria e genuína forma de ver o mundo, sinto muito que você não esteja comigo aqui nessa alegria, mas você foi para a maior aventura de todas - *buen viento y buen amar*, obrigado Onça Parda!

-Él fue el hombre Jaguar, que con su llama encendió mi corazón –

AGRADECIMENTOS

"Caminante, no hay camino, se hace camino al andar." Antonio Machado.

"Prefiero vivir un día como un tigre que cien años como un cordero." Iñaki Ochoa de Olza

A minha família Johana, Bibiana, Mónica, Juan, Mateo, Salomé. Meu coração e pensamentos estão com vocês sempre.

A Cristina Stolf por todo o apoio que sempre está disposta a oferecer.

A minha segunda família, o clã Stolf: Vô Rubens (grande jogador de truco), Vó Lais, Dê, Theio, Arthur, Juliana, Cazu, Gustavo, Jussara, Iara o Alé e a pequena Aura. Também o Petcha e Gigis.

Ao Professor Rubens Maciel Filho, nunca conheci a uma pessoa como ele, sempre brilhante e muito positivo. Obrigado pela oportunidade, a confiança e o respeito que você sempre me ofereceu.

A Ronald, Ruben, Edwin, Lizandro grandes companheiros nessa viagem, é o melhor do mundo rir junto com vocês.

A meus companheiros do LOPCA e do CTBE pela ajuda que sempre recebi de vocês, quando não conseguia andar vocês me empurravam para frente.

À Unicamp por ser minha Alma Matter.

À FAPESP que financiou este projeto de pesquisa, viabilizando a realização deste trabalho.

RESUMO

O presente trabalho de pesquisa tem como objetivo o desenvolvimento e aplicação de técnicas e ferramentas computacionais, tais como modelos matemáticos, soft-sensors e esquemas de controle preditivo baseado em modelo usando Redes Neurais Artificiais ((neural network model based predictive control - NNMPC), para o processo de produção de etanol, a partir da mistura de hidrolisado com melaço de cana-de-açúcar (1G+2G). Para isso, estudos experimentais de pré-tratamento, hidrólise enzimática e fermentação para cinco sistemas diferentes de produção de etanol foram realizados, definidos principalmente pelo tipo de pré-tratamento e dois níveis de carga de sólidos na hidrólise enzimática. Dados experimentais de concentrações de substrato, etanol e células, bem como medições *online* (temperatura, vazão de CO₂, pH, capacitância), entre outras observações experimentais, foram utilizados para o ajuste e validação dos modelos matemáticos e das ferramentas computacionais geradas. Os modelos cinéticos desenvolvidos podem prever o crescimento celular, o consumo de substrato e a produção de etanol para os diferentes sistemas de fermentação de etanol considerados. Um procedimento avançado de estimativa de parâmetros dependentes da temperatura foi utilizado para garantir a precisão dos modelos propostos. Nesta abordagem, a influência da temperatura sobre o comportamento cinético da fermentação foi explicitamente demonstrada. Posteriormente, os modelos cinéticos foram aplicados na simulação de um processo de fermentação contínua para a produção de etanol. O sistema é um típico processo industrial em larga escala, composto por quatro fermentadores anexados em série e operados com reciclagem celular. Os modelos foram implementados em linguagem de programação Matlab®, e como resultado obteve-se uma planta virtual de produção de etanol 1G+2G para cada sistema estudado. O desempenho da fermentação para os diferentes sistemas foi avaliado. Neste trabalho, foi dado um grande destaque no uso das Redes Neurais Artificias (RNA) no desenvolvimento de soft-sensors para a monitoração online do processo de fermentação de etanol 1G+2G, bem como na obtenção de medições precisas das variáveis de estado do sistema, necessárias para os esquemas propostos de controle preditivo. Os resultados da aplicação dos soft-sensors mostraram que é possível inferir com precisão as concentrações de substrato, etanol e células a partir de informações online facilmente mensuráveis. Uma vantagem adicional desta abordagem consiste no uso de um sistema de sensores com custo relativamente baixo, como termopares, medidor de pH e sonda de capacitância. Com base na simulação dinâmica da planta virtual de produção de etanol 1G+2G, foi aplicado um controle preditivo NNMPC para lidar com as flutuações da concentração de açúcar na matériaprima. O objetivo do controle é manter a concentração de açúcar da saída do quarto reator no seu *set-point*, manipulando a vazão de alimentação. Por meio de simulações em malha fechada, foi verificado que os algoritmos de controle não lineares propostos neste trabalho provaram ser eficientes e robustos, pois forneceram bons resultados em problemas de controle dos tipos servo e regulatório.

Palavras-chave: bioetanol; fermentação – modelos matemáticos; fermentação – monitoramento on-line; controle de processos químicos; inteligência artificial.

ABSTRACT

The present research work aims at developing and applicating computational techniques and tools, such as mathematical models, software sensors, and a neural network model based predictive control (NNMPC) for ethanol production process from hydrolysate mixture with sugarcane molasses (1G+2G). For this purpose, experimental studies of pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation were carried out for five different ethanol production systems, mainly defined by the pretreatment type and two levels of solids loading in the enzymatic hydrolysis. Experimental data of substrate, ethanol and cell concentrations, as well as online measurements (temperature, CO₂ flow, pH, capacitance), among other experimental observations, were used to adjust and validate the mathematical models and generated computational tools. The developed kinetic models can predict cell growth, substrate consumption, and ethanol production for the different ethanol fermentation systems. An advanced temperature-dependent parameter estimation procedure was used to ensure the proposed models accuracy. In this approach, the temperature influence on the fermentation kinetic behavior was explicitly demonstrated. Subsequently, the kinetic models were applied in the simulation of a continuous fermentation process for ethanol production. The fermentation system is a typical large-scale industrial process composed of four fermenters attached in series and operated with cell recycling. The models were implemented in Matlab® programming language. As a result, a virtual 1G+2G ethanol production plant was obtained for each studied system. The fermentation performance of different systems was evaluated. In this work, a great prominence was given to the use of Artificial Neural Networks (ANN) in soft-sensors development for online monitoring of fermentation process of 1G+2G ethanol, as well as to obtain accurate measurements of necessary state variables for the proposed predictive control schemes. The results of soft-sensors application showed the possibility of accurate inference of substrate, ethanol, and cells concentrations from easily measurable online information. An additional advantage of this approach is the use of a relatively low-cost sensor system, such as thermocouples, pH meter, and capacitance probe. Based on the dynamic simulation of 1G+2G ethanol production plant, a NNMPC was applied to deal with fluctuations in raw material sugar concentration. The control purpose is to maintain the sugar concentration of the fourth reactor output in its set-point, by manipulating the feed flow. Through closed-loop simulations, it was verified that the

proposed nonlinear control algorithms proved to be efficient and robust, since they provided satisfactory results in control problems of servo and regulatory types.

Keywords: bioethanol; mathematical models; soft-sensor; process control; artificial intelligence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema geral do projeto	9
Figura 2. Esquema do pré-tratamento do material lignocelulósico (HAGHIGHI MOOD et al., 2013)38	8
Figura 3. Esquema de um Neurônio como constituinte de uma Rede Neural Artificial	1
Figura 4. Função Logística	2
Figura 5. Função Tangente hiperbólica	2
Figura 6.Rede Neural com diferentes tipos de Camadas	3
Figura 7. Estrutura de uma rede neural MLP totalmente conectada com uma camada inicial, uma camada	
oculta e uma camada de saída (HAYKIN, 2008)	5
Figura 8. Fluxograma das misturas de hidrolisado enzimático com melaço. A. Processo com pré-	
tratamento ácido e hidrólise enzimática com 8 % de sólidos. B. Processo com pré-tratamento ácido e	e
hidrólise enzimática com 3 % de sólidos. C. Processo com pré-tratamento ácido, deslignificação e	
hidrólise enzimática com 8 % de sólidos. D. Processo com pré-tratamento ácido, deslignificação e	
hidrólise enzimática com 3 % de sólidos. E. Processo com pré-tratamento com peróxido de	
hidrogênio, deslignificação e hidrólise enzimática com 7 % de sólidos83	3
Figura 9. Micrografias do bagaco de cana-de-acúcar integral com ampliações de (A) 50x; (B) 1000x; (C)	
5000x, (SAVIOLI, 2015)	5
Figura 10. Micrografias do bagaco de cana-de-acúcar PA com ampliações de (A) 50x; (B) 1000x; (C)	
5000x. (SAVIOLI. 2015)	7
Figura 11. Micrografias do ponto de 0.5 % m/v PA+NaOH, 60 min e 80 °C com ampliações de (A) 100x	
da superfície; (B) 500x da superfície; (C) 400x da fratura; (D) 1000x da fratura; (E) 5000x da	
fratura, (SAVIOLI, 2015)	8
Figura 12. (A) Biomassa após a pesagem (massa seca). (B) Hidrólise enzimática das biomassas PA e	
PA+NaOH na temperatura de 50 °C, com rotação de 180 rpm, no período de 72 horas, com agitador	•
Shaker Innova 44 New Bruswick Scientific (CTBE, Campinas – SP, Brasil). (C) Hidrolisado	
enzimático depois de 72 horas	1
Figura 13. Resultados da composição dos hidrolisados enzimáticos produzidos: A) (HE+PA) 8 %. B)	
(HE+PA)3 % C) (HE+PA+NaOH) 8 % D) (HE+PA+NaOH) 3 %, em g/L	4
Figura 14. Valores das concentrações finais de glicose quando comparado aos valores de referência94	5
Figura 15. Placa de Petri com o meio de cultura após a inoculação com células (S. cerevisiae)97	7
Figura 16. Meio de crescimento da S.cerevisiae (100 mL da solução)	8
Figura 17. Fase de crescimento das leveduras S. cerevisiae em um incubador orbital a 33 °C, 250 rpm, po	r
24 horas. (A) Meio de crescimento (pré-inóculo) antes de serem inoculados; (B) Meio de crescimento	0
(pré-inóculo) após o processo de incubação	8
Figura 18. Fotografia do microscópio para verificar a morfologia das leveduras S. cerevisiae. A) Meio de	
crescimento (pré-inóculo) para o sistema fermentativo do hidrolisado da biomassa PA 8 % m/v (B)	
Meio de crescimento (pré-inóculo) para o sistema fermentativo do hidrolisado da biomassa PA 3 %	
m/v	9
Figura 19. Fase de preparo do inóculo (A) Erlenmeyers com solução antes de serem inoculados (B)	
Erlenmeyers após o processo de incubação	1
Figura 20. BiorreatorBioflo® / CelliGen15, Bioreactor. New Brunswick Scientific Co 104	4
Figura 21. Sensores e equipamento para a coleta de informação da fermentação A) Sonda de DO B)	
Sonda de pH C) Sonda Aber D) Espectrômetro por Infravermelho Médio FTIR ALPHA Bruker E)	
Espectrômetro de massas para análise de gases residuais (HIDEN ANALITICAL)104	4
Figura 22. Dados experimentais da fermentação do sistema HE+PA 3 % com melaço, a 30, 32, 34 e 36	
°C. Símbolos fazem referência a concentração de: (o) Substrato (s); (■) Células (X); (□) Etanol (P) e	e
(▲) Glicerol; ajuste linha sigmóide114	4
Figura 23. Dados experimentais da fermentação do sistema HE+PA 8 % com melaço, a 30, 32, 34 e 36	
°C. Símbolos fazem referência a concentração de: (o) Substrato (s); (■) Células (X); (□) Etanol (P) e	2
(▲) Glicerol; ajuste linha sigmóide11	5

Figura 24. Dados experimentais da fermentação do sistema HE+PA+NaOH 3 % com melaço, a 30, 32, 34
e 36 °C. Símbolos fazem referência a concentração de: (o) Substrato (s); (u) Células (X); (u) Etanol
(P) e (▲) Glicerol; ajuste linha sigmóide116
Figura 25. Dados experimentais da fermentação do sistema HE+PA+NaOH 8 % com melaço, a 30, 32, 34
e 36 °C. Símbolos fazem referência a concentração de: (o) Substrato (s); (■) Células (X); (□) Etanol
(P) e (▲) Glicerol; ajuste linha sigmóide117
Figura 26. Dados experimentais da fermentação do sistema HE+PEOX 7 % com melaço, a 30, 32, 34 e 36
°C. Símbolos fazem referência a concentração de: (o) Substrato (s); (■) Células (X); (□) Etanol (P) e
(▲) Glicerol; ajuste linha sigmoide
Figura 27. Velocidades específicas no processo fermentativo H1+melaço
Figura 28. Velocidades específicas no processo fermentativo H2+melaço
Figura 29. Velocidades específicas no processo fermentativo H3+melaço140
Figura 30. Velocidades específicas no processo fermentativo H4+melaço141
Figura 31. Parâmetros $Y_{X/S}(T)$, $Y_{X/P}(T)$, μ_{max} , $K_S(T)$, $X_{max}(T)$, $P_{max}(T)$, $K_I(T)$ e r(T) em função da
temperatura (°C). Símbolos correspondem aos seguintes sistemas de fermentação: (a) H1+melaço
(●) H2+melaço; (▲) H3+melaço; (♦) H4+melaço e (×) H5+melaço; () Ajuste das Eq. (101) e
Eq. (102)
Figura 32. Perfís de concentração de(●) Substrato (s); (△) Células (X); (■) Etanol (P) da fermentação do
sistema H1+melaço, a: (A) 30 °C; (B) 32 °C; (C) 34 °C e (D) 36 °C.; ;() Modelo Cinético154
Figura 33. Perfís de concentração de (●) Substrato (s); (△) Células (X); (■) Etanol (P) da fermentação do
sistema H2+melaço , a: (A) 30 °C; (B) 32 °C; (C) 34 °C e (D) 36 °C.; ;() Modelo Cinético155
Figura 34. Perfís de concentração de(●) Substrato (s); (△) Células (X); (■) Etanol (P) da fermentação do
sistema H3+melaço , a: (A) 30 °C; (B) 32 °C; (C) 34 °C e (D) 36 °C.; ;() Modelo Cinético156
Figura 35. Perfís de concentração de(●) Substrato (s); (△) Células (X); (■) Etanol (P) da fermentação do
sistema H4+melaço , a: (A) 30 °C; (B) 32 °C; (C) 34 °C e (D) 36 °C.; ;() Modelo Cinético157
Figura 36. Perfís de concentração de(●) Substrato (s); (△) Células (X); (■) Etanol (P) da fermentação do
sistema H5+melaço , a: (A) 30 °C; (B) 32 °C; (C) 34 °C e (D) 36 °C.; ;() Modelo Cinético158
Figura 37. Perfís de concentração de(●) Substrato (s); (△) Células (X); (■) Etanol (P) da fermentação do
sistema H2+melaço, a 33 °C;() Modelo Cinético161
Figura 38. Perfís de concentração de(●) Substrato (s); (△) Células (X); (■) Etanol (P) da fermentação do
sistema H4+melaço, a 33 °C;() Modelo Cinético161
Figura 39. Fluxograma dos processos de produção de etanol que deram origem aos modelos cinéticos; A.
Processo com pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática com 8 % de sólidos;167
Figura 40. Fluxograma da planta de produção de etanol. 1-4. Reatores ou fermentadores. 5-8. Trocadores
de calor. 9. Centrífuga. 10. Unidade de tratamento ácido168
Figura 41. Diagrama do reator de mistura do processo de fermentação. 1. Reator. 2. Trocador de calor 170
Figura 42. Perfis de concentração de substrato, células e produtos da planta de produção de etanol do
sistema S1174
Figura 43. Valores de conversão de açúcares, rendimento e produtividade para os sistemas S1-S5176
Figura 44. Valores das variáveis de saída da planta após atingir estabilidade na simulação: a.
Concentração de substrato; b. Concentração de células e c. concentração de etanol177
Figura 45. Esquema geral de um soft-sensor
Figura 46. Metodologia empregada para a construção do soft-sensor
Figura 47. BiorreatorBioflo® / CelliGen15, Bioreactor. New Brunswick Scientific Co
Figura 48. Sensores e equipamentos utilizados na aquisição de dados durante a fermentação A) Sonda de
pH B) Sonda de capacitância ou Aber C) Espectrômetro de massas para a análise de gases residuais
(HPR 20 EGA HIDEN ANALITICAL)
Figura 49. Configuração de RNA utilizada para a modelagem dos sistemas S1, S2, S3 e S4188
Figura 50. Configuração de RNA utilizada para a modelagem do sistema S5
Figura 51. Predição da RNA de concentração de células, X, para o sistema S1 com 30 neurônios na
camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado
RNA (pontos vermelhos)191

Figura 52. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de
células, X, no sistema S1
Figura 53. Predição da RNA de concentração de substrato, S, para o sistema S1 com 30 neurônios na
camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado
RNA (pontos vermelhos)192
Figura 54. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de
substrato, S, no sistema S1192
Figura 55. Predição da RNA de concentração de produto, P, para o sistema S1 com 20 neurônios na
camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado
RNA (pontos vermelhos)193
Figura 56. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de
células, P, no sistema S1193
Figura 57. Predição da RNA de concentração de células, X, para o sistema S2 com 20 neurônios na
camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado
RNA (pontos vermelhos)195
Figura 58. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de
células, X, no sistema S2
Figura 59. Predição da RNA de concentração de substrato, S, para o sistema S2 com 30 neurônios na
camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado
RNA (pontos vermelhos)
Figura 60. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de
substrato, S, no sistema S2196
Figura 61. Predição da RNA de concentração de produto, P, para o sistema S2 com 30 neurônios na
camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado
RNA (pontos vermelhos)
Figura 62. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de
produtos, P, no sistema S2197
Figura 63. Predição da RNA de concentração de células, X, para o sistema S3 com 30 neurônios na
camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado
RNA (pontos vermelhos)
Figura 64. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de
células, X, no sistema S3
Figura 65. Predição da RNA de concentração de substrato, S, para o sistema S3 com 30 neurônios na
camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado
RNA (pontos vermelhos)
Figura 66. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de
substrato, S, no sistema S3
Figura 67. Predição da RNA de concentração de produto, P, para o sistema S3 com 30 neurônios na
camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado
RNA (pontos vermelhos)
Figura 68. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de
produto, P, no sistema S3
Figura 69. Predição da RNA de concentração de células, X, para o sistema S4 com 30 neurônios na
camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado
RNA (pontos vermelhos)
Figura 70. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de
células, X, no sistema S4
Figura 71. Predição da RNA de concentração de substrato, S, para o sistema S4 com 30 neurônios na
camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado
RNA (pontos vermelhos)
Figura 72. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de
substrato, S, no sistema S4

Figura 73. Predição da RNA de concentração de produto, P, para o sistema S4 com 30 neurônios na	
camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado	
RNA (pontos vermelhos)	05
Figura 74. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração d	e
produto, P, no sistema S4	05
Figura 75. Predição da RNA de concentração de células, X, para o sistema S5 com 30 neurônios na	
camada intermediária. Erro do conjunto de dados, Valor experimental (linha azul). Valor estimado	
RNA (nontos vermelhos)	07
Figura 76 Comparação dos valores de MSE RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração d	e
células X no sistema \$5	07
Figura 77 Predição da RNA de concentração de substrato S, para o sistema S5 com 30 neurônios na	51
camada intermediaria. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado	
RNA (pontos vermelhos)	08
Figure 78 Compensação dos velores do MSE DMSE o SSE dos DNAs construídos para o concentração d	00
Figura 78. Comparação dos valores de MISE, RIVISE e SSE das RIVAs construidas para a concentração d	e 00
produto, S, no sistema S5	79
Figura 79. Predição da RNA de concentração de produto, P, para o sistema 55 com 50 neuromos na	
camada intermediaria. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado	~~
RNA (pontos vermelhos)	99
Figura 80. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração d	e
produto, P, no sistema S520	99
Figura 81. Implementação do soft-sensor na planta industrial e controlador NNMPC2	11
Figura 82. Diagrama de blocos para o MPC2	16
Figura 83. Conceito básico para o MPC2	17
Figura 84. Diagrama de bloco do sistema de NNMPC e o algoritmo NNMPC2	19
Figura 85.Diagrama de blocos do treinamento offline na RNA	21
Figura 86.Rede Neural de tipo MLP com a estrutura de predição futura	21
Figura 87. Concentração de substrato na saída dos reatores para os sistemas S1 em malha aberta com	
perturbação de +20% no Fa22	24
Figura 88.Concentração de substrato na saída dos reatores para os sistemas S1 em malha aberta com	
perturbação de -20% no Fa22	25
Figura 89.Estrutura inicial da RNA para a identificação da planta industrial22	26
Figura 90. Representação dos dados gerados a partir dos sinais aleatórios aplicados na simulação da	
planta industrial S1. Fa e So (Dados de entrada) e Se4 (Dados de saída)22	29
Figura 91. Comparação dos valores de MSE, RMSE, SSE e R das diferentes topologias das RNAs no	
sistema S12	29
Figura 92. Representação dos dados gerados a partir dos sinais aleatórios aplicados na simulação da	
planta industrial S2. Fa e So (Dados de entrada) e Se4 (Dados de saída)2	30
Figura 93. Comparação dos valores de MSE, RMSE, SSE e R das diferentes topologias das RNAs no	
sistema S22	30
Figura 94. Representação dos dados gerados a partir dos sinais aleatórios aplicados na simulação da	
planta industrial S3. Fa e So (Dados de entrada) e Se4 (Dados de saída)	31
Figura 95. Comparação dos valores de MSE, RMSE, SSE e R das diferentes topologias das RNAs no	
sistema S32	31
Figura 96. Representação dos dados gerados a partir dos sinais aleatórios aplicados na simulação da	
planta industrial S4. Fa e So (Dados de entrada) e Se4 (Dados de saída)	32
Figura 97 Comparação dos valores de MSE, RMSE, SSE e R das diferentes topologias das RNAs no	
sistema S4	32
Figura 98. Representação dos dados gerados a partir dos sinais aleatórios aplicados na simulação da plan	ta
industrial S5. Fa e So (Dados de entrada) e Se4 (Dados de saída)	33
Figura 99 Comparação dos valores de MSE, RMSE, SSE e R das diferentes topologias das RNAs no	
sistema S5	33
Figura 100 Desembenho da generalização da RNA ótima do S1 Valor Simulação (Linha azul). Valor	55
RNA predito (pontos vermelhos)	35
	55

Figura 101. Desempenho da generalização da RNA ótima do S2. Valor Simulação (Linha azul). Valor
RNA predito (pontos vermelhos)
Figura 102. Desempenho da generalização da RNA ótima do S3. Valor Simulação (Linha azul). Valor
RNA predito (pontos vermelhos)
Figura 103. Desempenho da generalização da RNA ótima do S4. Valor Simulação (Linha azul). Valor
RNA predito (pontos vermelhos)
Figura 104. Desempenho da generalização da RNA ótima do S5. Valor Simulação (-). Valor RNA
predito ()
Figura 105. Esquema de controle do NNMPC no processo fermentativo
Figura 106. Entradas e saídas da simulação para o processo fermentativo S1 em malha fechada241
Figura 107. Respostas do rendimento (%) e produtividade da simulação para o processo fermentativo em
malha fechada241
Figura 108. Entradas e saídas da simulação para o processo fermentativo S2 em malha fechada243
Figura 109. Respostas do rendimento (%) e produtividade da simulação para o processo fermentativo S2
em malha fechada
Figura 110. Entradas e saídas da simulação para o processo fermentativo S3 em malha fechada245
Figura 111. Respostas do rendimento (%) e produtividade da simulação para o processo fermentativo S3
em malha fechada
Figura 112. Entradas e saídas da simulação para o processo fermentativo S4 em malha fechada247
Figura 113. Respostas do rendimento (%) e produtividade da simulação para o processo fermentativo S3
em malha fechada
Figura 114. Entradas e saídas da simulação para o processo fermentativo S4 em malha fechada
Figura 115. Respostas do rendimento (%) e produtividade da simulação para o processo fermentativo S3
em malha fechada

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulações para a estimativa da velocidade específica de crescimento microbiano, $\boldsymbol{\mu}$
(HENDLER, 2011)
Tabela 2. Composição do bagaço de cana-de-açúcar
Tabela 3. Lista de reagentes utilizados durante a hidrólise enzimática das biomassas PA e PA+NaOH 89
Tabela 4. Lista de equipamentos utilizados durante a hidrólise enzimática das biomassas PA e PA+NaOH
Tabela 5. Composição dos hidrolisados enzimáticos (HE) obtidos após a reação enzimática das biomassas
(PA) e (PA+NaOH) para o estudo de avaliação da fermentação93
Tabela 6. Comparação dos valores resultantes de glicose (g/L) com os valores de referência94
Tabela 7. Lista de reagentes utilizados no estudo de fermentação das biomassas PA e PA+NAOH96
Tabela 8. Lista de equipamentos utilizados
Tabela 9. Composição de preparo do meio de cultura
Tabela 10. Composição de preparo do meio de crescimento do microrganismo (S. cerevisiae)97
Tabela 11. Concentração dos reagentes de preparo do inóculo
Tabela 12. Planejamento dos experimentos de fermentação alcoólica
Tabela 13. Valores experimentais das concentrações do substrato, produtos e células durante o processo
fermentativo do HE+PA 3 % com melaço109
Tabela 14. Valores experimentais das concentrações do substrato, produtos e células durante o processo
fermentativo do HE+PA 8 % com melaço110
Tabela 15. Valores experimentais das concentrações do substrato, produtos e células durante o processo
fermentativo do HE+PA+NaOH 3 % com melaço111
Tabela 16. Valores experimentais das concentrações do substrato, produtos e células durante o processo
fermentativo do HE+PA+NaOH 8 % com melaço112
Tabela 17. Valores experimentais das concentrações do substrato, produtos e células durante o processo
fermentativo do HE+PEOX 7 % com melaço113
Tabela 18. Compilação dos valores de concentração do substrato inicial, células iniciais, etanol final,
glicerol final, ácido acético final, Y _{P/ART} , rendimento e viabilidade para todas as fermentações 120
Tabela 19. Parâmetros do algoritmo genético PIKAIA
Tabela 20. Parâmetros estimados da Eq. (92) para a concentração de açúcares (S), (g/L) em função do
tempo t, para os sistemas H1+melaço, H2+melaço, H3+melaço, H4+melaço e H5+melaço, nas
diferentes temperaturas do processo fermentativo134
Tabela 21. Parâmetros estimados da Eq. (92) para a concentração de células (X), (g/L) em função do tempo
t, para os sistemas H1+melaço, H2+melaço, H3+melaço, H4+melaço e H5+melaço, nas diferentes
temperaturas do processo fermentativo
Tabela 22. Parâmetros estimados da Eq. (92) para a concentração de etanol (P), (g/L) em função do tempo
t, para os sistemas H1+melaço, H2+melaço, H3+melaço, H4+melaço e H5+melaço, nas diferentes
temperaturas do processo fermentativo

Tabela 23. Parâmetros cinéticos estimados para os sistemas fermentativos H1+melaço, H2+melaço,
H3+melaço, H4+melaço e H5+melaço143
Tabela 24. Avaliação do modelo de fermentação para os sistemas fermentativos H1+melaço, H2+melaço,
H3+melaço, H4+melaço e H5+melaço (RSD e COR correspondem às Eqs. (96) e (98))145
Tabela 25. Parâmetros estimados das Eq. (101) e Eq. (102) para correlacionar os parâmetros cinéticos do
modelo de fermentação para o sistema de fermentação H1+melaço147
Tabela 26. Parâmetros estimados das Eq. (101) e Eq. (102) para correlacionar os parâmetros cinéticos do
modelo de fermentação para o sistema de fermentação H2+melaço148
Tabela 27. Parâmetros estimados das Eq. (101) e Eq. (102) para correlacionar os parâmetros cinéticos do
modelo de fermentação para o sistema de fermentação H3+melaço149
Tabela 28. Parâmetros estimados das Eq. (101) e Eq. (102) para correlacionar os parâmetros cinéticos do
modelo de fermentação para o sistema de fermentação H4+melaço150
Tabela 29.Parâmetros estimados das Eq. (101) e Eq. (102) para correlacionar os parâmetros cinéticos do
modelo de fermentação151
Tabela 30. Avaliação do modelo de fermentação correlacionando o efeito da temperatura para os sistemas
fermentativos H1+melaço, H2+melaço, H3+melaço, H4+melaço e H5+melaço (RSD e COR
correspondem as Eq. (101) e Eq. (102))
Tabela 31. Dados experimentais e os dados simulados da fermentação em batelada, utilizando o modelo
fenomenológico desenvolvido em função da temperatura (33 °C)160
Tabela 32. Estado estacionário de referência 172
Tabela 33.Parâmetros do projeto 172
Tabela 34.Valores das variáveis do processo
Tabela 35. Parâmetros do modelo fenomenológico
Tabela 36. Valores finais de concentração de substrato, células e produtos na simulação da planta de
produção de etanol usando os 5 modelos cinéticos e o modelo de Andrietta (1994)175
Tabela 37. Configuração da RNA para o modelo de predição do sistema S1, S2, S3, S4 e S5
Tabela 38. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de células, X, construídas
para S1
Tabela 39. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de substrato, S, construídas
para S1
Tabela 40. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de produtos, P, construídas
para S1
Tabela 41. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de células, X, construídas
para S2
Tabela 42. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de substrato, S, construídas
para S2
Tabela 43. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de produto, P, construídas
para S2
Tabela 44. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de células, X, construídas
para S3

Tabela 45. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de substrato, S, construídas
para \$3
Tabela 46. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de produto, P, construídas
para \$3
Tabela 47. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de células, X, construídas
para 54
Tabela 48. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de substrato, S, construídas
para S4
Tabela 49. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de produto, P, construídas
para 54
Tabela 50. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de células, X, construídas
para S5
Tabela 51. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de substrato, S, construídas
para S5
Tabela 52. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de produto, P, construídas
para S5
Tabela 53. Valores dos estados estáveis para os sistemas S1, S2, S3, S4 e S5224
Tabela 54. Configuração durante a identificação do sistema S1, S2, S3, S4 e S5227
Tabela 55. Valores do MSE, RMSE, Valor R e o SSE das diferentes RNA geradas na identificação do
sistema S1
Tabela 56. Valores do MSE, RMSE, Valor R e o SSE das diferentes RNA geradas na identificação do
sistema S2230
Tabela 57. Valores do MSE, RMSE, Valor R e o SSE das diferentes RNA geradas na identificação do
Tabela 58. Valores do MSE, RMSE, Valor R e o SSE das diferentes RNA geradas na identificação do
sistema S4232
Tabela 59. Valores do MSE, RMSE, Valor R e o SSE das diferentes RNA geradas na identificação do
sistema \$5

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- UNICAMP Universidade Estadual de Campinas / State University of Campinas
- LOPCA Laboratório de Otimização, Projeto e Controle Avançado
- NREL National Renewable Energy Laboratory
- FAPESP Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

LISTA DE SIMBOLOS

- a_i Dados de entrada
- B-Batelada
- b-Constante chamada Viés (Bias)
- CSTR Continuos Stirred Tank Reactor
- DNA Ácido desoxirribonucleico.
- DPR Desvio Padrão Residual
- EQM Erro Quadrático Médio
- F Vazão Volumétrica de alimentação.
- H1 Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H₂SO₄ e submetido ao processo de hidrólise enzimática com uma carga de sólidos de 8,0 % nesta última etapa (HE+PA 8%).
- H2 Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H₂SO₄ e submetido ao processo de hidrólise enzimática com uma carga de sólidos de 3,0 % nesta última etapa (HE+PA 3%).
- H3 Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado ácido H₂SO₄ e deslignificado com NaOH (20 % de carga de sólidos, 90 min, 0,5 % m/v NaOH e 80 °C) e em seguida submetido ao processo de hidrólise enzimática com uma carga de sólidos de 8,0 % nesta última etapa, (HE+PA+NaOH 8 % m/v).
- H4 Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado ácido H₂SO₄ e deslignificado com NaOH (20 % de carga de sólidos, 90 min, 0,5 % m/v NaOH e 80 °C) e em seguida submetido ao processo de hidrólise enzimática com uma carga de sólidos de 3,0 % nesta última etapa, (HE+PA+NaOH 3 % m/v).
- H5 Bagaço de cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio (**HE+PEOX** a 7 % m/v, em base seca).
- HE Hidrolisado enzimático.
- FLN Funtional Link
- FNN Forward Neural Network
- HPLC High Performance Liquid Cromatography
- MLP MultiLayer Perceptron
- MPC Model predictive control
- MSE Mean Square Error
- Mt Massa de tubo de ensaio
- M_s Massa tubo de ensaio seco
- NMPC Non linear Model predictive control
- NNMPC Neural Network-based Model Predictive Control
- P-Concentração de Produto
- R Valor de Regressão
- r_x Taxa cinética de crescimento de células totais.
- r_d Taxa cinética de morte celular
- r_s Taxa cinética de consumo de substrato
- r_p Taxa cinética de produtos

RN-Rede Neural

- RNA-Redes Neurais Artificias
- S Concentração de Substrato
- S1 Sistema 1 Planta de Produção de etanol com o modelo cinético H1 + Melaço
- S2 Sistema 2 Planta de Produção de etanol com o modelo cinético H2+ Melaço
- S3 Sistema 3 Planta de Produção de etanol com o modelo cinético H3+ Melaço
- S4 Sistema 4 Planta de Produção de etanol com o modelo cinético H4 + Melaço
- S5 Sistema 5 Planta de Produção de etanol com o modelo cinético H5+ Melaço
- Se4 Concentração de açúcar na saída do efluente do reator 4
- SF Concentração de Substrato na alimentação
- t Tempo
- U_k Função de Ativação
- t_I Dados Objetivo
- V Velocidade
- V-Volume do fermentador
- V_c Volume de liquido centrifugado
- W_i Peso Neurônio
- $X_i-Entrada \ na \ rede \ neural$
- X_v Células Viáveis
- X_d Células Mortas
- X_t Células Totais

SUMÁRIO

1. IN	TRODUÇÃO	
1.1.	Organização da Tese	29
1.2.	Objetivo Geral	
1.3.	Objetivos específicos	
1.4.	Principais Contribuições do Trabalho	
2. RE	EVISÃO BIBLIOGRÁFICA	36
2.1.	Introdução	
2.2.	Pré-Tratamento	
2.3.	Hidrólise Enzimática	
2.4.	Fermentação alcoólica	
2.4	.1. Tipos de Operações de Processos Fermentativos	39
Fe	rmentação Descontínua	40
Fe	rmentação Descontínua Alimentada	41
Fe	rmentação Contínua	
2.5.	Modelagem Matemática do Processo Fermentativo	43
2.5	.1. Balanço de Massa na Fermentação em Batelada	
2.5	.2. Balanço para Fermentação em Batelada Alimentada	
Ba	lanço de Massa para Substrato	
Ba	lanço de Massa para o Produto	49
Ba	lanço de Massa para as Células	49
2.5	.3. Balanço de Massa e Energia para um Reator Contínuo	50
Ba	lanço de Massa para cada Reator	50
Ba	lanços de Energia	52
2.5	.4. Modelos de Crescimento Microbiano	
2.6.	Redes Neurais Artificias RNA	57
2.6	.1. Sistema Nervoso e Neurônios	57
2.6	.2. Propriedade de Redes Neurais	58
2.6	.3. Modelo Matemático de um Neurônio	60
Tip	oos de Funções de Ativação	61
2.6	.4. Redes Neurais Artificiais do tipo MLP	64
Tre	einamento da Rede Neural	66
Alg	goritmo de <i>Backpropagation</i>	66
Tre	einamento do Algoritmo	67
2.6	5.5. Controle por meio de Redes Neurais	68
2.7.	Soft Sensor	69
2.7	.1. Medições <i>Online</i> na Fermentação	
Te	mperatura	
рH	~ 1 ~ ~	
Va	zão de CO ₂	
2.7	.2. Aplicações do <i>Soft-sensor</i>	
2.8 .	Controle da Fermentação	72

Referé	Referências Bibliográficas7	
3. AV	ALIACÕES DO PROCESSO DE FERMENTACÃO ALCOÓLICA A	
PARTIE	R DA MISTURA DE HIDROLISADO COM MELACO DE CANA-DE-	
ACÚCA	R	82
3.1.	Introducão	82
3.2.	Matéria-prima	84
3.3.	Pré-Tratamento	85
3.3.	1. Pré-Tratamento Hidrotérmico Catalisado com Ácido e Pré-Tratamento	
Hidi	rotérmico Catalisado com Ácido e Acoplado ao Processo de Deslignificação	
com	NaOH	86
3.4.	Hidrólise Enzimática	89
3.4.	1. Reagentes e Equipamentos	89
3.4.2	2. Preparação da Solução Tampão de Citrato Monohidratado 0,05 mol/L (j	pН
= 4,	8) 90	
3.4.	3. Hidrólise Enzimática das Biomassas do PA e PA+NaOH	90
3.4.4	4. Análise Cromatográfica dos Hidrolisados Enzimáticos	91
3.4.	5. Resultados da Hidrólise Enzimática	92
3.5.	Fermentação das Misturas de HE+PA com Melaço e HE+PA+NaOH co	m
Melaç	20	95
3.5.	1. Reagentes e Equipamentos	96
3.5.2	2. Preparo do Meio de Cultura	96
3.5.	3. Preparo do Pré-Inóculo	97
3.5.4	4. Preparo do Inóculo	99
3.6.	Determinação da Concentração de Células Totais	101
3.7.	Procedimento da Fermentação da Mistura de HE+PA com Melaço e	
HE+P	A+NaOH com Melaço	102
3.7.	1. Determinação da Concentração de Células Totais	104
3.7.2	2. Determinação de Viabilidade Celular.	104
3.7	3. Determinação das Concentrações de Substrato e Produto na Fermentaçã	10
Cál	105 nula nome Auglionão do Formantesão	105
	Luio para Avanação da Fermentação	105
5.7.4 Mal	4. Resultados e Discussão da Fermentação das Misturas de HE+PA com	106
38	Conclusões	121
J.O. Rofori	Conclusoes	121
Keleiv	encias Divilogi ancas	
4. MO	DELAGEM DO PROCESSO FERMENTATIVO 1	124
4.1.	Generalidades do Processo	124
4.2.	Nodelagem Matematica do Processo Fermentativo	125
4.2.	1. Ajuste de Dados Experimentais	126
4.2.2	2. Determinação das velocidades instantanea e Específica	12/
4.2	5. Esumativa dos Parametros Uneticos	128
4.2.4	 Avanação da Quandade dos Parametros Estimados	129
4.2	5. Eletto da Temperatura nos rarametros Cineticos	130

ON	Método de Integração Numérica de Runge-Kutta-Fehlberg (RKF45)	131
4.3.	Resultados e Discussão	133
4.3	.1. Ajuste dos Dados e Determinação das Velocidades Específicas	133
4.3	.2. Modelagem Cinética	142
Efe	eito da Temperatura sobre os Parâmetros Cinéticos do Modelo de Ferment	ação
		145
4.4.	Validação cruzada (Cross Validation) dos Modelos de Fermentação e	em
Batel	ada	159
4.5.	Conclusões Gerais	162
Refe	rências Bibliográficas	162
5. PL	ANTA INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO	Э:
IMPLE	EMENTAÇÃO DOS MODELOS CINÉTICOS DE PRIMEIRA E	
SEGUN	NDA GERAÇÃO (1G+2G)	166
5.1.	Introdução	166
5.2.	DESCRIÇÃO DO PROCESSO	168
5.3.	MODELAGEM MATEMÁTICA	170
5.3	.1. Rendimento	171
5.3	.2. Produtividade	171
5.4.	Modelo Cinético	171
5.5.	Estado de Referência, e Variáveis da Planta de Produção de Etanol.	172
5.6.	Avaliação das Plantas de Produção de Etanol	173
5.7.	Conclusões	178
Refe	rências Bibliográficas	178
6. M(DDELOS DE INFERÊNCIA DE INFORMAÇÃO USANDO REDES	
NEURA	AIS ARTIFICIAIS	181
6.1.	Introdução	181
6.2.	Soft-sensor ou Software sensor	182
6.3.	Metodologia	183
6.3	.1. Aquisição de Dados Durante a Fermentação	184
Me	dições Online	184
Me	edições Offline	186
6.3	.2. Ajuste de Dados	187
6.3	.3. Modelagem com Redes Neurais Artificiais	187
6.3	.4. Treinamento, Avaliação e Teste das RNA	189
6.4.	Resultados	190
6.4	.1. RNA de predição de X, S e P no sistema S1	190
6.4	.2. RNA de Predição de X, S e P no Sistema S2	194
6.4	.3. RNA de predição de X, S e P no sistema S3	198
6.4	.4. RNA de predição de X, S e P no sistema S4	202
6.4	.5. RNA de predição de X, S e P no sistema S5	206
6.5.	Discussão	210
6.6.	Conclusões	211
Refe	rências Bibliográficas	212

7. CO	NTROLE AVANÇADO APLICADO AO PROCESSO FERMI	ENTATIVO
USAND	O REDES NEURAIS ARTIFICIAIS	
7.1.	Introdução	
7.2.	Controle Preditivo baseado em Modelo (MPC)	
7.3.	Controle Preditivo baseado em Modelo usando Redes Neurais	Artificiais
(NNM	(PC)	
7.3.	1. Função de Custo e Otimização	
7.3.	2. Arquitetura da Rede Neural Artificial	
7.3.	3. Redes Neurais Artificiais	
7.4.	MPC usando Redes Neurais Artificiais ao Processo de Fermen	tação de
1G+2	G	
7.4.	1. Variáveis de Entrada, Saída e Perturbação do Processo	
7.4.	2. Análise Dinâmica do Processo	
7.4.	3. Identificação da Rede Neural Artificial da Planta de Produção	de Etanol
	225	
7.5.	MPC baseado no Modelo de RNA para o Controle das Fermer	ntações 237
7.5.	1. Processo de Controle para S1	
7.5.	2. Processo de Controle para S2	
7.5.	3. Processo de Controle para S3	
7.5.4	4. Processo de Controle para S4	
7.5.	5. Processo de Controle para S5	
7.6.	DISCUSSÃO	
7.7.	CONCLUSÕES	
Refer	ências Bibliográficas	
8 CO	TDE A TMENT A IDED FEDMENTATION OF SUCADCANE	DACASSE
o. UU	I REA I WENT-AIDED FERMENTATION OF SUGARCANE MONO AND COCULTUDES OF THEDMODULI IC DACTET	DAGASSE
USING	MONO AND COCULTURES OF THERMOPHILIC BACTE	NIA 234
9. CO	NCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUI	UROS 275
9.1.	CONCLUSÕES GERAIS	
9.2.	SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	
10. R	EFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
APÊND	ICE A	
APÊND	ICE B	
APÊND	ICE C	

1. INTRODUÇÃO

O bioetanol é atualmente uma das fontes mais importantes de combustível renovável e tem o potencial de substituir parcialmente os combustíveis líquidos que são produzidos a partir do petróleo. O Brasil depois de mais de três décadas de trabalho com biocombustíveis transformou-se o segundo maior produtor de etanol do mundo com cerca de 25 bilhões de litros por ano de etanol e possui a maior frota de veículos flex-fuel no mundo. No entanto, o setor brasileiro de etanol está em um estado de estresse econômico causado principalmente pelos altos custos de produção, e o fato aparente de tem atingido um patamar em termos da produção do biocombustível. Nesse cenário, novos desafios estão se apresentando na indústria e na pesquisa, como o melhoramento do processo, visando o aumento da produtividade, um melhor conhecimento em todas as etapas do processo, desenvolvimentos na monitoração e controle. Atualmente os avanços nas tecnologias da inteligência artificial (como redes neurais artificiais, fuzzy logic entre outros) emergem como uma promissória tecnologia para ajudar na monitoração online e controle avançado do processo fermentativo, os quais tem o potencial de aumentar os benefícios econômicos das atividades relacionadas com a produção de etanol e açúcar, e cogeração de eletricidade.

Nessa indústria, um claro desafio são as safras de cana-de-açúcar, coletadas há muitos dias, secas, sujas com terra e com possíveis agentes contaminantes como microrganismos que podem afetar a qualidade do mosto, com consequência no desempenho do processo de fermentação. Assim, o tipo e a qualidade da cana-de-açúcar, do tempo de colheita e do teor de sacarose estão entre os fatores que podem interferir no processo de fermentação. Essa interferência pode ser compensada com ajustes em condições de operação e controle de processo.

Nesse contexto, pretende-se neste projeto contribuir com o desenvolvimento de técnicas e ferramentas computacionais, tais como modelos matemáticos, *soft-sensors* e controle preditivo baseado em modelo usando Redes Neurais Artificiais (*neural network-based model predictive control-* NNMPC), que auxiliem na diminuição dos custos do processo de produção de etanol a partir da mistura de hidrolisado com melaço de canade-açúcar (1G+2G). Além disso, com as pesquisas desenvolvidas neste projeto, procurase possibilitar uma operação mais estável, independentemente de variações na matériaprima, que por sua vez, contribui com a viabilidade econômica da produção do etanol combustível.

Para o desenvolvimento deste projeto de doutorado foram realizados estudos experimentais de pré-tratamento, hidrolise enzimática e fermentação para cinco sistemas diferentes de produção de etanol, definidos principalmente pelo pré-tratamento e dois níveis de carga de sólidos na hidrólise enzimática utilizada. O hidrolisado enzimático é produzido a partir das frações sólidas de bagaço de cana-de-açúcar, obtido das correntes dos pré-tratamentos (peróxido de hidrogênio, hidrotérmico catalisado com ácido, e hidrotérmico catalisado com ácido acoplado ao um processo de deslignificação com NaOH). A variação do meio de cultura tem como objetivo avaliar se os procedimentos propostos são adequados para possibilitar uma operação estável mesmo com alterações na matéria-prima, inclusive sendo decorrentes da integração do processo de primeira com segunda geração.

Assim, o projeto abrange as etapas do processo de segunda geração (2G) atrelado à primeira geração (1G): produção de açúcares C6 (pré-tratamento e hidrolisado enzimático), e a fermentação da mistura do hidrolisado produzido com melaço (junção das primeira e segunda gerações). Adicionalmente dentro desse trabalho é realizado o desenvolvimento das ferramentas computacionais: uma modelagem cinética, a monitoração *online* e o controle preditivo baseado em modelo usando Redes Neurais Artificiais (Figura 1).

A partir dos dados experimentais de concentração de células (X), substrato (S) e etanol (P), bem como medições *on-line* (temperatura, vazão de CO₂, pH, capacitância), entre outras observações experimentais, foram utilizados para o ajuste e validação dos modelos matemáticos e ferramentas computacionais geradas. Os modelos cinéticos podem prever resultados capazes de explicar o comportamento real do processo de fermentação como o crescimento celular, o consumo de substrato e a produção de etanol para os diferentes sistemas de fermentação de etanol considerados. Um procedimento avançado de estimação de parâmetros dependentes da temperatura foi utilizado para garantir a precisão dos modelos propostos. Nesta abordagem, a influência da temperatura sobre o comportamento cinético da fermentação foi explicitamente demonstrada. Posteriormente, os modelos cinéticos foram utilizados para realizar a modelagem e simulação de uma planta de produção de etanol 1G+2G de um processo de fermentação

contínua. O sistema é um típico processo industrial brasileiro em larga escala composto por quatro fermentadores anexados em série e operados com reciclagem celular. Os modelos foram implementados em linguagem de programação *Matlab*[®], e como resultado obteve-se uma planta virtual de produção de etanol 1G+2G para cada sistema estudado. O desempenho da fermentação foi avaliado para os diferentes sistemas.

Neste trabalho, foi dado uma grande ênfase no uso das Redes Neurais Artificias (RNA) no desenvolvimento de *soft-sensors* para a monitoração *on-line* do processo de fermentação de etanol 1G+2G, bem como na obtenção de medições precisas das variáveis de estado do sistema necessárias para os esquemas de controle preditivo propostos. Os resultados da aplicação dos *soft-sensors* mostraram que conseguem modelar a informação fornecida e foi constatado que são uma ferramenta poderosa para obter informação do processo com um baixo custo, pois, é possível inferir com precisão as concentrações de substrato, etanol e células a partir de informações *on-line* facilmente mensuráveis. Utilizando a simulação dinâmica da planta virtual de produção de etanol 1G+G2, foi aplicado um controle preditivo NNMPC para lidar com as flutuações da concentração de açúcar na matéria-prima. O objetivo do controle é manter a concentração de açúcar da saída do quarto reator no seu *set-point*, manipulando a vazão de alimentação. Através de simulações em malha fechada foi verificado que os algoritmos de controle não lineares propostos neste trabalho provam ser eficientes e robustos, pois forneceram bons resultados em problemas de controle dos tipos servo e regulatório.

Finalmente, essa tese de doutorado é estudo de um novo passo para a modernização a baixo custo da indústria de etanol brasileiro, visando a constituição de fábricas inteligentes capazes de uma maior adaptabilidade às necessidades e desafios desse processo de produção, assim como o melhor uso dos recursos abrindo a via para uma nova revolução industrial.



Figura 1. Esquema geral do projeto

1.1. Organização da Tese

Apresenta-se a seguir, de forma sucinta, os tópicos que são abordados nessa tese de doutorado:

O **capítulo 2** apresenta uma revisão bibliográfica sobre processos fermentativos, modelagem, redes neurais artificiais, *soft-sensors*, uso de redes neurais artificiais no controle avançado e controle avançado nos processos de engenharia química. Adicionalmente, diferentes tipos de sensores e de reatores de fermentação, pré-tratamento, hidrólise enzimática, e tudo que for relacionado ao processo de segunda geração foram estudados.

Apresenta-se, no **capítulo 3**, os materiais, metodologias e resultados dos experimentos realizados da fermentação em configuração batelada, usando o hidrolisado celulósico de cana-de-açúcar como fonte de carbono, provenientes de dois tipos de pré-tratamentos: peróxido de hidrogênio, hidrotérmico catalisado com ácido; e hidrotérmico catalisado com ácido acoplado ao um processo de deslignificação com NaOH misturado com melaço de cana-de-açúcar. Essas fermentações foram realizadas em diferentes temperaturas (30, 32, 34 e 36° C), objetivando a correlação dos parâmetros cinéticos com esta variável.

A modelagem matemática da fermentação alcoólica foi desenvolvida **no capítulo 4**. Os modelos cinéticos foram obtidos com o objetivo da descrição satisfatória do crescimento do microrganismo, o consumo do substrato e a formação de produto por meio da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Para o desenvolvimento da modelagem, foram realizadas as seguintes etapas: ajuste dos dados experimentais a curvas sigmoidais, determinação das velocidades instantâneas e específicas, estimativa dos parâmetros cinéticos, avaliação da qualidade dos parâmetros estimados e a análise do efeito da temperatura nos parâmetros cinéticos. Nos resultados, observa-se que o modelo cinético escolhido foi satisfatório, uma vez que o mesmo ajustou-se bem aos dados experimentais do sistema em batelada, obtendo desvios menores que 20 %, em sua maioria.

Neste contexto, o **capítulo 5** tem como objetivo empregar a modelagem matemática desenvolvida para analisar o comportamento dinâmico de um processo de fermentação de etanol 1G + 2G. O objetivo desse estudo foi estudar o comportamento dos modelos cinéticos em relação às concentrações de etanol, substrato, células e como o rendimento e a produtividade são influenciados pelas características de cada sistema. A planta industrial foi baseada no processo de fermentação contínua, o qual foi apresentado nos trabalhos de Andrietta (1994) e Meleiro (2002). A simulação dinâmica foi implementada no software *Matlab*®, e como resultado obteve-se a planta virtual de produção de etanol 1G+2G.

No **capítulo 6**, um *soft-sensor* foi desenvolvido para inferir informação da concentração de substrato, células e produtos, a partir de medidas secundárias de pH, capacitância ou turbidez, vazão de CO₂ e temperatura. O *soft-sensor* usa um modelo matemático que consiste em uma Rede Neural Artificial (RNA) com camadas múltiplas. Os dados experimentais usados no treinamento da RNA foram os obtidos nas bateladas da mistura do hidrolisado enzimático, realizadas entre 30 e 36 °C, mencionadas no **capítulo 3**. As RNAs desenvolvidas são modelos matemáticos robustos que descrevem adequadamente o processo fermentativo, inclusive na presença de mudanças nas condições operacionais. Portanto, esta é uma poderosa ferramenta para a predição de concentrações no processo fermentativo, a qual será usada para o monitoramento do processo e como sensor no processo de controle de forma *online*.

O **capítulo 7** apresenta o uso de redes neurais artificiais RNA, de tipo *feed forward*, para a modelagem dinâmica e controle da concentração de açúcares no efluente da planta industrial *Se4*. O modelo fenomenológico do processo é utilizado para gerar os dados de treinamento das RNA. Assim, diferentes RNA vão ser criadas e treinadas usando

o algoritmo de aprendizado *back propagation*. Para os sistemas S1, S2, S3, S4 e S5, RNAs com diferentes números de neurônios na camada intermediária vão ser construídas, para que a partir dos valores dos erros, seja possível a escolha das melhores estruturas, sendo as mais simples possíveis, para evitar altos custos computacionais e o *overfitting*. A robustez do controlador vai ser estudada por meio de mudanças no *set-point*, chamado problema *servo*, e criando perturbações na concentração dos açúcares na entrada *So*.

No **capítulo 8** é apresentado o artigo: *Co-treatment for low-cost fermentation of cellulosic Brazilian biomass*. Esse trabalho visa o desenvolvimento de uma nova aproximação para superar a barreira da recalcitrância. A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) aceitou o projeto enviado para adquirir a Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) – n° 2016/06417-9, e deu apoio financeiro para a realização de um estágio em *Dartmouth College*, universidade localizada na cidade de Hanover, no estado de New Hampshire, nos Estados Unidos da América, sob a supervisão do Prof. Dr. Lee Lynd. Neste trabalho, um rompimento físico simultaneamente com um processo biológico foi proposto, chamado de *co-treatment*, e o objetivo principal deste processo de fermentação inovador é usar o material lignocelulósico brasileiro para a produção de bioetanol, visando a diminuição dos custos, já que o problema envolve o custo das enzimas, por meio da utilização de bactérias termofílicas que conseguem produzir enzimas para degradar a matriz lignocelulósica, e simultaneamente consumir açúcares e produzir etanol.

O **capítulo 9** traz as conclusões gerais desta tese de doutorado, além de mencionar as sugestões para trabalhos futuros.

1.2. Objetivo Geral

O objetivo principal dessa Tese de Doutorado é o desenvolvimento e aplicação de técnicas e ferramentas computacionais, tais como modelos matemáticos, *soft-sensors* e esquemas de controle preditivo baseado em modelo usando Redes Neurais Artificiais (*neural network-based model predictive control-* NNMPC) para o processo de produção de etanol a partir da mistura de hidrolisado com melaço de cana-de-açúcar (1G+2G) que auxiliem na diminuição dos custos de produção do etanol combustível e possibilitem uma operação mais estável independentemente de variações na matéria prima, que por sua vez contribui com a viabilidade econômica da produção do etanol combustível.

1.3. Objetivos específicos

- Revisão bibliográfica com ênfases nos processos de primeira e segunda geração, teoria de RNA e modelagem e controle de processos utilizando técnicas de inteligência artificial.
- Realização de experimentos de pré-tratamento, hidrólise enzimática para produção dos açúcares decorrentes de três pré-tratamento (pré-tratamento ácido, pré-tratamento ácido mais deslignificação com NaOH, e peróxido de hidrogênio) e dos níveis de hidrolise enzimática (8 % e 3 % m/v).
- Realização de fermentações em batelada com a finalidade de obter dados de concentração de células, substrato (ART) e etanol ao longo do experimento.
- Modelagem matemática do processo com a determinação dos parâmetros cinéticos considerando o efeito da temperatura.
- Realização da planta virtual de produção de etanol.
- Desenvolver as arquiteturas e modelos de redes neurais utilizados para inferir a cinética do processo fermentativo, como concentrações de substrato, células e produtos.
- Desenvolver e implementar um controlador baseado no MPC- *Model Predictive Control* tendo como modelo interno uma rede neuronal com o objetivo de para operar, otimizar, manter a planta industrial nos valores estabelecidos ou utilizados na indústria, e minimizar os problemas relacionados com as perturbações.

1.4. Principais Contribuições do Trabalho

- Realização de 5 modelos cinéticos com parâmetros dependentes da temperatura, (programa computacional);
- Simulação de uma planta industrial no programa Matlab, aplicando os modelos cinéticos;
- Metodologia para o desenvolvimento de um *soft-sensor* que infere concentrações de X, S e P no processo fermentativo;
- Controle NNMPC bem-sucedido, utilizando como modelo interno uma RNA tipo MLP, da forma "passo a diante" no processo fermentativo.

Produção Bibliográfica:

Artigos completos publicados em periódicos

- Herrera, W. E., Rivera, E. C., Alvarez, L. A., Tovar, L. P., Tamayo, S. R., Yamakawa, C. K. and Bonomi, A. (2016) 'Modeling and Control of a Continuous Ethanol Fermentation Using a Mixture of Enzymatic Hydrolysate and Molasses from Sugarcane', Chemical Engineering Transactions, 50, pp. 169–174. doi: 10.3303/CET1650029.
- Yamakawa, C. K., Tamayo, S. R., Geraldo, V. C., Elmer, A. C., Herrera, W. E., Bonomi, A., Rossell, C. E. V and Rubens, M. (2016) 'Ethanol Fermentation of Cellulosic Hydrolysate from Sugarcane Bagasse to Develop Stand-Alone Second Generation Ethanol Plant', Chemical Engineering Transactions, 50, pp. 163–168. doi: 10.3303/CET1650028.
- **3.** Herrera, W. E., Ccopa, E. and Maciel Filho, R. (2014) 'On-Line Measurements and Modelling Study in Second Generation Ethanol Production from Sugarcane', Chemical Engineering Transactions, 37, pp. 415–420. doi: 10.3303/CET1437070.
- 4. Herrera, W. E. and Filho, R. M. (2013) 'Development of a monitoring hybrid system for bioethanol production', Chemical Engineering Transactions, 32, pp. 943–948. doi: 10.3303/CET1332158.

Capítulos de Livros publicados

Farias, F. S., Azevedo, R. A., Rivera, E. C., Herrera, W. E., Filho, R. M. and Lima, L. P. (2014) 'Product Quality Monitoring Using Extreme Learning Machines and Bat algorithms: A Case Study in Second-Generation Ethanol Production', in Computer Aided Chemical Engineering, pp. 955–960. doi: 10.1016/B978-0-444-63456-6.50160-5.

Trabalhos publicados em anais de eventos

- 1. Herrera, W.E., Holwerda, E. K. Maciel Filho, R., Lynd, L. R. High solubilization of sugarcane bagasse by cellulolytic thermophilic bacteria (C. thermocellum) and in-situ milling (cotreatment) for low-cost ethanol production. 39th Symposium on Biotechnology for fuels and Chemicals, San Francisco, CA, May 02, 2017.
- 2. Yamakawa, C. K., Rabelo, S.C. Bonomi, A., Rossell C.E.V., Herrera, W.E., Rivera, E.C., Maciel Filho, R. Assessment of cellulosic hydrolysate fermentation integrated to first generation ethanol production. 38th Symposium on Biotechnology for fuels and Chemicals. Baltimore, MD, USA April 25-28, 2016.
- **3.** Herrera, W.E., Rivera, E.C., Yamakawa, C. K., Tovar, L. P., Geraldo, V.C., Rossell C.E.V., Maciel Filho, R. Kinetic study of ethanol fermentation from sugarcane bagasse enzymatic hydrolyzate concentrated with molasses. 37th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals" April 27-30, 2015. San Diego, CA, USA.
- 4. Herrera, W. E., Geraldo, V.C., Guimarães, H.R., Rivera, E.C. and Maciel Filho, R,. Software sensor for process monitoring of second-generation biofuel production from sugarcane bagasse hydrolyzate. 36th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. April 28-May 1, 2014. Miami, US.
- Yamakawa, C. K., Herrera, W.E., Saad, M.B.W., Geraldo, V.C., Rivera, E.C., Rossell C.E.V., Maciel, R., Bonomi A. Investigating acid treatment parameters in ethanol fermentation process with cell recycling. 2nd Bioenergy Science and Technology (BBEST). October 20th-24th, 2014, Convention Center of Campos do Jordão, São Paulo, Brazil

Apresentação de trabalho e palestra

1. Herrera, W. E. and Maciel Filho, R. M. (2013) 'Development of a monitoring hybrid system for bioethanol production' 11th International Conference on Chemical & Process Engineering 2-5 June 2013 - Milan, Italy

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

35

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção apresenta-se uma revisão da literatura sobre processos fermentativos, modelagem, redes neurais artificiais, *soft-sensors*, uso de redes neurais artificiais no controle avançado e controle avançado nos processos de engenharia química. Adicionalmente, os processos de pré-tratamento, hidrólise enzimática, diferentes tipos de sensores, de reatores de fermentação, e temas relacionados ao processo de segunda geração foram estudados.

2.1. Introdução

Na história da humanidade diferentes tipos de bebidas alcoólicas foram feitos de variados produtos como frutas, cana-de-açúcar, mel, e cereais como a cevada, trigo e outros. Os processos de fermentação já eram utilizados aproximadamente oito mil anos atrás. Na Babilônia cinco mil anos atrás, nas origens da cerveja, foi descoberta a transformação da massa de cevada mais o acréscimo de grandes quantidades de agua, para um produto que deixado pela ação dos elementos se converteria numa bebida de grandes capacidades alimentícias. Esse conhecimento aparentemente foi transmitido para os gregos, romanos, e posteriormente às tribos nórdicas que por suas habilidades de trabalhar com madeiras deram características próprias à bebida e geraram a base dos tipos de cervejas que atualmente se conhecem.

As bebidas alcoólicas têm diferenças notáveis por suas características, porém todas elas têm mesma origem comum: a fermentação alcoólica. Esse é um processo biológico no qual a glicose, frutose e sacarose são convertidos em energia celular com uma produção de álcool etílico, gás carbônico e glicerol, sob a ação enzimática das leveduras. Esse processo utiliza um microrganismo unicelular que é a *Saccharomyces cerevisiae*. Essa levedura é o agente responsável pela fermentação do vinho, cerveja, bebidas alcoólicas e também para a produção de pães, basicamente em todos os processos modernos de fermentação. (CAVALERI *et al.*, 2003).

Plantas com alto teor de açúcares são utilizadas na produção de etanol, como canade-açúcar e milho, com uma produção de 97.217 bilhões de litros combustível no mundo para o ano 2015 (RFA, 2018). O etanol tem sido considerado como uma alternativa para diminuir problemas ambientais e energéticos no mundo em consequência da problemática dos combustíveis fosseis pela polução que produzem. Nesse cenário, Brasil
como o maior produtor de etanol de cana-de-açúcar tem um interesse econômico e ambiental para que as usinas de produção etanol de primeira geração (1G) sejam utilizadas para o processo de produção de etanol celulósico ou de segunda geração (2G), aproveitando a disponibilidade da matéria prima disponível e as instalações que podem ser compartilhadas e reduzir os investimentos. O processo de segunda geração está estruturado basicamente em três processo para a obtenção de etanol celulósico: pré-tratamento, hidrolise enzimática e fermentação.

Atualmente, há um incentivo para o desenvolvimento de fontes de energia com o objetivo de atender as exigências ambientais, para contribuir com o desenvolvimento social mais amplo e para reduzir a instabilidade política e o aumento dos preços do combustíveis fósseis (SAWIM *et al.*, 2012). Levando isso em conta, a produção de biocombustíveis e bioenergia a partir de biomassa parece ser uma possível alternativa que possa ser explorada. Na verdade, o uso racional dos recursos renováveis pode ter uma contribuição significativa na matriz energética mundial (HERRERA *et al.* 2014).

2.2. Pré-Tratamento

O pré-tratamento é o primeiro passo no processo do bioetanol. O objetivo do prétratamento é alterar a composição do bagaço de cana-de-açúcar, modificando sua matriz lignocelulósica, deixando a estrutura sem impedimentos, visando aumentar a exposição das fibras de celulose, tornando-a mais acessível para a sacarificação enzimática. Os processos de separação dos componentes nos materiais lignocelulósicos compreendem várias técnicas de pré-tratamento, incluindo processos físicos, químicos, mecânicos e biológicos (RABELO, 2010; HAGHIGHI MOOD *et al.* 2013).



Figura 2. Esquema do pré-tratamento do material lignocelulósico (HAGHIGHI MOOD *et al.*, 2013)

2.3. Hidrólise Enzimática

Após a etapa de pré-tratamento e a remoção de lignina restante desse processo, uma etapa de hidrólise da celulose é necessária para obtenção de açúcares fermentescíveis (SAVIOLI, 2015). A hidrólise é um processo de obtenção de açúcares fermentescíveis diretamente da biomassa lignocelulósica. Esta reação, em condições apropriadas, obtém a conversão das hemiceluloses em monossacarídeos, e da celulose em D-glicose, (GOMEZ, 2010).

No caso da produção de etanol de segunda geração, dois processos são concebidos: a hidrólise ácida e a hidrólise enzimática.

A hidrólise ácida tem rendimentos maiores quando comparada com sua homóloga, mas gera resíduos sólidos poluentes e produtos que inibem a fermentação, existindo a possibilidade de decomposição da glicose. Nesse processo, a hemicelulose é solubilizada mais rapidamente que a celulose. Sendo assim, toda a xilose produzida é totalmente decomposta em furfural, gerando problemas de inibição microbiana (SAVIOLI, 2015).

A hidrólise enzimática consiste em uma reação química catalisada por um complexo enzimático, na presença de água, para transformar uma molécula grande em outras duas moléculas. Estas enzimas produzem um efeito catalítico hidrolisado, o qual

gera a ruptura de enlaces por água. Um dos produtos da reação catalisada recebe um grupo OH⁻, enquanto que o outro recebe um próton de hidrogênio e são incorporados na estrutura química (GOMEZ, 2010; PLAZAS, 2015).

Na hidrólise enzimática observa-se a existência de um maior rendimento na produção de açúcares fermentescíveis em comparação à hidrólise ácida, devido a menor formação de subprodutos, dado que as condições de reação foram moderadas. A fermentação desses açúcares foi comparada a uma fermentação de solução de glucose e os rendimentos foram similares (RABELO *et al.*, 2011).

2.4. Fermentação alcoólica

A partir do momento em que a levedura entra em contato com o mosto, o processo fermentativo é iniciado, e este pode ser dividido em três fases. A fase inicial caracterizase pela intensa atividade de multiplicação celular, pouco desprendimento de gás carbônico e mínima elevação da temperatura. A segunda fase, a qual pode ser considerada principal, ocorre o maior desprendimento de CO₂, formação rápida de álcool devido a quantidade de células vivas e caracteriza-se pelo aumento da temperatura e produção de álcool. A última fase consiste na redução da atividade fermentativa e diminuição do desprendimento de CO₂ até a finalização do processo (BASSO *et al.*, 2001). Os tipos de operações de processos fermentativos são variados, sendo que a batelada simples, a batelada alimentada e o processo contínuo são os mais utilizados (SRIVASTAVA *et al.*, 2011; PENIA KRESNOWATI *et al.*, 2011).

2.4.1. Tipos de Operações de Processos Fermentativos

As formas de operação dos processos fermentativos são variadas, as mais utilizadas são a fermentação descontínua e a fermentação descontínua alimentada, sendo que o substrato é colocado gradualmente durante o processo. Outro tipo de processo é a fermentação contínua, a qual tem saída de produtos e entrada de substrato, células ou algum outro componente que favoreça a fermentação ocorrendo simultaneamente. Todos esses processos são diferentes entre eles, e produzem grandes efeitos sobre a produtividade e rendimento de um determinado processo.

Fermentação Descontínua

Fermentação descontínua ou também conhecida como fermentação batelada, *batch* ou por carga é utilizada desde a antiguidade, e ainda hoje são as mais empregadas para a obtenção de vários produtos.

O biorreator usado neste processo caracteriza-se por uma composição uniforme dos reagentes, já que possui uma ótima mistura. Este geralmente é usado para operações em menor escala, para processos que não foram completamente desenvolvidos, e processos que são difíceis de converter em processos contínuos. A vantagem deste reator é a alta conversão que pode ser obtida pelos longos períodos de permanência dos reagentes dentro dele. Algumas das desvantagens são o alto custo de trabalho, variabilidade dos produtos entre batelada e a dificuldade de produção em grande escala (FOGLER, 2006).

O modo de operação no processo de fermentação batelada inicia com a carga do mosto dentro do reator, o qual pode estar esterilizado para garantir a ausência de microrganismos antes da inoculação, ou simplesmente é adicionado de forma inalterada, sem esterilizar. Durante o processo de fermentação algumas soluções podem ser adicionadas para controlar o pH como é o caso de ácidos e bases, ou para o controle da espuma (antiespumantes). Nos processos aeróbicos é adicionado oxigênio. A fermentação é mantida até esgotar os nutrientes. Finalizada a fermentação descarrega-se a dorna, e o meio fermentado é enviado para recuperação do produto, e novamente a dorna é utilizada para outra fermentação. (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

O volume da fermentação descontínua pode permanecer constante, se não houver perda de líquidos por evaporação e amostragens, ou se no decorrer não foram adicionadas soluções para o controle do processo. Os processos de fermentação descontínuos normalmente se caracterizam por ter volumes constantes. (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

O substrato utilizado no processo fermentativo pode exercer efeitos de inibição ou desvio do metabolismo celular para produção de outros produtos que não sejam de interesse, e como consequência, pode conduzir a rendimentos e produtividades baixos. Outra característica desse processo está relacionada aos tempos mortos, nos quais equivalem aos períodos em que o fermentador pode estar sendo alimentado ou descarregado, e passando por período de limpeza ou esterilização. Os tempos mortos são os períodos de tempo em que o fermentador não está sendo utilizado para a geração de produtos.

O processo descontínuo apresenta vantagens, pois apresenta menos riscos de contaminação em comparação com os outros tipos de fermentação. Além disso, também apresenta uma grande flexibilidade de operação devido à possibilidade de utilização dos fermentadores na fabricação de diferentes produtos, na realização de etapas consecutivas, e na possibilidade de identificar todos os componentes quando um lote está sendo utilizado, sendo fundamental para algumas indústrias (*e.g.* indústria farmacêutica) (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

O processo de batelada com altos teores de substrato pode causar inibição no crescimento do microrganismo, levando à baixos níveis de rendimento na reação. Além disso, nos processos fermentativos, deve-se trabalhar com o equipamento esterilizado para que outros microrganismos não inibam o crescimento das leveduras. Para isso, é importante a total assepsia durante o processo de inoculação e carga do reator (CARVALHO *et al.*, 2001).

Fermentação Descontínua Alimentada

O processo de fermentação semicontínua, descontínua alimentada ou *fed batch* começa com uma quantidade de nutrientes dentro do reator no momento da inoculação, na qual um ou vários nutrientes são adicionados no decorrer da fermentação, e os produtos permanecem dentro do recipiente até o final do processo.

Este processo é de um tipo específico, no qual o substrato é alimentado constantemente no percurso da fermentação, atingindo uma concentração constante e resulta em um sistema com volume variável. Este processo é bem-sucedido, já que elimina a inibição pelo substrato, oferecendo altas produtividades, geralmente maiores que o obtido na batelada simples. Os balanços de massa são similares ao processo com reator *batch*, porém com a adição do termo "alimentada", o volume do reator torna-se variável. (ARAUJO, 2004).

A variação da vazão de alimentação dos nutrientes que entram nas dornas permite realizar um controle não só da concentração do substrato no reator, como também dos produtos que se formam dentro do fermentador. Além disso, essa manipulação permite que o microrganismo seja conduzido para uma via metabólica, aumentando a produção de um produto específico (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Uma das maiores vantagens desse processo é a prevenção dos processos inibitórios por substratos ou outra fonte de nutriente que possa ter tal efeito. Outra vantagem é a minimização de erros dos efeitos de controle do metabolismo celular, e também a redução da formação de metabolismos tóxicos (ARAUJO, 2004).

Fermentação Contínua

A fermentação contínua é um processo de fermentação em estado estacionário, no qual o substrato é continuamente adicionado ao fermentador, enquanto produtos e resíduos são removidos em um fluxo constante. Assim, o processo consegue manter um volume constante.

Nesse processo, um reator CSRT (*Continuos Stirred Tank Reactor*) é utilizado, o qual caracteriza-se por ser um tanque agitado e operado em processo contínuo, assumindo-se que ocorre uma mistura completa. Consequentemente, este reator não tem dependência do tempo ou da temperatura com a posição, concentração ou taxa de reação no interior do CSRT. Todas as variáveis são mantidas iguais em qualquer ponto do reator, devido a temperatura e a concentração serem as mesmas (FOGLER, 2006).

Alguns fatores positivos da fermentação contínua (PESSOA, 1997) são:

- O regime da fermentação, permitindo que o microrganismo trabalhe sempre em condições de alta atividade metabólica;
- O produto obtido é mais uniforme, pois está na fase estacionária;
- Não existem tempos mortos nesta forma de operação, tendo equipamentos menores para a mesma produção;
- A produtividade volumétrica é aumentada devido a retirada de uma concentração constante do álcool produzido. Assim, consegue-se fermentar altas concentrações de açúcares sem o efeito inibidor do etanol.

O processo contínuo permite obter um maior rendimento, melhor controle e aumento de produtividade (ATALA *et al.*, 2001). Além disso, possibilita a reciclagem de células continuamente se o fermentador for acoplado à uma centrífuga, membrana ou sedimentador. O meio com produto é enviado para o sistema de purificação e reciclado ao processo (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

2.5. Modelagem Matemática do Processo Fermentativo

A modelagem de um processo representa o comportamento desse processo dentro de um sistema isolado por meio de equações matemáticas, como o balaço de massa, de energia e de quantidade de movimento de cada um dos componentes.

No caso do processo de fermentação, os balanços estão associados às complexas reações bioquímicas que são realizadas pelos microrganismos.

As velocidades instantâneas de transformação de um processo de fermentação para o crescimento do microrganismo (X), o consumo de substrato (S) e a formação de produtos (P) são escritas de acordo, Eqs. (1) a (3).

$$\frac{dX}{dt} = r_X \tag{1}$$

$$\frac{dS}{dt} = -r_s \tag{2}$$

$$\frac{dP}{dt} = r_p \tag{3}$$

Uma forma de definição de velocidade é a produtividade em termos de concentração das células e de produtos, representadas nas Equações (4) e (5), nas quais podem avaliar a performance do processo de fermentação (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Portanto a produtividade das células está representada na Equações (4).

$$P_r = \frac{P_m - P_o}{t_f} \tag{4}$$

Na qual, Pm é o valor final ou máximo de concentração do produto, Po é a concentração inicial do produto e t_f é o tempo total ou final de fermentação.

Para o caso de produtividade aplicada à concentração de produtos, tem-se a equação (5).

Capítulo 2. Revisão bibliográfica

$$P_x = \frac{X_m - X_o}{t_f} \tag{5}$$

No qual, *Xm* é o valor final ou máximo da concentração de células, e *Xo* é a concentração inicial.

Os valores de X, S e P podem-se relacionar entre si e gerar os fatores de converção.

$$Y_{x_{s}} = \frac{X - X_{o}}{S_{o} - S}$$
(6)

$$Y_{x/p} = \frac{X - X_o}{P - P_o} \tag{7}$$

$$Y_{p/s} = \frac{P - P_o}{S_o - S} \tag{8}$$

Contudo, se os fatores de conversão mencionados acima são constantes durante a fermentação, as equações a seguir podem ser determinadas:

$$Y_{x_s'} = \frac{dX}{-dS} \tag{9}$$

$$Y_{x/p} = \frac{dX}{dP} \tag{10}$$

$$Y_{\frac{p}{s}} = \frac{dP}{-dS} \tag{11}$$

A seguir, as Equações (12) a (14) definem as velocidades específicas de crescimento (μ), consumo de substrato e formação de produto respectivamente.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \tag{12}$$

$$\mu_s = \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \tag{13}$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \tag{14}$$

Modelagem é a representação matemática de um sistema ou processo real que pode representar algumas de suas características. As técnicas de modelagem podem ser agrupadas em duas grandes categorias: modelos fenomenológicos e modelos de entradasaída.

A primeira é a modelagem baseada na formulação de hipóteses, correlações teóricas ou empíricas, conhecida como modelagem fenomenológica ou determinística (SCHMIDELL *et al.*, 2001). Os modelos cinéticos do processo fermentativo podem ser classificados em dois tipos:

- a) Modelos não estruturados: modelos mais simples de crescimento que expressam em termos de unidades abstratas de vida, geralmente utilizando o termo de população microbiana, sem considerar variações de componentes intracelulares, pois, consideram a população como uma unidade homogênea.
- b) Modelos estruturados: diferentemente do não estruturado, este considera as células com maiores detalhes considerando componentes intracelulares. Esse tipo de modelo proporciona uma melhor descrição do estado das células na sua adaptação às variações do meio.

Em relação à heterogeneidade os modelos são classificados da seguinte forma:

- c) Modelos não segregados: a população celular está distribuída homogeneamente por todo o sistema, considerando que todas as células têm o mesmo comportamento. Consequentemente, a unidade fundamental é a concentração celular.
- d) Modelos segregados: Esses modelos consideram a população como indivíduos de uma polução heterogênea. Portanto, a unidade fundamental é o número de células.

Esta divisão dos modelos tem como base a forma com que o bioprocesso é abordado para o desenvolvimento dessa ferramenta (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Na abordagem dos modelos de entrada e saída, o desenvolvimento do modelo está relacionado com as observações do comportamento do sistema por meio de medições. Especificamente um modelo de entrada-saída realiza inferências de informação a partir

de dados de entrada no sistema e dados de saída, pois, este relaciona ou associa informação do sistema com um conhecimento pouco detalhado do processo. Nesse tipo de modelagem é importante ter uma base de dados que seja abrangente no domínio da aplicação do modelo já que uma das principais desvantagens é a impossibilidade de realizar extrapolações.

Para esse estudo de caso foi desenvolvido um modelo fenomenológico do processo fermentativo de tipo não estruturado e não segregado. A seguir apresenta-se o desenvolvimento desse modelo:

A equação geral do balanço está expressa na equação (15)

$$(Acúmulo) = (entrada) - (saída) + (gerado) - (consumido)$$
(15)

2.5.1. Balanço de Massa na Fermentação em Batelada

A velocidade instantânea de crescimento do microrganismo está representada na Eq. (16):

$$r_x = \mu_x X \tag{16}$$

Reescrevendo a Eq. (9), $Y_{X_{s}}$ fica definida como:

$$Y_{x_{s}} = \frac{dX/dt}{-dS/dt} = \frac{r_{x}}{r_{s}}$$
(17)

Organizando o termo anterior temos que a variação de substrato em relação ao tempo fica definido como:

$$\frac{dS}{dt} = -\mu_x \frac{X}{Y_{x/s}}$$
(18)

A velocidade instantânea de consumo de substrato está representada na Eq. (19):

$$r_s = \mu_s X \tag{19}$$

A velocidade instantânea de consumo de formação de produto está representada na Eq. (20):

$$r_p = \mu_p X \tag{20}$$

Reescrevendo a Eq. (10), $Y_{X_{p}}$ fica definida como:

$$Y_{x_{p}} = \frac{dX/dt}{dP/dt} = \frac{r_{x}}{r_{p}}$$
(21)

Substituindo a Eq. (16) e Eq. (3) na Eq. (22), tem-se:

$$Y_{x_{p}} = \frac{dX/dt}{dP/dt} = \frac{r_{x}}{r_{p}} = \frac{\mu_{x}X}{dP/dt}$$
(22)

Portanto, ambas a variação de produto e a variação da concentração celular, em relação ao tempo ficam definidas como:

$$\frac{dP}{dt} = \mu_x \frac{X}{Y_{x/p}}$$
(23)

$$\frac{dX}{dt} = \mu_x X \tag{24}$$

2.5.2. Balanço para Fermentação em Batelada Alimentada

O modelo fenomenológico para a batelada alimentada é desenvolvido a partir das equações de balanço de massa global do sistema e para cada um dos seus componentes.

O balanço global fica definido como:

$$\frac{d\rho V}{dt} = \rho_M F_M \tag{25}$$

Na qual:

 ρ_M = massa específica;

 F_M = vazão de alimentação.

Estabelece que $\rho_{MF} = \rho$, uma vez que não existe uma diferença significativa no sistema. Portanto, a Eq. (25), se transforma na Eq. (26).

$$\frac{dV}{dt} = F_{MF} \tag{26}$$

Balanço de Massa para Substrato

A velocidade da variação de massa de substrato no fermentador é a subtração entre a massa de substrato que entra e a massa consumida no processo fermentativo. Então, tem-se:

$$\frac{dSV}{dt} = F_{MF}S_{MF} - r_s V \tag{27}$$

Substituindo a Eq. (18) na Eq. (27) *MF* representa o meio de fermentação. Assim, a Eq. (28) pode ser escrita como:

$$\frac{dSV}{dt} = F_{MF}S_{MF} - \mu_x \frac{X}{Y_{X/s}}V$$
(28)

Derivando a Eq. (28), então:

$$V\frac{dS}{dt} + S\frac{dV}{dt} = F_{MF}S_{MF} - \mu_x \frac{X}{Y_{x/s}}V$$
⁽²⁹⁾

Substituindo a Eq. (26), tem-se:

$$V\frac{dS}{dt} + F_{MF}S = F_{MF}S_{MF} - \mu_x \frac{X}{Y_{x/s}}V$$
⁽³⁰⁾

Reorganizando a Eq.(30) é importante ressaltar que V varia com o tempo, então tem-se:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F_{MF}}{V} (F_{MF}S_{MF} - S) - \mu_x \frac{X}{Y_{X/S}}$$
(31)

Balanço de Massa para o Produto

A velocidade de formação de produto no reator está representada pelo balanço de massa, e fica definida como:

$$\frac{dPV}{dt} = F_{MF}P_{MF} - r_{p}V \tag{32}$$

A concentração do produto na alimentação é igual a zero. Assim, é eliminado o termo de entrada massa de produto, como resultado a equação fica simplificada. Considerando as Eq. (3) e (23) são substituídas na Eq. (32). Então, a expressão fica definida como:

$$\frac{dPV}{dt} = \mu_x \frac{X}{Y_{x/p}} V$$
⁽³³⁾

Derivando a Eq. (33) tem-se:

$$V\frac{dP}{dt} + P\frac{dV}{dt} = \mu_x \frac{X}{Y_{x/s}}V$$
(34)

Ao substituir a Eq.(26) em (34), tem-se:

$$V\frac{dP}{dt} + PF_{MF} = \mu_x \frac{X}{Y_{x/s}}V$$
(35)

Reorganizando a Eq.(35) e considerando o volume reacional constante e diferente de zero, tem-se:

$$\frac{dP}{dt} = \mu_x \frac{X}{Y_{x/s}} - \frac{PF_{MF}}{V}$$
(36)

Balanço de Massa para as Células

A equação de balanço de massa fica definida como:

$$\frac{dXV}{dt} = F_{MF} X_{MF} - r_x V \tag{37}$$

As células não estão presentes na vazão de alimentação, tendo seu valor é igual a zero. Assim é eliminado o termo de entrada de massa de células, e como resultado, a equação fica simplificada. Substituindo as Eq. (1) e (24) são substituídas na Eq. (37), a expressão fica definida como:

$$\frac{dXV}{dt} = \mu_x XV \tag{38}$$

Derivando a Eq.(38), obtém-se:

$$V\frac{dX}{dt} + X\frac{dV}{dt} = \mu_x XV \tag{39}$$

Ao substituir a Eq.(26) em (39), tem-se:

$$V\frac{dX}{dt} + XF_{MF} = \mu_x XV \tag{40}$$

Reorganizando a Eq. (40), tem-se:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_x X - \frac{XF_{MF}}{V}$$
(41)

2.5.3. Balanço de Massa e Energia para um Reator Contínuo

Balanço de Massa para cada Reator

• Balanço de massa total

$$\frac{dV_i}{dt} = F_{i-1} - F_i \tag{42}$$

Na equação as variáveis são: V é o volume do reator; F é a vazão de alimentação.

• Balanço de massa para cada componente:

Pode-se descrever o seguinte balanço material para o microrganismo, considerando o reator como volume de controle (volume constante):

$$V_i \frac{d(X_i)}{dt} = F_{i-1} X_{i-1} - F_i X_i + V\left(\frac{dX}{dt}\right)$$
⁽⁴³⁾

• Balanço material de substrato:

$$V_i \frac{d(S_i)}{dt} = F_{i-1}S_{i-1} - F_iS_i + V\left(\frac{dS}{dt}\right)$$
(44)

• Balanço material de produto, se expressa como:

$$V_{i}\frac{d(P_{i})}{dt} = F_{i-1}P_{i-1} - F_{i}P_{i} + V\left(\frac{dP}{dt}\right)$$
(45)

A velocidade global instantânea de crescimento celular pode ser expressa como:

$$r_{X} = \left(\frac{dX}{dt}\right) = \mu X \tag{46}$$

A velocidade global instantânea de consumo de substrato se expressa como:

$$r_{S} = -\left(\frac{dS}{dt}\right) = \frac{r_{X}}{Y_{X/S}}$$

$$\tag{47}$$

A velocidade global instantânea de produção de etanol pode ser expressa como:

$$r_{p} = \left(\frac{dP}{dt}\right) = \frac{r_{x}}{Y_{x/p}} = r_{x} \left(\frac{Y_{p/s}}{Y_{x/s}}\right)$$
(48)

Substituindo-se as velocidades globais instantâneas equações (46), (47), e (48) pelo balanço material para cada componente equações (43), (44), e (45) obtêm-se as equações no estado transiente do balanço de massa: equação (49) para células; equação (50) para o substrato; e a equação (51) para o etanol.

$$\frac{d(V_i X_i)}{dt} = F_{i-1} X_{i-1} - F_i X_i + V_i X_i \mu$$
(49)

Tese de Doutorado - William Eduardo Herrera Agudelo

$$\frac{d(V_{i}S_{i})}{dt} = F_{i-1}S_{i-1} - F_{i}S_{i} + \left(\frac{V_{i}X_{i}}{Y_{X/S}}\right)\mu$$
(50)

$$\frac{d(V_i P_i)}{dt} = F_{i-1} P_{i-1} - F_i P_i + V_i X_i \left(\frac{Y_{p/S}}{Y_{X/S}}\right) \mu$$
(51)

No qual, *S* é a concentração de substrato; *X* é a concentração de células; *P*é a concentração de etanol; *F* é a vazão de alimentação; *V* é o volume do reator; $Y_{X/S}$ é o fator de conversão de substrato em célula; $Y_{P/S}$ é o fator de conversão de produto em célula; μ é a velocidade específica de crescimento correspondente ao modelo de crescimento que é derivado do modelo de *Monod*.

Balanços de Energia

• Balanço de energia do fluido reagente nos reatores:

$$\frac{\rho C_p d(V_i T_i)}{dt} = F_{i-1} T_{i-1} \rho C_p - F_i T_i \rho C_p + \rho C_p F c_i (T c_i - T_i) - V_i \Delta H r_s$$
(52)

$$\frac{d(V_i T_i)}{dt} = F_{i-1} T_{i-1} - F_i T_i + F c_i \left(T c_i - T_i\right) - \left(\frac{V_i \Delta H X_i}{\rho C_p Y_{X/S}}\right) \mu_i$$
(53)

No qual, Fc é a vazão de fluido reagente no trocador de calor; Tc é a temperatura do fluido reagente na saída do trocador de calor; ΔH é o calor da reação; Cp é a capacidade calorífica do fluido reagente; e ρ é a densidade do meio reacional.

• Balanço de energia do fluido reagente nos trocadores de calor: Para o trocador de calor tem-se que:

$$\frac{\rho C p d(V c_i T c_i)}{dt} = \rho C p F c_i (T c_i - T_i) - U A_i L M D T_i$$
(54)

Considerou-se Vc_i volume do fluido reagente no trocador de calor como constante.

$$\frac{d(Tc_i)}{dt} = \frac{Fc_i}{Vc_i} \left(Tc_i - T_i \right) - \left(\frac{UA_i}{\rho C p V c_i} \right) LMDT_i$$
(55)

U é o coeficiente global de troca térmica; A é a área de troca térmica; e $LMDT_i$ é a diferença de temperatura logarítmica.

$$LMDT_{i} = \frac{\left(T_{i} - Tj_{i}\right) - \left(Tc_{i} - Tj_{e}\right)}{Ln\left(\frac{T_{i} - Tj_{i}}{Tc_{i} - Tj_{e}}\right)}$$
(56)

• Balanço de energia do fluido refrigerante nos trocadores de calor:

$$\frac{\rho_j C p_j d(V j_i T j_i)}{dt} = \rho_j C p_j F j (T j_e - T j_i) - U A_i L M D T_i$$
(57)

$$\frac{d(Tj_i)}{dt} = \frac{Fj_i}{Vj_i} (Tj_e - Tj_i) - \left(\frac{UA_i}{\rho_j Cp_j Vj_i}\right) LMDT_i$$
(58)

Conforme CARVALHO (1996), as variáveis e parâmetros podem ser classificados como:

- Variáveis de estado: definem o estado do processo;
 Concentração de glicose (S), etanol (P) e células (X)
- Variáveis operacionais: variáveis cujos valores podem ser alterados pelo operador do processo;
 F_{MF}, *S_{MF}*
- Variáveis intermediárias: todas as taxas que podem ser expressas como uma função das variáveis operacionais e as variáveis de estado;
- Parâmetros cinéticos: μ_{max} , K_s , K_I , r, P_{max} , X_{max}
- Parâmetros estequiométricos: *Y_{X/S}*, *Y_{X/P}*, *Y_{P/S}*

2.5.4. Modelos de Crescimento Microbiano

A equação mais amplamente usada para descrever a velocidade especifica de crescimento como uma função do substrato é atribuída a MONOD (1949).

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \tag{59}$$

Onde: μ é a velocidade especifica de crescimento;

 μ_{max} é a velocidade específica máxima de crescimento;

 K_s é definida como a constante de Monod;

S é a concentração de substrato limitante.

Diferentes modelos que representam o comportamento da fermentação alcoólica estão disponíveis na literatura. A seguir alguns deles são apresentados:

ANDREWS (1968) apud (DOURADO *et al.*, 1987) apresentou modelos cinéticos para a fermentação alcoólica, que levam em consideração a inibição pelo substrato, apresentados na Eq. (60) e Eq. (61)

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}}$$
(60)

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + \frac{K_{s_s}}{S} + \frac{S}{K_i}}$$
(61)

Na fermentação alcoólica, outros produtos metabólicos acumulam-se no meio fermentativo, e não considerá-los nos cálculos podem gerar falhas na modelagem.

LEVENSPIEL (1980) revisou e descreveu a velocidade específica de crescimento celular contendo o termo de inibição, tanto pelo substrato quanto pela inibição pelo produto. Este modelo pode considerar o termo de inibição pelo produto como linear (n=1) ou parabólico (n=0,5).

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)$$
(62)

GHOSE e TYAGI (1979) apresentaram o modelo cinético para fermentação alcoólica considerando o termo de inibição pelo substrato e pelos os produtos. A Eq.(63) é o modelo descrito:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)$$
(63)

Utilizando o desenvolvimento por GHOSE e TYAGI (1979), TOSETTO (2002) apresentou uma função com um exponencial n, na qual considera-se que o termo de inibição pelo produto pode ser linear, se n =1 ou parabólica se n < 1.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n \tag{64}$$

LEE *et al.* (1983) (apud TOSSETO, 2002) propuseram um modelo que levou em consideração os termos de inibição pela concentração celular e pelo produto, e limitação pelo substrato.

m e *n* são constantes empíricas e X_{max} é a concentração máxima de células no meio.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)^m \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right)^n$$
(65)

ATALA *et al.* (2001) usaram como modelo uma modificação da equação de LEE et al. (1983) adicionando um termo exponencial de inibição por substrato.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)^m \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right)^n X \exp(-K_i S)$$
(66)

HENDLER (2011) desenvolveu um trabalho computacional para o estudo da cinética de fermentação em reator de batelada e batelada alimentada. Esse trabalho descreve adequadamente os diferentes tipos de equações para velocidade específica de crescimento μ para os casos de inibição por substrato, produtos e células. Além disso, o trabalho considera a modelagem para dois substratos diferentes. Na Tabela 1 estão algumas das formulações para a estimativa da velocidade específica de crescimento microbiano.

O trabalho de FERREIRA (2005) estuda a fermentação em batelada alimentada, analisando o efeito da forma de alimentação do reator, da temperatura e da concentração de inóculo em relação ao rendimento, produtividade e a cinética do sistema, encontrando a forma mais adequada para trabalhar com esse tipo de processo. Para descrever μ , é utilizada a Eq. (77), na qual três termos são apresentados: efeito do substrato limitante (Monod), inibição pelo produto, e, por último, o termo de inibição pela concentração celular.

Tabela 1. Formulações para a estimativa da velocidade específica de crescimento microbiano, μ (HENDLER, 2011)

Formulação	Referência	Eq. No
$\mu = \mu_{\max}\left(\frac{S^r}{K_s + S^r}\right)$	HISS (2001)	67
$\mu = \mu_{\max} \left[1 - \exp\left(\frac{-S}{K_I}\right) \right]$	BIROL et al. (2002)	68
$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \exp\left(\frac{-S}{K_I}\right)$	BIROL et al. (2002)	69
$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)$	LEVENSPIEL (1980) citado por BIROL et al. (2002)	70
$\mu = \mu_{\max}\left(\frac{S}{K_s + S}\right) \exp\left(-K_p P\right)$	BIROL et al. (2002)	71
$\mu = \mu_{\max}\left(\frac{S}{K_s + S}\right)\left(\frac{K_P}{P + K_P}\right)$	BIROL et al. (2002)	72

$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \left[1 - \left(\frac{P}{P_{\max}} \right)^r \right]$	LUONG (1985)	73
$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_I}} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)$	GHOSE e TYAGI (1979)	74
$\mu = \mu_{\max}\left(\frac{S}{K_{S}+S}\right)\left(\frac{K_{P}}{P+K_{P}}\right)\left(1-\frac{P}{P_{\max}}\right)$	DOURADO et al. (1987)	75
$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_I}} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^r \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)^q$	FERREIRA (2005)	76

2.6. Redes Neurais Artificias RNA

2.6.1. Sistema Nervoso e Neurônios

Este subitem tem como objetivo apresentar alguns conceitos que estão relacionados com a terminologia usualmente empregada no desenvolvimento e aplicação de redes neurais.

O sistema nervoso humano pode ser visto como um sistema de três partes: receptores, rede neural e atuadores. A parte central desse sistema é o cérebro, que pode ser representado por uma rede neural que continuamente recebe informação, na qual é processada e realiza a toma de decisões. Os receptores convertem os estímulos do corpo ou do ambiente externo em impulsos elétricos que transmitem informação para o cérebro (rede neural). Os atuadores transformam os impulsos elétricos gerados pelo cérebro em respostas adequadas como saídas do sistema.

O neurônio é a estrutura constituinte do cérebro e estima-se que existem aproximadamente 10 bilhões dessas células no córtex humano, e 60 trilhões de sinapses e conexões. Assim, o resultado é uma rede neural altamente eficiente em termos energéticos, pois, usa aproximadamente 10⁻¹⁶ joules por operação por segundo, um valor inferior do processamento do computador, que tem magnitudes maiores.

As sinapses, ou terminações nervosas, são a estrutura elementar e funcional que realiza a conexão entre neurônios. O tipo mais comum é do tipo químico que opera da seguinte forma: o processo pré-sináptico libera uma substância transmissora a qual é difundida através da junção interneural entre neurônios e atua num processo pós-

sináptico. Assim, a sinapse transforma um sinal elétrico prévio em um sinal químico e posteriormente volta a ser um sinal elétrico. Na tradicional descrição da organização neural, assume-se que a sinapse é uma conexão que pode estar em excitação ou inibição, HAYKIN (2008).

Um sistema nervoso desenvolvido é sinônimo de um cérebro plástico. A plasticidade permite ao sistema nervoso adaptar-se a seu entorno. Trata-se, portanto, de uma propriedade que permite o desenvolvimento de alterações estruturais em resposta à experiência, e como adaptação às condições mutantes e à estímulos repetidos. (RADKE, 2002). Da mesma maneira como a plasticidade parece ser essencial para o funcionamento dos neurônios como unidades de processamento de informações no cérebro, também é assim com as redes neurais constituídas por neurônios artificiais. De forma geral, uma rede neural é uma máquina que é projetada para modelar a maneira pela qual o cérebro executa uma determinada tarefa ou função de interesse. A rede geralmente é implementada usando um software.

2.6.2. Propriedade de Redes Neurais

A capacidade computacional da rede neural origina-se através de duas caraterísticas principais: a estrutura distribuída, massiva e paralela; e a sua capacidade de generalizar. Essa última caraterística refere-se à produção de resultados razoáveis a partir dos dados de entrada o durante o treinamento. Esses dois recursos de processamento permitem à rede neural encontrar soluções aproximadas adequadas para problemas intratáveis de grande escala. No entanto, as redes neurais, na prática, precisam realizar uma integração sólida em uma abordagem consistente de engenharia de sistemas. Especificamente, um complexo problema pode ser dividido em tarefas relativamente simples, nas quais as redes neurais recebem um subconjunto de tarefas que combinam suas capacidades inerentes, (HAYKIN, 2008)

Segundo (HAYKIN, 2008) as redes neurais oferecem as seguintes propriedades e recursos úteis

Não-linearidade: Um neurônio artificial poder ser linear ou não linear, dando essa característica à rede neural artificial. Adicionalmente, esta não-linearidade é do tipo que pode estar distribuída em toda a rede. Essa característica é importante se o sistema que gera o sinal de entrada é intrinsecamente não lineal, por exemplo um "sinal de voz".

Mapeamento de entrada-saída: A aprendizagem supervisionada, envolve a modificação dos pesos sinápticos de uma rede neural, aplicando uma série de conjunto de exemplos de treinamento, no qual cada exemplo consiste num sinal de entrada exclusivo e uma correspondente resposta desejada. Assim, a rede aprende dos exemplos construindo um mapeamento de entrada-saída para o problema em questão.

Adaptividade: As redes neurais possuem uma capacidade integrada para adaptar seus pesos sinápticos a mudanças no ambiente circundante. Em particular, uma rede neural treinada para operar em um ambiente específico pode ser facilmente retreinada para lidar com pequenas mudanças nas condições ambientais operacionais. Além disso, quando está operando em um ambiente dinâmico, uma rede neural pode ser projetada para mudar seus pesos sinápticos em tempo real.

Resposta evidencial: As redes neurais podem ser projetadas para fornecer informações não apenas sobre qual padrão específico selecionado, senão também sobre a confiança na decisão tomada. Essa característica pode ser utilizada para eliminar padrões ambíguos e assim melhorar o desempenho da rede.

Informações contextuais: O conhecimento é representado pela própria estrutura e estado de ativação de uma rede neural. Todo neurônio da rede é potencialmente afetado pela atividade global de todos os outros neurônios da rede. Consequentemente, a informação contextual é tratada naturalmente por uma rede neural.

Tolerância a falhas. Uma rede neural, tem potencial para ser inerentemente tolerante a falhas, pois, devido a sua natureza distribuída das informações armazenadas na rede, eventuais danos nos neurônios que a compõem, não gerariam uma resposta degradada.

Implementabilidade do *very-large-scale-integrated*, (VLSI): A natureza massivamente paralela de uma rede neural torna potencialmente rápida a computação de certas tarefas. Essa mesma característica torna uma rede neural adequada para a implementação usando tecnologia VLSI, a qual é, o atual nível de miniaturização dos microchips de computador.

Uniformidade de análise e *design*: As redes neurais desfrutam da universalidade como processadores de informação. Essa característica se manifesta de maneiras diferentes, a primeira, o neurônio é o elemento comum a todas as redes neurais, a segunda

as redes neurais por ser construídas pelo mesmo elemento podem compartilhar teorias e algoritmos de aprendizagem, e, por último, as redes podem ser construídas através de uma integração perfeita de módulos.

Analogia neurobiológica. O design de uma rede neural é motivado por analogia com o cérebro conformado por neurônios que recebe informações, que podem vir de sensores ou outros neurônios e realizar operações relativamente simples, e finalmente passar o resultado para outros neurônios vizinhos. Essa característica é utilizada por pesquisadores para interpretar os fenômenos neurobiológicos e também para resolver problemas complexos.

2.6.3. Modelo Matemático de um Neurônio

O neurônio é uma unidade de processamento de informação que é fundamental na operação da rede neural. A Figura 3 representa o esquema de um neurônio, na qual podem ser identificados três elementos básicos:

- Conjunto de sinapses, ou *links* de conexão, cada um deles caracterizado por um peso próprio ou força própria. Um sinal x_i na entrada da sinapse j do neurônio k é multiplicado pelo peso sináptico W_{kf}.
- 2. Um somador para adicionar os sinais de entrada, multiplicado pelo seu respectivo peso da sinapse; a operação descrita é um combinador linear.
- Uma função de ativação para limitar a amplitude da saída do neurônio. Geralmente, o alcance de amplitude normalizado está escrito no intervalo de [0,1] ou, alternativamente [-1,1].

Adicionalmente, no modelo neural também inclui um "*bias*" indicado como *b*. O "*bias*" tem como função de aumentar ou diminuir as entradas da rede neural na função de ativação, dependendo se for positivo ou negativo.

Em termos matemáticos a equação (77) pode descrever o neurônio *k* descrito na Figura 3.

$$y_{k} = f(U_{k}) = f(\sum_{j=1}^{m} w_{kj} x_{j} + b_{k})$$
(77)



Figura 3. Esquema de um Neurônio como constituinte de uma Rede Neural Artificial

Pode-se simplificar a notação acima, de forma a incluir as *bias* simplesmente definindo um sinal de entrada de valor $x_0 = 1$, com peso associado $w_{k0} = b_k$, equação (78:

$$y_{k} = f(u_{k}) = f(\sum_{j=0}^{m} w_{kj} x_{j}) = f(w^{t} x)$$
(78)

Tipos de Funções de Ativação

As funções de ativação, denotadas por y, definem a saída do neurônio em termos do valor de entrada U_k . As funções de ativação usadas são: a função logística, mostrada na Figura 4 e na equação (79); e a função tangente hiperbólica, mostrada na Figura 5 e na equação (80).

$$y = f(u_k) = \frac{e^{pu_k}}{e^{pu_k} + 1} = \frac{1}{1 + e^{-pu_k}}$$
(79)

$$y = f(pu_k) = \tan(pu_k) = \frac{e^{pu_k} - e^{-pu_k}}{e^{pu_k} + e^{-pu_k}}$$
(80)



Figura 4. Função Logística



Figura 5. Função Tangente hiperbólica



Figura 6.Rede Neural com diferentes tipos de Camadas

Os neurônios estão organizados em formas de camadas e utilizam interconexões entre elas para formar uma rede (

Figura 6). Esta organização é feita de acordo com os seguintes critérios (VON ZUBEM et al., 2010):

- Número de camadas: As redes neurais podem estar constituídas por uma ou mais camadas, dividas em camada de entrada, camada intermediária ou oculta, e camada de saída. Na estrutura das redes neurais é comum ter uma ou mais camadas intermediárias, chamadas camadas ocultas;
- Número de neurônios em cada camada: a quantidade de neurônio varia segundo o tipo de camada;
- Tipos de conexões: conexão para frente, para trás, ou na direção lateral. O tipo de conexão depende do tipo de rede e suas propriedades dinâmicas;
- Grau de conectividade.

A principal propriedade das redes neurais radica na sua capacidade para ajustar o valor dos pesos e as polarizações para que a resposta às mesmas entradas seja diferente. Isto dá a capacidade de associar um conjunto de padrões de entrada de início, quando estes são apresentados sequencialmente. Este processo é chamado de aprendizagem. No caso de um processo industrial, se os padrões correspondem às entradas e saídas da planta, a rede neural artificial pode realizar aprendizagem de forma *offline*, se a rede neural artificial recebe os valores das variáveis de entrada faz a aprendizagem, e no processamento, gera as saídas. Este tipo de aprendizagem é chamado *online*. (NEVOT, 1999).

Posteriormente, quando a aprendizagem estiver concluída, a rede neural pode predizer uma saída a partir de um dado de entrada, sem a necessidade de ter a informação real da planta. Este tipo de recurso é chamado "identificação". No entanto, a rede neural artificial deve ser capaz de predizer uma saída a partir de qualquer entrada, mesmo quando não foi apresentada na fase de aprendizagem. Essa capacidade da rede é denominada generalização (NEVOT, 1999).

2.6.4. Redes Neurais Artificiais do tipo MLP

As redes *feedforward* do tipo MLP, do inglês *Multilayer Perceptron*, consistem tipicamente em muitos elementos computacionais simples, chamados de nós, nodos ou neurônios, agrupados em diversas camadas: camada de entrada, camada(s) interna(s); e a camada de saída

Todos os neurônios das redes neurais de tipo MLP estão conectados às camadas adjacentes, não havendo, conexões entre os nós de uma mesma camada. Os pesos que definem a força de conexão entre os neurónio são estimados para que a rede apresente um bom desempenho (RIVERA *et al.*, 2007). A estrutura de uma rede MLP é mostrada na Figura 7.



Figura 7. Estrutura de uma rede neural MLP totalmente conectada com uma camada inicial, uma camada oculta e uma camada de saída (HAYKIN, 2008).

A associação matemática entre as entradas, que corresponderiam às saídas dos elementos da camada anterior e a saída de um neurônio genérico, é dada pelas equações (81) e (82):

$$S_i^{(k)} = \sum_{j=1}^{k-1} W_{ij}^{(K)} y_j^{(k-1)} + \theta^{(k)}$$
(81)

$$y_{i}^{((k))} = f(z_{i}^{(k)})$$
 (82)

Nas quais, $w_{ij}(k)$ é o peso de conexão entre os nós, $y_j(k-1)$ é a saída do nó *j* da camada anterior, $\Theta_i(k)$ é o *bias*, *K* é a camada da rede neural e f(.) é chamada de função ativação do nó.

A camada de entrada somente distribui o sinal para a camada interna adjacente. As equações (81) e (82) acima são válidas para os neurônio nas camadas internas ou de saída.

No treinamento da rede neural são apresentadas línhas de informação, que representam dados de entrada e dados de saída do processo estudado, e com base nestes dados, a rede desenvolve uma relação que corresponde ao modelo de caixa preta do

processo. Este modelo prediz as saídas correspondentes aos novos dados de entrada, pela capacidade de generalização das redes neurais.

O desenvolvimento do modelo do processo é feito através do ajuste dos parâmetros internos da rede (pesos e bias) usando como função objetivo a minimização do erro quadrado entre as saídas da rede e as saídas desejadas. Um dos métodos mais comumente usados é o algoritmo de retro-propagação (*backpropagation*) dos erros, que é essencialmente um método de gradiente descendente de primeira ordem. No treinamento da rede neural, deve-se também escolher o tipo de função de ativação dos neurônios; determinar o número de camadas e de neurônios em cada uma delas.

Treinamento da Rede Neural

O processo de treinamento consiste em ajustar e refinar os valores, tanto dos pesos quanto das *bias*. A função de desempenho padrão para redes neurais do tipo *feedforward* é o erro quadrático médio MSE (*mean square error*) entre os dados de entrada e os objetivos, definido de acordo com a equação (83).

$$f = mse = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{n} (e_i)^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{n} (t_i - a_i)^2$$
(83)

No treinamento da rede neural pode-se usar qualquer método numérico de otimização na função de desempenho padrão, mas nem todos os métodos apresentam um bom comportamento no treinamento. Um método de otimização bastante utilizado é aquele que faz uso do gradiente da função, representada em relação aos pesos dela ou o jacobiano, dos erros da rede em relação aos pesos.

O gradiente e o jacobiano são calculados usando uma técnica chamada de algoritmo de retro-propagação (*backpropagation algorithm*), o qual implica realizar cálculos no sentido contrário por meio da rede.

Algoritmo de Backpropagation

O *backpropagation* é um algoritmo de aprendizagem supervisionado usado para treinar as redes neurais o qual é realizado em duas fases.

Na primeira fase, um padrão inicial é utilizado como estímulo. Este é apresentado à camada de entrada fazendo que os neurônios processem tal informação propagando-se pela primeira camada percorrendo as camadas seguintes até gerar uma saída. A segunda fase começa com a medição do erro observado, entre o sinal de saída com a saída deseja, obtendo-se um erro calculado para cada uma das respostas. Assim, os sinais dos erros são propagados para o início da rede, partindo da camada de saída. Nesse processo, o sinal do erro é distribuído em cada um dos neurônios recebendo assim só uma porção do sinal total do erro relativo à sua contribuição total. Assim, os pesos das conexões entre as camadas são ajustados de tal modo que a diferença entre as saídas geradas e almejadas é minimizada. Finalmente, o treinamento é interrompido quando um erro suficientemente baixo ou um número máximo de ciclos são atingidos, ou quando se está gerando uma diminuição na capacidade de generalização (RADKE, 2002).

Treinamento do Algoritmo

O processo de treinamento supervisionado de redes neurais multicamadas é equivalente a um problema de otimização não-linear irrestrito, onde uma função de erro é minimizada a partir do ajuste de parâmetros da rede neural. O algoritmo atualiza os pesos e as *bias* da rede neural, na direção que o comportamento decresce mais rapidamente, o negativo do gradiente. Uma iteração deste algoritmo está descrita na Eq. (84).

$$x_{k+1} = x_k - \alpha_k g_k \tag{84}$$

Na qual, o x_k é o vetor atual dos pesos e as *bias*, g_k é o gradiente atual e α_k é a taxa de aprendizagem. Essa equação sofre iterações até a rede convergir.

Os métodos que estão disponíveis no Neural Network Toolbox do Matlab Software são: Levenberg-Marquat; Bayesian regularização; BFGS Quase Newton; Relisent Backpropagation; Scaled Conjugate Gradient; Conjugate Gradient with Powell/Beale Restard; Flercher-Powell conjugate Gradient Descent; Gradient Descent With Momentum; e Gradient Descent. A escolha do método mais adequado deve estar baseada em algumas caraterísticas como a velocidade de convergência na fase de treinamento, e a generalização adquirida pela rede ao final do processo.

Segundo PEREIRA (2001), o treinamento mais rápido é realizado por *Levenberg-Marquat*, no entanto, o *Método de Quase Newton* é também um dos que apresenta melhores resultados, em termos de rapidez na convergência e no ajuste de parâmetros das redes.

.....

2.6.5. Controle por meio de Redes Neurais

Os métodos convencionais para a modelagem e o controle dinâmico do processo são realizados a partir do modelo matemático fenomenológico do sistema, como consequência obtêm-se um sistema com múltiplas equações e alta complexidade. Por uma questão de praticidade quando é realizado a modelagem algumas das suposições são realizadas que podem trazer resultados pobres no sistema de controle do processo. Uma ótima solução para esse problema são as *Learning Machines*, como as redes neurais as que oferecem uma alternativa rápida e melhor pela sua inerente não-linearidade, ser multivariáveis e aprender só com informações de entrada-saída do sistema.

A aplicação de RNA em controle de processos tem-se mostrado recentemente mais difundida na área da engenharia química (CHEN *et al.*, 2011; PENG *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2011; HOSEN *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2012; HAN *et al.*, 2012; PAENGJUNTUEK *et al.*, 2012; PAZ SUÁREZ *et al.*, 2011), devido ao fato de que os modelos baseados em RNA permitem levar em consideração as não linearidades de uma maneira adequada, bem como as interações entre as variáveis do processo.

Alguns autores realizaram classificações das redes neurais como aplicações em controle de processos. ENDER (2002) classificou a aplicação das redes neurais como método direto e método indireto. No método direto, uma rede neural é utilizada como um sistema de identificação do processo, pois, é treinada com dados do sistema para representar dinâmicas futuras. Posteriormente, a rede neural é utilizada como modelo interno dentro do controlador de tipo MPC (*model predictive control*), assim, ao conhecer o estado do processo atual e a ação de controle atual, a rede aprende a predizer os estados futuros para que o controlador otimize os parâmetros, encontre o valor da variável controlada e realize a ação de controle.

No método indireto, a rede neural é treinada com dados de entrada/saída do sistema de forma que consiga representar a dinâmica inversa deste processo. A rede neural é treinada para produzir uma ação de controle que conduza o sistema para o *set-point*. O modelo inverso resultante poderá ser usado como controlador em uma estrutura *feedforward* típica.

Segundo NEVOT (1999), as aplicações das redes neurais podem ser definidos em cinco estruturas:

- Controle Supervisado: a rede neural aprende a partir de um conjunto de informações de entradas e saídas do processo realizando uma identificação do sistema.
- 2. Controle Inverso: uma rede neural aprende a partir de um conjunto de informações de entradas e saídas do processo, porém a configuração da rede neural tem como entradas as saídas do processo representado e na saída os *inputs* do processo. A rede neural invertida elimina o algoritmo de otimização do sistema de controle do processo, que está represente no controle supervisionado.
- Controle Adaptativo: este consiste na substituição de modelos dentro de um esquema clássico de controle adaptativo por uma rede neural.
- 4. Retro-programação de Utilidade: Permite otimizar a função de utilidade ou custo.
- 5. Crítico Adaptativo: Como o sistema anterior, é usado para otimizar a função custo, mas sem necessidade de um modelo da planta, ou pelo menos sem precisar de um modelo determinístico. O controle crítico adaptativo consiste em outra rede, e é responsável por avaliar a rede principal, para que possa adaptar seus pesos.

2.7. Soft Sensor

Os *soft-sensors* são instrumentos de medição, que fornecem medidas precisas das variáveis de difícil obtenção, os quais usam informação do próprio processo e medidas disponíveis para melhorar as medições das variáveis. O termo combina as palavras *software* pelo fato de que os modelos de avaliação estão implementados em computadores, e *sensor*, porque os modelos fornecem informação similar aos sensores físicos. O *soft-sensor* pode realizar várias medições e processá-las em conjunto. A interação dos sinais de instrumentos *online* pode ser utilizada para calcular ou estimar novas quantidades, que não podem ser medidas em tempo real.

No entanto, o *soft-sensor* também pode ser definido como a associação de um sensor (um *hardware*), que realiza medições do processo, com um algoritmo de estimativa (um *software*) o qual recebe o sinal do sensor e realiza estimativas *online* de uma ou mais variáveis de difícil medição. Adicionalmente, esses instrumentos ser utilizados para estimar parâmetros de modelos, ou mesmo para a medição de atrasos ou serem empregados como ferramentas para superar estes atrasos no envio das informações sobre o processo (BASTIN *et al.*, 1990; GONZAGA *et al.*, 2009).

2.7.1. Medições Online na Fermentação

Medições *online*, tais como temperatura, turbidez, pH e o fluxo de CO₂ são realizadas para monitor o processo. Essas variáveis estão relacionadas com a concentração do substrato e produtos no processo.

Temperatura

A temperatura, como uma variável de processo, é importante no estudo da otimização da produtividade e crescimento microbiano no processo de fermentação. O controle preciso da temperatura e avaliação dos perfis são fatores fundamentais para promover o crescimento de células e formação de produtos (VOGEL *et al.*, 1997). As taxas de crescimento celular, o consumo de açúcar e inibição causada pelo produto e substrato são afetadas pela temperatura (CARVALHO, 1996). No estudo de ANDRADE (2007), a importância desta variável é salientada, sendo que o crescimento microbiano e as velocidades da reação enzimática são maiores com o aumento da temperatura até certo ponto. Além disso, os efeitos tóxicos do etanol aumentam com o incremento da temperatura devido à maior fluidez da membrana celular. Portanto, a avaliação do efeito dessa variável é necessária para este processo, uma vez que influencia diretamente o desempenho e a produtividade.

pН

Os processos metabólicos são tipicamente muito sensíveis, mesmo com ligeiras variações de pH. Portanto, o controle apropriado deste parâmetro é importante. As fermentações são realizadas em uma ampla faixa de valores de pH, especificamente, valores entre 4 e 5 são adequados para este processo. Normalmente, os valores de pH no meio de fermentação industrial estão na faixa de 4,5 e 5,5 com uma boa capacidade de tamponamento, especialmente as preparadas com o melaço. As fermentações realizadas em meios mais ácidos, cerca de 3,5 e 4,5, resultam em rendimentos mais elevados de etanol devido a uma restrição no crescimento de leveduras, bem como uma diminuição da produção de glicerol, e ao mesmo tempo, a contaminação bacteriana é reduzida. No entanto, as fermentações são realizadas em níveis bem superiores, em substratos de elevada capacidade de tamponamento, como os melaços com pH de 5,8 / 5,9. O caldo de cana é fermentado, sem correção da acidez; eles são realizados em pH natural que varia entre 5,2 e 6,8. Tendo em conta estes fatores, a tolerância à acidez é uma característica importante para a levedura (BASSO *et al.*, 2001). Um efeito negativo na produção de

etanol e na produtividade é apresentada quando os valores estão abaixo de 3,5. Um pH baixo faz com que a perda de nutrientes, como nitrogênio e potássio, aumenta a sensibilidade da levedura ao etanol, ácidos orgânicos e SO₂ (SILVERIO, 2009).

Manipulação precisa de pH pode determinar o rendimento relativo das espécies desejadas na competição com subprodutos (VOGEL *et al.*, 1997). Ao longo da fermentação, a levedura na sua rota metabólica da produção de etanol também produz ácidos que diminuem o pH. Muitos estudos sobre a influência do pH na fermentação pode ser encontrada na literatura (NIELSEN *et al.*, 2007; AKIN *et al.*, 2008; ARROYO-LOPEZ *et al.*, 2009).

Vazão de CO₂

Muito pode ser aprendido com os gases produzidos no processo metabólico, como O₂, CO₂, N₂, e NH₃. Portanto, a maior parte da análise preditiva é baseada em tais cálculos como a taxa de consumo de oxigênio, a taxa de produção de dióxido de carbono ou quociente respiratório (VOGEL *et al.*, 1997).

Na glicólise, a glucose é convertida em piruvato por meio de uma série de reações, e a energia é extraída sob a forma de quatro moléculas de ATP. Em seguida, o piruvato é convertido em etanol em uma reação de dois passos; piruvato é descarboxilado para formar o acetaldeído mais reativo, o qual é reduzido para o etanol. Para cada glucose fermentada, duas moléculas de etanol e duas moléculas de CO₂ são produzidas, (NELSON *et al.*, 2005). A partir desta informação, pode-se concluir que o CO₂ e etanol são produzidos de forma proporcional, e é possível obter informação de um deles ao monitorar o outro. Produção de CO₂ na fermentação pode ser dividida em três fases. Na fase preliminar acontece a multiplicação celular, um pequeno aumento de temperatura e pequena liberação de CO₂. Na segunda etapa, a liberação de CO₂ ocorre de forma intensa devido ao grande número de células, no meio as quais transformam o açúcar fermentescível em etanol; a segunda etapa é a etapa de duração mais longa. Nessa etapa, a temperatura aumenta rapidamente, a densidade é reduzida, a concentração de etanol aumenta e aumenta a acidez. Na etapa complementar, um decréscimo na intensidade de liberação de CO₂ é observado até a finalização da fermentação (BASSO *et al.*, 2001).

2.7.2. Aplicações do Soft-sensor

Os *Soft-sensors* são geralmente usados quando os sensores tradicionais apresentam uma performance ruim ou quando existe uma impossibilidade do seu uso.

As principais aplicações do uso de *soft-sensors* em processos biotecnológicos é avaliar a qualidade do produto final. Na indústria da fermentação alcoólica o monitoramento da concentração de células, produtos é essencial, porém não existe um sensor para fazer essas medições em tempo real, portanto não sendo completamente satisfatória. Além disso, os instrumentos analíticos são utilizados mas são difíceis de serem calibrados, principalmente devido às características dos meios de cultura industriais, tais como a turbidez da cultura, a presença de CO₂ dissolvido, entre outros (MACEDO, 2003; OSORIO *et al.*, 2008). Adicionalmente, o custo de instalação e a manutenção destes sistemas de monitoramento à esta dificuldade, em ambientes industriais.

Atualmente, o *soft-sensor* é a alternativa preferencial no monitoramento e controle do estado das variáveis em processos biotecnológicos (SOONS *et al.*, 2008; SRIVASTAVA *et al.*, 2011; HOCALAR *et al.*, 2011). Esta abordagem é uma área promissora de pesquisa, com impacto significativo na operação industrial, que pode conduzir aplicações industriais, visto que eles fornecem uma maneira para aumentar a malha de controle (KANO *et al.*, 2008; GONZAGA *et al.*, 2009; KADLEC *et al.*, 2008).

. Trabalhos utilizando os modelos nebulosos (*fuzzy*), e principalmente as redes neurais, tem dominado na literatura na área de projetos e execução de *soft-sensors* aplicados para a modelagem, monitoramento e controle de processos biotecnológicos. Referências sobre *soft-sensors* para serem usados em problemas biotecnológicos complexos são apresentadas por YU *et al.* (2008), LEE *et al.* (2008), GEETHALAKSHMI *et al.* (2012), HUANG *et al.* (2011), GUEGUIM KANA *et al.* (2012), PENG *et al.* (2013), DRAGOI *et al.* (2013), NIKZAD *et al.* (2013), AHMADIAN-MOGHADAM *et al.* (2013), entre outros. As redes neurais procuram combinar eficientemente todos os conhecimentos disponíveis para a validação de estratégias *online*, que possibilita que o processo opere próximo de suas condições ótimas (RIVERA et al., 2010). Além disso, estas podem ser usadas para oferecer soluções de adaptação, já que a estimação de seus parâmetros é um procedimento direto de ajuste (RIVERA et al., 2007).

2.8. Controle da Fermentação

O controle da fermentação alcoólica é importante para a indústria devido às características do bioprocesso como as possíveis inibições por substrato e produtos,
afetado negativamente no rendimento e produtividade do processo. Os sistemas de controle avançado na indústria de produção de etanol no Brasil ainda não estão completamente desenvolvidos quando comparados com outras indústrias, sendo necessária o estudo e implementação destes. Nessa indústria um claro exemplo de trabalho em condições adversas é o caso das safras de cana-de-açúcar, coletadas há muitos dias, secas, sujas com terra e com possíveis agentes contaminantes como microrganismos que podem afetar a qualidade do mosto, com consequência no desempenho do processo de fermentação. Assim, o tipo e a qualidade da cana-de-açúcar, do tempo de colheita e do teor de sacarose estão entre os fatores que podem interferir no processo de fermentação. Essa interferência pode ser compensada com ajustes em condições de operação e controle de processo.

A robustez do processo define-se como a capacidade biológica das leveduras para realizar o processo normalmente, por meio de ótimas condições na concentração dos nutrientes e de alguns desinfetantes (BASSO *et al.*, 2001). Entre as características atuais que precisam ser melhoradas para aumentar o desempenho do processo está relacionado à robutez da fermentação alcoólica quando ocorrem flutuações de qualidade na matériaprima, o que permite a mudança no comportamento cinético que influencia o rendimento, produtividade e conversão de substrato no produto final. Por tanto, a monitoração e o controle eficiente do processo de fermentação alcoólica são importante para manter o processo operando nas condições ideais e evitar a influência de perturbações e de alterações no metabolismo dos microrganismos. Como na maioria dos processos biotecnológicos, as variáveis importantes na fermentação alcoólica são principalmente concentrações de substrato, produtos e células. Sabe-se que medidas de concentração em tempo real costumam ser caras e introduzir atrasos significativos no andamento do processo, além do alto custo e relativa falta de robustez dos equipamentos de medição em ambientes industriais (ARAUZO BRAVO *et al.*, 2004).

Considerando o anterior, os sistemas de controle preditivo são adequados para operar, otimizar, manter a planta industrial nos valores estabelecidos ou utilizados na indústria, e minimizar os problemas relacionados com as perturbações. Também deve ser considerada a complexidade associada à cinética de fermentação, não linearidades e outras características desde tipo de processo que dificulta o controle. Devido à estas características, é importante escolher uma ferramenta computacional que consiga ajustar e modelar o sistema não linear. Entre as várias formas para se atingir o objetivo da implementação de sistemas de controle eficientes nas usinas, o controle preditivo baseado em modelo (MPC) é uma opção adequada, pois é uma das ferramentas mais importantes dentre as técnicas de controle avançado para problemas de multivariáveis, e uma das estratégias de controle mais difundidas na indústria química desde o início dos anos 2000 (Seborg et al.,2004). Alguns exemplos dessa aplicação estão na literatura, como LEE *et al.* (2001), HERRERA *et al.* (2016).

No entanto, um dos desafios no controle e otimização de processos biotecnológicos é a falta de sensores capazes de medir as variáveis importantes do processo de maneira confiável, em tempo real e com baixos custos. Uma solução para este problema é o uso de *soft-sensors*, conforme descrito por (RADKE, 2002; PENG *et al.*, 2012). Assim, a junção de O controle preditivo baseado em modelo (MPC) e o *soft-sensors* podem ser a melhor estratégia para tanto para a rejeição de perturbações (problema regulatório) como para mudanças na referência na saída (problema servo).

Alguns trabalhos prévios relacionadas, como PEREIRA (2001) que desenvolveu um modelo para um processo extrativo de produção de álcool de uma maneira simples e rápida para fins de otimização e estudos de controle. Adicionalmente RADKE (2002) desenvolveu modelos, de forma simples e rápida, capazes de descrever as características mais representativas do processo de fermentação alcoólica. Esses são usados para otimização, controle o como *soft-sensor*. Os modelos foram construídos por meio das equações de balanço de massa do processo com redes neurais, que descrevem a cinética desconhecida.

Referências Bibliográficas

AHMADIAN-MOGHADAM, H., ELEGADO, F. B. AND NAYVE, R. Prediction of Ethanol Concentration in Biofuel Production Using Artificial Neural Networks. *American Journal of Modeling and Optimization*. Science and Education Publishing, 1(3), pp. 31–35, 2013.

AKIN, H., BRANDAM, C., MEYER, X.-M. AND STREHAIANO, P. A model for pH determination during alcoholic fermentation of a grape must by Saccharomyces cerevisiae. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. Elsevier, 47(11), 1986–1993, 2008.

ANDRADE, R. R. *Procedimento para o desenvolvimento de um modelo matematico robusto para o processo de fermentação alcoólica*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidad Estadual de Campinas, 2007. Dissertação (Mestrado).

ARAUJO, T. G. *Estudo Fenomenologico do Reator Batelada Utilizando Dois Processos Fermentativos*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidad Estadual de Campinas, 2004. Dissertação (Mestrado).

ARAÚZO-BRAVO, M. J., CANO-IZQUIERDO, J. M., GÓMEZ-SÁNCHEZ, E., LÓPEZ-NIETO, M. J., DIMITRIADIS, Y. A. AND LÓPEZ-CORONADO, J. Automatization of a penicillin production process with soft sensors and an adaptive controller based on neuro fuzzy systems, *Control Engineering Practice*, 12(9), 1073–1090, 2004.

ARROYO-LÓPEZ, F. N., ORLIĆ, S., QUEROL, A. AND BARRIO, E. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of Saccharomyces cerevisiae, S. kudriavzevii and their interspecific hybrid. *International Journal of Food Microbiology*, 131(2–3), 120–127. 2009.

ATALA, D. I. P., COSTA, A. C., MACIEL, R. AND MAUGERI, F. Kinetics of Ethanol Fermentation with High Biomass Concentration Considering the Effect of Temperature. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Springer-Verlag, 91–93(1–9), pp. 353–366, 2001.

BASSO, L. C., LIMA, U. A. Biotecnologia Industrial -Vol 3 :Processos Fermentativos e Enzimáticos. *Editora Edgar Bluger LTDA*.São Paulo **3**: 82. 2001.

BASTIN, G., D. DOCHAIN. On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors. Elsevier Science. 1990.

BIROL, G. ÜNDEY, C. ÇINAR, A. A modular simulation package for fed-batch fermentation: penicillin production. *Computers & Chemical Engineering*, v. 26, n. 11, p. 1553-1565, 2002.

CARVALHO, B. S. *Efeito da temperatura na cinética de morte celular e em fermentação alcoólica contínua com reciclo de células*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidad Estadual de Campinas, 1996. Dissertação (Mestrado).

CARVALHO, J. C. M., S. SATO, et al.. Biotecnologia Industrial - Volume 2: Engenharia Quimica. *Editora Edgar Bluger LTDA*. *São Paulo*. 193-199. 2001.

CAVALERI, D., MCGOVERN, P. Evidence for S. cerevisiae inancient wine. *Journal of Molecular Evolution* 57: S226–S232, 2003.

CHEN, Z.-B., NIE, S.-K., REN, N.-Q., CHEN, Z.-Q., WANG, H.-C. AND CUI, M.-H. Improving the efficiencies of simultaneous organic substance and nitrogen removal in a multi-stage loop membrane bioreactor-based PWWTP using an on-line Knowledge-Based Expert System. *Water Research* **45**(16), 5266-5278. 2011

DOURADO, A., GOMA, G., ALBUQUERQUE, U., SEVELY, Y. Modeling and static optimization of the ethanol production in a cascade reactor. I. *Modeling. Biotechnology and Bioengineering*, v. 29, n. 2, p. 187-194, 1987.

DRAGOI, E.-N., CURTEANU, S., GALACTION, A.-I. AND CASCAVAL, D. Optimization methodology based on neural networks and self-adaptive differential

evolution algorithm applied to an aerobic fermentation process. *Applied Soft Computing* **13**(1): 222-238. 2013.

ENDER, L. *Redes Neurais Aplicadas em Estrategias de Controle Não Linear*. Tese de Doutorado Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidad Estadual de Campinas, 2002. Tese de Doutorado.

FERREIRA, E. Contribuição para o estudo da otimização da fermentação alcoólica operando em batelada-alimentada. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidad Estadual de Campinas, 2005. Dissertação (Mestrado).

FOGLER, H. S. Elements of Chemical Reaction Engineering. *Prentice Hall* 4 edição. 2006.

GEETHALAKSHMI, S., NARENDRAN, S., PAPPA, N. AND RAMALINGAM, S. Development of a hybrid neural network model to predict feeding method in fed-batch cultivation for enhanced recombinant streptokinase productivity in Escherichia coli. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **87**(2): 280-285. 2012.

GOMEZ, S. M. R. *Pre-Tratamento e Hidrolise Enzimatica do Bagaço de Cana de Açucar*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidad Estadual de Campinas, 2010. Dissertação (Mestrado).

GONZAGA, J. C. B., MELEIRO, L. A., KIANG, C., MACIEL FILHO, R. ANN-based soft-sensor for real-time process monitoring and control of an industrial polymerization process. *Computers & Chemical Engineerin* **33**(1): 43-49. 2009.

GHOSE, T. K., TYAGI, R. D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. I. Batch versus continuous systems. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 21, n. 8, p. 1387-1400, 1979.

GUEGUIM KANA, E. B., OLOKE, J. K., LATEEF, A. AND ADESIYAN, M. O. Modeling and optimization of biogas production on saw dust and other co-substrates using Artificial Neural network and Genetic Algorithm. *Renewable Energy* **46**(0): 276-281. 2012.

HAGHIGHI MOOD, S., HOSSEIN GOLFESHAN, A., TABATABAEI, M., SALEHI JOUZANI, G., NAJAFI, G. H., GHOLAMI, M. AND ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Pergamon, 27, pp. 77–93., 2013.

HAN, H.-G., QIAO, J.-F., CHEN, Q.-L. Model predictive control of dissolved oxygen concentration based on a self-organizing RBF neural network. *Control Engineering Practice*. **20**(4): 465-476. 2012.

HAYKIN, S. Neural Networks and Learning Machines, Pearson Prentice Hall New Jersey USA 936 pLinks, 2008.

HENDLER, B. Construção de Um Software de Simulação e Ajuste de Curvas Cinéticas Para o Processo de Fermentação em Batelada Alimentada. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidad Estadual de Campinas, 2011. Dissertação (Mestrado).

HERRERA, W. E., CCOPA, E., MACIEL FILHO, R. On-Line Measurements and Modelling Study in Second Generation Ethanol Production from Sugarcane. *Chemical Engineering Transactions*. **37**: 415-419. 2014.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.;LIMA, U. A.;AQUARONE, E. e BORZANI, W. R. (Ed.). Biotecnologia Industrial. São Paulo: Edgard 79 Blücher, v.2, 2001. p.93-122. IBGE. Indicadores IBGE Estatística da Produção Agrícola julho de 2015.

HOCALAR, A., TÜRKER, M., KARAKUZU, C. AND YÜZGEÇ, U. Comparison of different estimation techniques for biomass concentration in large scale yeast fermentation. *ISA Transactions* **50**(2): 303-314. 2011.

HOSEN, M. A., HUSSAIN, M. A. AND MJALLI, F. S. Control of polystyrene batch reactors using neural network based model predictive control (NNMPC): An experimental investigation. *Control Engineering Practice* **19**(5): 454-467. 2011.

HUANG, M., MA, Y., WAN, J., ZHANG, H., WANG, Y., CHEN, Y., YOO, C. AND GUO, W. A hybrid genetic – Neural algorithm for modeling the biodegradation process of DnBP in AAO system. *Bioresource Technology* **102**(19): 8907-8913. 2011.

KADLEC, P., GABRYS, B., STRANDT, S. Data-driven Soft Sensors in the process industry. *Computers & Chemical Engineering*. Pergamon, 33(4). 795–814. 2008

KANO, M., NAKAGAWA, Y. Data-based process monitoring, process control, and quality improvement: Recent developments and applications in steel industry. *Computers & Chemical Engineering* **32**(1–2): 12-24. 2008.

LEE, J. M.; POLLARD, J. F.; COULMAN, G. A. Ethanol fermentation with cell recycling: Computer simulation. Biotechnology and Bioengineering, v. 25, n. 2, p. 497-511, 1983.

LEE, M. W., HONG, S. H., CHOI, H., KIM, J.-H., LEE, D. S., PARK, J. M. Real-time remote monitoring of small-scalled biological wastewater treatment plants by amulitivariate statistical process control and neural network-based software sensors. *Process Biochemistry* **43**: 1107-1113. 2008.

LEVENSPIEL, O. Monod equation: a revised and a generalization to product inhibition situations. Biotechnology and Bioengineering, v. 22, n. 8, p. 1671-1687, 1980.

LI, N., XIA, L., SHIMING, D., XU, X. AND CHAN, M.-Y. Dynamic modeling and control of a direct expansion air conditioning system using artificial neural network. *Applied Energy*. Elsevier, **91**(1): 290-300. 2012.

LUONG, J. H. T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnology* and *Bioengineering*, v. 27, n. 3, p. 280-285, 1985.

MACEDO, I. C. Estado da arte e tendências das tecnologias para Energia. Brasilia: Ministério da Ciência e da Tecnologia. CTEnerg-Secretaria Técnica do fundo Setorial de Energia. CGEE Centro de gestão e estudos estrategicos. 2003.

MONOD, J. The growth of bacterial culture. *Annual Review of Microbiology*, v. 3, p. 371-394, 1949.

NELSON, D. L., COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry, Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch). 2005.

NEVOT, J. Diseño de un Controlador Avanzado Basado en Redes Neuronales para la Gestion de la Mezcla de Aire-Gasolina en un Motor Alternantivo. Cataluña: Universidad Politécnica de Cataluña. 1999. Tese Doutoral.

NIELSEN, M. K., ARNEBORG, N. The effect of citric acid and pH on growth and metabolism of anaerobic Saccharomyces cerevisiae and Zygosaccharomyces bailii cultures. *Food Microbiology*, **24**(1): 101-105. 2007.

NIKZAD, M. E. M., NAJAFPOUR, G., GHOREYSHI, A. L. I. A. Modeling And Optimization Of Ethanol Fermentation Using Saccharomyces Cerevisiae: Response Surface Methodology And Artificial Neural Network. Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly. Vol. 19 Issue 2, p241-252. 12p. 2013.

OSORIO, D., RICARDO PÉREZ-CORREA, J., AGOSIN, E. CABRERA, M. Softsensor for on-line estimation of ethanol concentrations in wine stills. *Journal of Food Engineering* **87**(4): 571-577. 2008.

PAENGJUNTUEK, W., THANASINTHANA, L. AND ARPORNWICHANOP, A. Neural network-based optimal control of a batch crystallizer. *Neurocomputing. Elsevier* **83**(0): 158-164. 2012.

PAZ SUÁREZ, L. A., GEORGIEVA, P. AND FEYO DE AZEVEDO, S. Nonlinear MPC for fed-batch multiple stages sugar crystallization. *Chemical Engineering Research and Design* **89**(6): 753-767. 2011.

PENG, J., Dubay, R. Nonlinear inversion-based control with adaptive neural network compensation for uncertain MIMO systems. *Expert Systems with Applications* **39**(9): 8162-8171. 2012.

PENG, J., MENG, F. AND AI, Y. Time-dependent fermentation control strategies for enhancing synthesis of marine bacteriocin 1701 using artificial neural network and genetic algorithm. *Bioresource Technology* **138**(0): 345-352. 2013.

PENIA KRESNOWATI, M. T. A., X. D. Chen. 2.39 - Continuous Operation. Comprehensive Biotechnology (Second Edition). M.-Y. Editor-in-Chief: Murray. Burlington, Academic Press: 527-535. 2011.

PEREIRA, L. H. Modelagem Hídrido Neuronal Aplicada a Processos Fermentativos." Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidad Estadual de Campinas, 2001. Dissertação (Mestrado).

PESSOA, E. D. S. "Efeito da Temperatura na Cinetica da Fermentação álcoolica Continua com Alta Densidade Celular." Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidad Estadual de Campinas, 1997. Dissertação (Mestrado).

PLAZAS, L. Modelagem e avaliação de diferentes cenários operacionais dos processos de pré-tratamento, hidrólise e fermentação para a produção de etanol 2G. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidad Estadual de Campinas, 2015. Post-Doutorado.

RABELO, S. C. Avaliação e otimização de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açucar para a produção de etanol de segunda geração. Doutora, Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidad Estadual de Campinas, 2010. tese de Doutorado.

RABELO, S. C., AMEZQUITA FONSECA, N. A., ANDRADE, R. R., MACIEL FILHO, R. AND COSTA, A. C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. *Biomass and Bioenergy* **35**(7): 2600-2607. 2011.

RADKE, E. Desenvolvimento de Modelos Híbridos-Neuronais para fermentação Alcoólica e Estudos de técnicas de Otimização do Processo. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidad Estadual de Campinas, 2002. tese de Doutorado.

RIVERA, E. C., ATALA, D. I. P., FILHO, F. M., CARVALHO DA COSTA, A., FILHO, R. M. Development of real-time state estimators for reaction–separation processes: A continuous flash fermentation as a study case. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* **49**(4): 402-409. 2010.

RIVERA, E. C., COSTA, A. C., ANDRADE, R. R., ATALA, D. I. P., MAUGERI, F., MACIEL FILHO, R. Development of adaptive modeling techniques to describe the temperature-dependent kinetics of biotechnological processes. *Biochemical Engineering Journal* **36**(2): 157-166. 2007.

RFA - Renewable Association. World Fuel Ethanol Production. Accesado em 20/02/2018, disponível em:

<http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454099103927-61e598f7-7643>

SAVIOLI, E. (2015). *Cinética, estudo e avaliação do processo de deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico diluído*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidad Estadual de Campinas, 2015. Dissertação (mestrado).

SAWIN, J. L., BHATTACHARYA, S. C., AMIN, A. Z., CLINI, C., ECKHART, M., GIREESH, S., PRADHAN, B., KAPPIAH, M., KOCH, H.-J., KUMAR, E., JUNFENG, L., LOHANI, B., GALÀN, E. M., MUBIRU, P., NASSIEP, K., OULD-DADA, Z., PACHAURI, R., PALZ, W., RADKA, M., SALVADORES, M. S., THOMPSON, G., TOGOLA, I. AND TULEJ, P. (2012). Renewables 2012 Global Status Report. Paris, France, REN21 Renewable Energy pollicy Network for the 21st Century. Disponível em http://www.ren21.net/Portals/0/documents/Resources/GSR2012_lowres_FINAL.pdf. Acceso em Fevereiro 2018).

SCHMIDELL, W., BORZANI, W. Biotecnologia Industrial - Engenharia Bioquímica. São Paulo: Blucher. 2001.

SILVERIO, F. Influencia conjunta do pH, temperatura e concntração de sulfito na fermentação alcoólica de mostos de sacarose. Faculdade de Engenharia Química, 2009. Universidade Federal de Uberlandia.

SOONS, Z. I. T. A., STREEFLAND, M., VAN STRATEN, G. AND VAN BOXTEL, A. J. B. Assessment of near infrared and "software sensor" for biomass monitoring and control. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **94**(2): 166-174. 2008.

SRIVASTAVA, A. K., Gupta, S. 2.38 - Fed-Batch Fermentation – Design Strategies. Comprehensive Biotechnology (Second Edition). M.-Y. Editor-in-Chief: Murray. Burlington, Academic Press: 515-526. 2011.

TOSETTO, G. M. *Influênia da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol.* Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidad Estadual de Campinas, 2002. Dissertação (Mestrado).

VOGEL, H. C., TODARO, C. L. *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook*. United States, Noyes Publications. 1997.

VON ZUBEM, F., ATTUX, R. Redes Neurais. Slides Disciplina de Redes Neurais. 2010.

YU, R.-F., CHEN, H.-W., CHENG, W.-P. AND SHEN, Y.-C. Dinamyc control of disinfection for wastewater reuse applying ORP/pH monitoring and artificial neural networks. *Resources, Conservation and Recycling* **52**: 1015-1021. 2008.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÕES DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA A PARTIR DA MISTURA DE HIDROLISADO COM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

3. AVALIAÇÕES DO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA A PARTIR DA MISTURA DE HIDROLISADO COM MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

3.1. Introdução

Neste trabalho, a avaliação do processo de fermentação alcoólica foi realizada a partir da mistura de hidrolisado enzimático com melaço, apresentando as cinéticas do processo que descreve a variação da concentração de substratos, açúcares e co-produtos. Além disso, os rendimentos, a produtividade e a viabilidade do processo foram analisados. Esse processo foi realizado para avaliar as seguintes fermentações:

Mistura de hidrolisado enzimático (HE), produzido do bagaço de cana-de-açúcar, proveniente da corrente de pré-tratamento com ácido sulfúrico (PA) diluído (HE+PA – 8 % e 3 % m/v) com melaço, Figura 8 A e B;

– Mistura de hidrolisado enzimático, realizado com o mesmo procedimento que o HE+PA, com adição de um processo de deslignificação alcalino (**HE+PA+NaOH** – 8 % e 3 % m/v) com melaço, Figura 8 C e D, junto com os dados das fermentações do hidrolisado decorrente do processo de peróxido de hidrogênio (**HE+PEOX** a 7 % m/v, em base seca) com melaço (dissertação de mestrado de William Eduardo Herrera, processo 2009/13600-0 da Fapesp), Figura 8 E.

No início deste trabalho, as caraterísticas do bagaço de cana-de-açúcar integral, que foi utilizado como matéria prima para a produção dos açúcares lignocelulósicos, foram descritas. Em seguida, o processo de hidrólise enzimática foi apresentado, descrevendo os materiais e reagentes que foram utilizados, a metodologia de trabalho usada e os resultados das hidrólises enzimáticas. Finalmente, no terceiro capítulo, as fermentações dos hidrolisados enzimáticos, enriquecidos com melaço de cana-de-açúcar, foram desenvolvidas. Este capítulo descreve as metodologias usadas durante esse processo, como o pré-inóculo, o inóculo e a fermentações de substratos, células e produtos são detalhados.



Figura 8. Fluxograma das misturas de hidrolisado enzimático com melaço. A. Processo com pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática com 8 % de sólidos. B. Processo com pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática com 3 % de sólidos. C. Processo com pré-tratamento ácido, deslignificação e hidrólise enzimática com 8 % de sólidos. D. Processo com pré-tratamento ácido, deslignificação e hidrólise enzimática com 3 % de sólidos. E. Processo com pré-tratamento ácido de hidrogênio, deslignificação e hidrólise enzimática com 3 % de sólidos. E. Processo com pré-tratamento com peróxido de hidrogênio, deslignificação e hidrólise enzimática com 7 % de sólidos.

No desenvolvimento dos pré-tratamentos e hidrolisados deste trabalho, foram usadas as metodologias e condições de processo, com maior produtividade, do projeto de pós-doutorado de PLAZAS (2015), intitulado como *Modelagem e avaliação de diferentes cenários operacionais dos processos de pré-tratamento, hidrólise e fermentação para a produção de etanol 2G* (FAPESP N° 2012/10857-3) e do projeto de mestrado de

SAVIOLI (2015), intitulado *Cinética, estudo e avaliação do processo de deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico diluído* (CNPq N° 133618/2014-5), para obter a maior liberação de açúcares fermentescíveis no hidrolisado enzimático. O primeiro projeto realizou o estudo do tratamento hidrotérmico catalisado com ácido (**PA**) e no segundo projeto, foi estudado o pré-tratamento hidrotérmico, catalisado com ácido, acoplado ao um processo de deslignificação com NaOH (**PA+NaOH**). Ambos projetos estudaram a hidrólise enzimática, objetivando a obtenção de açúcares fermentescíveis.

3.2. Matéria-prima

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste estudo foi proveniente da Usina São João (Araras – São Paulo, Brasil), safra de 2012/2013. Este foi utilizado na forma integral.

O bagaço de cana-de-açúcar foi seco em condições ambientes, durante cinco dias, para remover a umidade da matéria-prima. O teor de umidade médio destes materiais após a secagem foi de cerca de 5,0 %. O bagaço foi, em seguida, homogeneizado em um único lote e deixado a temperatura ambiente durante 6 h para equilibrar sua umidade, e em seguida, foi armazenado e mantido em um recipiente à temperatura ambiente (protegido de intempéries) até ser utilizado (SAVIOLI, 2015).

A Tabela 2 apresenta a composição média do bagaço de cana-de-açúcar proveniente da Usina São João.

	Conteúdo / % m/m
Componente	Valor ± desvio padrão
Celulose	$40,45 \pm 2,17$
Hemicelulose	$30,61 \pm 4,04$
Lignina	$19,09 \pm 3,18$
Extrativos	8.96 ± 0.06
Cinzas	$2,48 \pm 0,12$
Total	$101,58 \pm 1,64$

Tabela 2. Composição do bagaço de cana-de-açúcar

Na Figura 9, observam-se fotografias realizadas usando microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície do bagaço de cana-de-açúcar integral, com ampliações de 50x, 100x, 5000x, retiradas do trabalho de SAVIOLI (2015).

As imagens do bagaço de cana-de-açúcar mostram uma estrutura ordenada da matriz, com presença de fibras paralelas, alongadas e feixes maciços. Verifica-se que as microfibras de celulose ainda estão unidas pela matriz de lignina e hemicelulose (SAVIOLI, 2015).



Figura 9. Micrografias do bagaço de cana-de-açúcar integral com ampliações de (A) 50x; (B) 1000x; (C) 5000x, (SAVIOLI, 2015).

3.3. Pré-Tratamento

No pré-tratamento, o objetivo é alterar a composição do bagaço de cana-de-açúcar, modificando sua matriz lignocelulósica, visando aumentar a exposição das fibras de celulose, tornando-as mais acessíveis aos agentes enzimáticos ou ácidos. Os processos de separação dos componentes nos materiais lignocelulósicos compreendem várias técnicas de pré-tratamento, o que inclui processos físicos, químicos, mecânicos e fisiológicos (RABELO *et al.*, 2011).

Este projeto de doutorado tem como objetivo o estudo do desenvolvimento de modelos de fermentação e *software* para monitoração e controle do processo fermentativo. No entanto, é importante saber os procedimentos com os quais foram obtidas as matérias-primas para a avaliação da fermentação. Os procedimentos são apresentados a seguir.

3.3.1. Pré-Tratamento Hidrotérmico Catalisado com Ácido e Pré-Tratamento Hidrotérmico Catalisado com Ácido e Acoplado ao Processo de Deslignificação com NaOH

O pré-tratamento catalisado com ácido (**PA**) foi realizado com 20 % de material seco. Uma solução de H_2SO_4 de 1 % m/v foi adicionada para constituir o meio reacional. O processo de pré-tratamento foi feito em uma autoclave na temperatura de 121 °C, com tempo de 80 min (PLAZAS, 2015). Posteriormente, o bagaço pré-tratado foi resfriado e lavado, até atingir um pH neutro.

Com relação ao pré-tratamento catalisado com ácido, acoplado ao processo de deslignificação com NaOH (**PA+NaOH**), o mesmo procedimento do pré-tratamento anterior foi utilizado, com a adição de uma solução de NaOH 1 % m/v. Um banho termostático a 80 °C foi utilizado por um tempo de 90 min. Posteriormente, o bagaço pré-tratado foi resfriado e lavado, até atingir um pH neutro (SAVIOLI, 2015).

O material pré-tratado deste projeto foi produzido no trabalho de pós-doutorado (FAPESP 2012/10857-3) (PLAZAS, 2015) e no projeto (CNPq 133618/2014-5) (SAVIOLI, 2015).

A Figura 10 apresenta as micrografias do bagaço de cana-de-açúcar, submetido ao pré-tratamento, catalisado com ácido sulfúrico diluído (**PA**).

Ao observar as imagens da Figura 10, percebe-se que as superfícies das fibras foram modificadas pelo tratamento com ácido sulfúrico diluído, no qual as fibras aparecem muito mais expostas. Após a aplicação do pré-tratamento, acontece a ruptura da forte matriz de celulose-hemicelulose-lignina. Também é possível visualizar espaços vazios entre as fibras, como consequência da remoção das hemiceluloses.

A Figura 11 é referente à análise de MEV do bagaço de cana-de-açúcar deslignificado, com concentração de 1,0 % m/v NaOH (**PA+NaOH**), utilizando um

banho termostático a 80 °C por um tempo de 90 min. Posteriormente, o bagaço pré-tratado foi resfriado e lavado, até atingir um pH neutro.

Das figuras mostradas, duas são micrografias da superfície, com ampliação de 100x e 500x, e três micrografias da fratura, com ampliações de 400x, 1000x e 5000x.

Pré-tratamentos alcalinos também têm um efeito notável sobre a morfologia do bagaço de cana-de-açúcar, especialmente nos feixes das fibras. Ao analisar as figuras do bagaço de cana-de-açúcar deslignificado para concentração de 1 % m/v NaOH, (**PA** +**NaOH**) (Figura 11), os feixes do bagaço começam a deconstruir e as fibras se soltam umas das outras quando observa-se a superfície das amostras. Nota-se na Figura 11 que as micrografias estão ainda mais desestruturadas, com fibras mais soltas e independentes quando comparadas ao bagaço de cana-de-açúcar integral (Figura 9).



Lag. 50 X 1 Probe- 100 pA Anostra 3 13-5eg-2013

(C)





Figura 10. Micrografias do bagaço de cana-de-açúcar **PA** com ampliações de (A) 50x; (B) 1000x; (C) 5000x. (SAVIOLI, 2015).



Figura 11. Micrografias do ponto de 0,5 % m/v PA+NaOH, 60 min e 80 °C com ampliações de (A) 100x da superfície; (B) 500x da superfície; (C) 400x da fratura; (D) 1000x da fratura; (E) 5000x da fratura, (SAVIOLI, 2015).

3.4. Hidrólise Enzimática

Uma hidrólise enzimática consiste em uma reação química catalisada por uma enzima que utiliza água para dividir uma molécula em outras duas moléculas. Pode-se dizer de forma simples que hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar é a hidrólise de polissacáridos, gerando mono e dissacarídeos.

No processo enzimático, a biomassa é primeiramente pré-tratada, processo para aumentar a exposição das fibras de celulose ao ataque enzimático. Uma vez realizado o pré-tratamento nas condições adequadas, o material lignocelulósico é, então, hidrolisado com a ação de enzimas celulolíticas, liberando os açúcares fermentescíveis. As condições do processo: temperatura, pH, tempo de sacarificação, concentração de enzimas e relação sólido e líquido dependem do substrato escolhido e das características do complexo enzimático utilizado (RABELO, 2010).

No estudo da hidrólise enzimática das biomassas, **PA e PA+NaOH**, duas cargas de sólidos foram estabelecidas, sendo: 3,0 % m/v e 8,0 % m/v (em base seca), considerando uma carga enzimática de 15 FPU/g de substrato e 33 IU/g de substrato, uma temperatura de 50 °C, e um tempo total de 72 horas. As condições de temperatura, agitação e tempo reacional foram mantidas constantes, como está descrito no desenvolvimento experimental na continuação desse capítulo.

3.4.1. Reagentes e Equipamentos

No desenvolvimento deste estudo, a utilização de reagentes químicos foi requerida. A Tabela 3 apresenta os reagentes utilizados, acompanhados da marca e pureza.

Tabela 3. Lista de reagentes utilizados durante a hidrólise enzimática das biomassas PA e PA+NaOH

Reagente	Marca	Pureza
Ácido cítrico anidro	Dinâmica	99,5 %
Ácido sulfúrico	Synth	95-98 %
Hidróxido de sódio	Synth	97 %
Celulase from Trichoderma reesei Celuclast [®] 1.5L	-	-
Celobiase from Aspergillus niger Novozyme 188	Sigma Aldrich / Lot.: N°. 011M2020	\geq 250 units/g
Água deionizada	-	-
Água destilada	-	-

A seguir, a Tabela 4 apresenta os equipamentos utilizados e a marca.

Tabela 4. Lista de equipamentos utilizados durante a hidrólise enzimática das biomassas PA e

PA+NaOH

Equipamentos	Marca
Analisador de umidade por infravermelho	GEHAKA IV 2000
Autoclave vertical AV-50 Plus	PHOENIX LUFERCO®
Estufa com circulação e renovação de ar	LABOR
Banho ultratermostático	MARCONI
Moinho	IKA® WERKE
Balança analítica	BEL ENGINEERING
Balança semi-analítica	GEHAKA
Purificador de água	MEGA PURITY
Destilador de água	QUIMIS®
Bomba de vácuo	PRISMATEC
Mufla	QUIMIS®
Cromatógrafo líquido	
Coluna de troca iônica – HPX-87H	BIO-RAD AMINEX®
Coluna C18 4µm	NOVA-PAK
Shaker	INNOVA 44 NEW BRUSWICK
	SCIENTIFIC

3.4.2. Preparação da Solução Tampão de Citrato Monohidratado 0,05 mol/L (pH = 4,8)

Para o preparo do tampão de citrato 0,05 mol/L, 9,605 g de ácido cítrico anidro foram dissolvidos em 250 mL de água destilada. Em seguida, transferiu-se tal solução para um balão volumétrico de 1 L, que teve seu volume aferido com água destilada. Em seguida, mediu-se o pH e adicionou-se hidróxido de sódio até que a solução atingisse o pH de 4,8 (aproximadamente 3,68 g).

3.4.3. Hidrólise Enzimática das Biomassas do PA e PA+NaOH

A hidrólise enzimática do bagaço de cana-de açúcar pré-tratado **PA** e **PA+NaOH** foi realizada usando duas concentrações de 3 % m/v e 8 % m/v, em base seca, em erlenmeyers de 3 litros, em um Shaker Innova 44 New Bruswick Scientific (CTBE, Campinas – Brasil), agitado a 180 rpm, em uma temperatura de 50 °C, em um tempo total de 72 horas. O pH foi ajustado a 4,8 com uma solução tampão de citrato monohidratado 0,05 mol/L. *Cellulose Novozymes Cellic*® *CTec2* e b-glucosidase de *Aspergillus niger* (*Sigma–Aldrich Corporation*, St. Louis, MO, USA), atingindo cargas enzimáticas de 15 FPU/g de substrato e 33 IU/g de substrato. O passo seguinte consiste na desativação da enzima, na autoclave a 121 °C, por um tempo de 8 min, e centrifugação à velocidade de 6500 rpm, por um tempo de 15 min.

O hidrolisado produzido foi congelado e estocado para ser usado no passo seguinte, que foi a fermentação, Figura 12.

(A)

(B)



(C)



Figura 12. (A) Biomassa após a pesagem (massa seca). (B) Hidrólise enzimática das biomassas PA e PA+NaOH na temperatura de 50 °C, com rotação de 180 rpm, no período de 72 horas, com agitador Shaker Innova 44 New Bruswick Scientific (CTBE, Campinas – SP, Brasil). (C) Hidrolisado enzimático depois de 72 horas

3.4.4. Análise Cromatográfica dos Hidrolisados Enzimáticos

Para a determinação de ácidos (acético, fórmico e levulínico) e açúcares (arabinose, celobiose, glicose, xilose), um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) com detector de índice de refração (IR) foi utilizado nas seguintes condições: fase móvel usando como eluente H₂SO₄ 0,005 M, com fluxo de 0,6 mL/mim, e volume de injeção de 10 μ L. Os compostos foram separados por uma coluna *Bio-Rad Aminex HPX87H* 300 x 7,8 mm/tamanho da partícula de 9 μ m, temperatura da coluna de 35 °C, temperatura do detector de 35 °C, e tempo de corrida de 30 min.

Para a determinação de HMF e Furfural, foi utilizado HPLC com Detector UV. As condições usadas foram: fase móvel empregando como eluente acetonitrila em água (1:8), com 1 % de ácido acético (100 ml de ACN: 800 mL de Água Milli-Q + 9mL de ácido acético), com fluxo de 0,8 mL/min, volume de injeção de 10 μ L. Esses compostos foram separados por uma coluna *Acclaim 120 – C18* 150 x 4,8 mm – Thermo, temperatura da coluna de 25 °C (ambiente) e comprimento de onda de 274 nm. O tempo de corrida foi de 10 min para padrões, 20 min para amostras, podendo se estender dependendo da matriz.

3.4.5. Resultados da Hidrólise Enzimática

Foi realizada a produção do **HE+PA**, 3 % m/v e 8 % m/v, e **HE+PA+NaOH**, 3 % m/v e 8 % m/v, obtendo-se um volume de 4,5 L para cada um dos experimentos, sendo esta quantidade adequada para a realização de todas as fermentações, que inclui o inóculo e o meio de fermentação.

Na Tabela 5, estão apresentados os resultados das composições dos hidrolisados enzimáticos, mostrando as concentrações dos ácidos orgânicos (ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico) com valores abaixo de 0,5 g/L, as concentrações da arabinose, celubiose e xilose, com valores entre 0,61 g/L e 0 g/L para os dois primeiros, e para xilose, os valores estão na faixa de 4,11 g/L e 1,14 g/L. Do mesmo modo, as concentrações dos inibidores, HMF e furfural, são detalhadas com concentrações de 0,02 g/L como valor máximo. Por último, os resultados da glicose com valores de 31,70 g/L para **HE+PA** 8 %, 8,35 g/L para **HE+PA** 3 %, 26,01 g/L para **HE+PA+NaOH** 8 %, e 8,10 g/L para **HE+PA+NaOH** 3 %. Segundo os dados obtidos, conclui-se que os hidrolisados enzimáticos, com carga de 8 % m/v de bagaço, em base seca, têm uma maior liberação de açúcares fermentescíveis quando comparados com os hidrolisados enzimáticos com cargas de 3 % de m/v de bagaço, em massa seca, e essa resposta está diretamente relacionada à quantidade do material reacional nos sistemas.

Os produtos dos hidrolisados enzimáticos estão apresentados na Figura 13, podendo notar a grande liberação de glicose quando comparada com os outros co-produtos.

Na Tabela 6 foi realizada uma comparação das concentrações de glicose no **HE+PA** 8 % e **HE+PA** 3 % obtidos, com 31,70 g/L e 8,35 g/L, respectivamente, com os dados expostos no trabalho de PLAZAS (2015), que apresentam uma concentração de glicose no **HE+PA** 8 % e **HE+PA** 3 % de 34,54 g/L e 12,67 g/L, observando-se uma diferença nas concentrações, ainda que usada a mesma metodologia. Paralelamente, foi comparada a concentração de glicose obtida de 26,01 g/L para o **HE+PA+NaOH** 8 % com o valor de 34 g/L também para o **HE+PA+NaOH** 8% por Savioli (2015), que também apresenta uma queda nos resultados finais como no processo de **HE+PA**. Essa mudança deve-se ao desenvolvimento das hidrólises enzimáticas, sem o uso do composto azida sódica, que é comumente utilizado na indústria como biocida. Assim, sem a presença do biocida, os microrganismos tiveram a possibilidade de estar em um meio com açúcares disponíveis para seu crescimento, diminuindo a concentração de glicose. Por esse motivo, os valores da glicose dos processos desenvolvidos nesse trabalho diferem em relação aos trabalhos de PLAZAS (2015) e SAVIOLI (2015). Na Figura 14 observam-se os valores comparados, mencionados anteriormente.

Tabela 5. Composição dos hidrolisados enzimáticos (**HE**) obtidos após a reação enzimática das biomassas (**PA**) e (**PA+NaOH**) para o estudo de avaliação da fermentação

Componente	(HE+PA) 8 % m/v	(HE+PA) 3 % m/v	(HE+PA+NaOH) 8 % m/v	(HE+PA+NaOH) 8 % m/v
	g/L	g/L	g/L	g/L
Ácido Acético	0,21	0,04	0,13	0,04
Ácido Fórmico	0,00	0,50	0,05	0,00
Ácido Levulínico	0,00	0,00	0,00	0,00
Arabinose	0,02	0,17	0,00	0,00
Celobiose	0,58	0,00	0,61	0,08
Glicose	31,70	8,35	26,01	8,10
Xilose	3,28	1,21	4,11	1,14
HMF	0,00	0,00	0,02	0,00
Furfural	0,00	0,01	0,02	0,00

Componente	(HE+PA) 8 % m/v	(HE+PA) 3 % m/v	(HE+PA+NaOH) 8 % m/v	(HE+PA+NaOH) 8 % m/v
	g/L	g/L	g/L	g/L
	А	В	С	D
Glicose	31,7	8,35	26,01	8,1
Glicose	34 54	12 67		_
(Plazas 2015)	57,57	12,07		
Glicose			24	
(Savioli 2015)	-	-	34	-

	Tabela 6. C	Comparação	dos valores	resultantes	de glicose	(g/L)	com os	valores	de referência
--	-------------	------------	-------------	-------------	------------	-------	--------	---------	---------------



Figura 13. Resultados da composição dos hidrolisados enzimáticos produzidos: A) (HE+PA) 8 %. B) (HE+PA)3 % C) (HE+PA+NaOH) 8 % D) (HE+PA+NaOH) 3 %, em g/L





Figura 14. Valores das concentrações finais de glicose quando comparado aos valores de referência

3.5. Fermentação das Misturas de HE+PA com Melaço e HE+PA+NaOH com Melaço

Nessas fermentações de substrato de segunda geração (2G) adiciona-se melaço para complementar nutrientes ausentes no licor e para enriquecer o mosto com os açúcares C6 do processo de primeira geração (1G). Assim, foram realizadas as fermentações das misturas dos **HE+PA**, 3 % m/v e 8 % m/v com melaço, e **HE+PA+NaOH**, 3 % m/v e 8 % m/v com melaço, e avaliação do processo, em que foi realizada a análise da evolução dos valores de concentração, de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação. A relação em volume de hidrolisado enzimático e o melaço é de aproximadamente 75% e 25%, respectivamente.

Os componentes do processo foram: o microrganismo (*Saccharomyces cerevisiae*), cultivado no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, os produtos do metabolismo (nesse estudo de caso é o etanol) e os nutrientes e/ou substratos (**HE+PA**, enriquecido com melaço e **HE+PA+NaOH**, enriquecido com melaço). O procedimento experimental está descrito na próxima seção.

A partir dos dados obtidos nessa seção vão ser realizadas estudos como: desenvolvimento dos modelos matemáticos, o sistema de inferência de informação usando redes neurais artificiais (RNA) e o sistema de controle.

3.5.1. Reagentes e Equipamentos

No desenvolvimento deste estudo, a utilização de reagentes químicos foi requerida.

A Tabela 7 apresenta os reagentes utilizados, com marca e pureza.

Tabela 7. Lista de reager	ntes utilizados no estud	o de fermentação das	s biomassas PA e PA+NAOH
Ŭ		,	

Reagente	Marca	Pureza
Extrato de levedura	FlukaAnalitical. / Lot.: N°. BCBD4174V	-
Bacto peptona	Becto Dickinson & Co. / Lot.: N°. 1269920	-
Glicose	Synth	99,5 %
Ureia	Synth/ Lot.: N°. 172956	\geq 98,0 %
Tiamina	Sigma – Aldrich / Lot.: N°. 100DM019V	\geq 98,0 %
DAP	Sigma – Aldrich / Lot.: N°. SLBD5797V	\geq 98,0 %
Sulfato de Magnésio	Synth / Lot.: N°.170527	\geq 98,0 %
Sulfato de Zinco	Sigma – Aldrich / Lot.: N°.MKBH1967V	99%
Ampicilina	-	1%
Kamoram	Elanco	5%
Água deionizada	Mili-Q	-
Água destilada	-	-

A seguir, na estão apresentados os equipamentos utilizados e a marca.

Tabela 8. Lista de equipamentos utilizados

Equipamentos	Marca
Microscópio	NIKON ECLIPSE H550S
Autoclave vertical AV-50 Plus	PHOENIX LUFERCO®
Estufa com circulação e renovação de ar	LABOR
Shaker Orbital	INNOVA 44/ NEW BRUNSWICK
Balança analítica	BEL ENGINEERING
Cromatógrafo líquido	AGILENT TECHNOLOGIES
Purificador de água	MEGA PURITY
Destilador de água	QUIMIS®
Mufla	QUIMIS®
Coluna de troca iônica – HPX-87H	BIO-RAD AMINEX®

3.5.2. Preparo do Meio de Cultura

O microrganismo usado nesse estudo foi a *Saccharomyces cerevisiae*, que apresenta a habilidade de metabolizar unicamente açúcares de seis carbonos para produzir etanol.

O meio de cultura utilizado para ativação do microrganismo foi preparado em laboratório conforme a composição apresentada na Tabela 9.

Tabela 9. Composição de preparo do meio de cultura

Composto	Concentração (kg/m ³)
Peptona	200

Extrato de levedura	10
Glicose	20
Agar	15

Inicia-se o processo dissolvendo os nutrientes (Tabela 9) em água destilada e, posteriormente, completa-se o volume para 100 mL. Em seguida, a solução final foi autoclavada a 121 °C, por 15 minutos. Imediatamente, após o processo de autoclavagem, transferiu-se aproximadamente 15 a 20 mL de meio para a placa de Petri (Figura 15). Considera-se importante salientar que o último procedimento foi realizado em condições específicas de uma câmara de fluxo laminar. Finalmente, o meio de cultura foi submetido a um processo de arrefecimento apropriado para a posterior inoculação com células.



Figura 15. Placa de Petri com o meio de cultura após a inoculação com células (S. cerevisiae)

3.5.3. Preparo do Pré-Inóculo

Nesta etapa, a ativação e o crescimento da levedura foi realizada em um meio de cultura igual ao meio de ativação da Tabela 9, sem adição de ágar. A composição do meio utilizado para o crescimento do microrganismo (*S.cerevisiae*) está descrita na Tabela 10.

Tabela 10. Composição de preparo do meio de crescimento do microrganismo (S. cerevisiae)

Composto	Concentração / kg/m ³
Peptona	20
Extrato de levedura	10
Glicose	20

Baseando-se nas proporções descritas na Tabela 10, os componentes foram pesados separadamente e transferidos para erlenmeyers, constituindo uma solução de 100 mL de meio de crescimento do microrganismo. Este procedimento foi realizado em duplicata, objetivando minimizar os riscos de contaminação do meio de crescimento (fato que inviabiliza o posterior processo fermentativo) (Figura 16).



Figura 16. Meio de crescimento da S. cerevisiae (100 mL da solução)

Em seguida, o meio de crescimento foi autoclavado (a 121 °C, por 15 minutos). Após o ciclo de autoclavagem, o meio de crescimento foi submetido à arrefecimento lentamente à condições ambientes em uma câmara de fluxo laminar.

Depois, as colônias dispostas na placa de Petri (Figura 15) foram raspadas por meio de uma alça de plástico e transferidas para o meio de crescimento.

O período de crescimento foi realizado em um incubador orbital a 33 °C, por 24 horas (Figura 17).



Figura 17. Fase de crescimento das leveduras *S. cerevisiae* em um incubador orbital a 33 °C,
250 rpm, por 24 horas. (A) Meio de crescimento (pré-inóculo) antes de serem inoculados; (B)
Meio de crescimento (pré-inóculo) após o processo de incubação

Após o período de incubação, uma alíquota foi retirada de forma estéril e a morfologia das leveduras foi verificada. Na Figura 18, observam-se as leveduras com adequada morfologia, uniformemente distribuídas e exibindo uma aparência oval.



Figura 18. Fotografia do microscópio para verificar a morfologia das leveduras *S. cerevisiae*. A)
Meio de crescimento (pré-inóculo) para o sistema fermentativo do hidrolisado da biomassa PA
8 % m/v (B) Meio de crescimento (pré-inóculo) para o sistema fermentativo do hidrolisado da biomassa PA 3 % m/v

3.5.4. Preparo do Inóculo

A continuação, apresenta-se a metodologia para o preparo do inóculo da fermentação. Esta é uma etapa anterior ao processo de fermentação, na qual as leveduras são submetidas à um processo de adaptação ao substrato (**HE+PA** enriquecido com melaço e **HE+PA+NaOH** enriquecido com melaço) e aos possíveis inibidores que estejam presentes, permitindo, assim, um melhor desempenho da levedura no processo fermentativo.

O meio utilizado para o inóculo apresenta a composição mostrada na Tabela 11.

Tabela 11. Concentração dos reagentes de preparo do inóculo

Composto	Concentração / kg/m ³
Ureia	5
Tiamina	0,003
DAP	1,10
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	1
Sulfato de Zinco (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	0,005

Baseando-se nas proporções descritas na Tabela 11, as respectivas quantidades de sulfato de magnésio e sulfato de zinco foram previamente determinadas para constituir

uma solução de inóculo de 100 mL. Este procedimento foi realizado em duplicata, objetivando aumentar a concentração de células no inóculo.

Em seguida, as misturas de hidrolisado enzimático produzido com melaço foram adicionadas, e estas misturas tinham uma concentração de açúcares redutores totais (**ART**) de aproximadamente 80 g/L, na concentração final do meio de cultura. Em seguida, a solução constituída pela mistura de hidrolisado enzimático com melaço, sulfato de magnésio e sulfato de zinco foi autoclavada (a 121 °C, por 15 minutos). Após o ciclo de autoclavagem, a solução anterior foi submetida a arrefecimento lentamente à condições ambientes em uma câmara de fluxo laminar.

Em seguida, as respectivas quantidades de uréia, tiamina e DAP foram adicionadas.

Observação: As soluções de uréia, tiamina e DAP devem ser esterilizadas por filtração, utilizando uma membrana de filtração com tamanho de poro de 0,22 µm.

Logo, os erlenmeyers com o inóculo foram mantidos em um processo de adaptação, sob agitação constante (250 rpm) e temperatura de 33 °C, por 30 minutos (Figura 19 A). Posteriormente, foram acrescentados 10 mL da solução resultante do pré-inóculo para dar início à nova propagação celular no meio.

Finalmente, depois de 12 horas de incubação (Figura 19 B), a solução anterior foi centrifugada (a 7000 rpm, por 15 minutos) e o sobrenadante foi retirado. O precipitado (constituído pela massa total de células) foi suspendido em 100 mL de água destilada, previamente autoclavada. O sistema resultante (massa total de células mais água destilada) é utilizado como o inóculo no biorreator.



Figura 19. Fase de preparo do inóculo (A) Erlenmeyers com solução antes de serem inoculados (B) Erlenmeyers após o processo de incubação

3.6. Determinação da Concentração de Células Totais

A análise gravimétrica de massa seca foi realizada em *eppendorf* de 2 mL, previamente colocados na estufa por 24 horas e sua massa seca foi determinada.

Uma amostragem de 1 mL foi realizada, a qual foi centrifugada a 13500 rpm, por 3,5 minutos. O sobrenadante foi devidamente descartado. O precipitado foi lavado 2 vezes com água ultrapura (tipo I-mili-Q). Logo, a amostra contida no *eppendorf* foi seca em uma estufa com circulação de ar a 80 °C.

A quantificação da massa seca foi realizada seguindo a Equação (85)

$$(Biomassa) = \left(\frac{M_2 - M_2}{V}\right) \tag{85}$$

 M_2 é a massa do *eppendorf* com amostra seca (kg); M_1 é a massa do *eppendorf* previamente seco a 80 ± 1 °C (kg) e V é o volume no líquido centrifugado (m³).

3.7. Procedimento da Fermentação da Mistura de HE+PA com Melaço e HE+PA+NaOH com Melaço

Para cada fermentação, foram utilizados 750 mL (correspondendo a 88,23 % v/v do meio da fermentação) da mistura do hidrolisado enzimático, enriquecido com o melaço, que foi autoclavado a 121 °C, durante 30 minutos. Após o ciclo de autoclavagem, estas misturas foram submetidas ao arrefecimento lento, à condições ambientes. Em seguida, a mistura de hidrolisado enzimático foi transferida para o biorreator e as condições do processo fermentativo (200 rpm e temperatura de fermentação) foram definidas. Uma vez atingida a estabilidade, 100 mL do inóculo foi adicionado, correspondente à 11,76 % v/v do meio de fermentação. É importante salientar que a concentração final do meio de cultura da fermentação, que incluiu a mistura de hidrolisado enzimático com o melaço e o inóculo, atingiu um valor aproximado de 160 g L⁻¹ de ART.

Na Tabela 12, o planejamento dos experimentos das fermentações é apresentado. No projeto, foram realizados 16 experimentos em batelada simples nas temperaturas: 30, 32, 34 e 36 °C. Nessa mesma tabela, também são apresentados os diferentes tipos de misturas dos hidrolisados enzimáticos: **HE+PA** 3 % e 8 %, e **HE+PA+NaOH** 3 % e 8 %, que junto com o melaço foram usados como fonte de substrato.

Número do experimento	Tipo de hidrolisado	Temperatura °C
1	HE+PA 8 % + Melaço	30
2	HE+PA 8 % + Melaço	32
3	HE+PA 8 % + Melaço	34
4	HE+PA 8 % + Melaço	36
5	HE+PA 3 % + Melaço	30
6	HE+PA 3 % + Melaço	32
7	HE+PA 3 % + Melaço	34
8	HE+PA 3 % + Melaço	36
9	HE+PA + NaOH 3 % + Melaço	30
10	HE+PA + NaOH 3 % + Melaço	32
11	HE+PA + NaOH 3 % + Melaço	34
12	HE+PA + NaOH 3 % + Melaço	36
13	HE+PA + NaOH 8 % + Melaço	30
14	HE+PA + NaOH 8 % + Melaço	32
15	HE+PA + NaOH 8 % + Melaço	34
16	HE+PA + NaOH 8 % + Melaço	36

Tabela 12. Planejamento dos experimentos de fermentação alcoólica

As fermentações das misturas de **HE+PA** 3 % e 8 %, e **HE+PA+NaOH** 3 % e 8 %, com o melaço foram realizadas na configuração em batelada e executadas em um biorreator (capacidade de 1 L) *Bioflo[®] / CelliGen15, Bioreactor New Brunswick Scientific Co.* (Figura 20), o qual possui um agitador de pás planas, com 6 lâminas.

Considera-se importante salientar que não foram adicionados nutrientes ao mosto, objetivando representar um processo industrial e manter as condições mais econômicas para um processo em larga escala. No entanto, foram adicionados 15 μ L de *Ampicilina* e 1,5 mL de *Kamoran*, para evitar o crescimento indesejável de bactérias.

A amostragem *offline* do processo foi realizada a cada 3 horas aproximadamente, realizando medições de absorbância (600 nm), em massa seca, fazendo a identificação de compostos por cromatografia, e a viabilidade das células por microscópio. Paralelamente, na coleta de informação *online*, foram usados sensores de pH, termopar, sonda de DO, sonda de ABER (pF/cm), espectrômetro de massas para análise de gases residuais HIDEN ANALITICAL, Espectrômetro por Infravermelho Médio FTIR ALPHA Bruker e Biocommand (*Software* de aquisição de dados) (Figura 21).



Figura 20. BiorreatorBioflo® / CelliGen15, Bioreactor. New Brunswick Scientific Co





3.7.1. Determinação da Concentração de Células Totais

A metodologia para determinar a concentração das células está na seção 3.6.

3.7.2. Determinação de Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi determinada por meio da técnica de redução de metileno. Este método baseia-se no fato das células viáveis reduzirem o corante azul de metileno à azul leucometileno, tornando-se incolores, sendo que as células não viáveis não apresentam esta capacidade, e continuam azuis quando observadas no microscópio.

A viabilidade foi calculada pela Equação (86):

$$V = \left(\frac{C_{\nu}}{C_{t}}\right) x 100$$
(86)

Cv é o número de células vivas (brancas); Ct é o número de células totais.

3.7.3. Determinação das Concentrações de Substrato e Produto na Fermentação

As concentrações do açúcar monomérico (glicose), e produtos da fermentação (glicerol e etanol) foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A sacarose, glicose, frutose, xileno, etanol e glicerol foram separados por uma coluna de troca iônica *Bio-Rad* ® *Aminex HPX-87P* (300 mm x 7,8 milímetros, catálogo N° 125-0140, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA), com detector de índice de refração. A coluna foi mantida a 30 °C, e 5 mM de H₂SO₄ foi utilizado como eluente em uma vazão de 0,5 mL/min.

Uma série de padrões de calibração contendo os compostos a serem quantificados foi preparada nas concentrações sugeridas nos protocolos padrão NREL.

Cálculo para Avaliação da Fermentação

• Rendimento

O rendimento em grama de etanol por grama de substrato (glicose), ao finalizar o processo fermentativo das misturas de **HE+PA** 3 % e 8 %, e **HE+PA+NaOH** 3 % e 8 %, com o melaço, respectivamente, foi determinado pela Eq. (87) :

$$Y_{P_{/GLC}} = \frac{P_F - P_o}{S_o - S_f}$$
⁽⁸⁷⁾

Os subíndices F e 0 correspondem à instantes de tempo final e inicial, respectivamente.

Para expressar o rendimento em porcentagem, utilizou-se a Eq. (88), que considera o rendimento teórico de 0,511 $g_{etanol}/g_{substrato}$ como 100 %.

$$\operatorname{Re} nd(\%) = \frac{Y_{P/GLC}(100)}{0.511}$$
(88)

O rendimento em grama de célula por grama de substrato (glicose), ao finalizar o processo fermentativo dos hidrolisados das misturas de **HE+PA** 3 % e 8 %, e **HE+PA+NaOH** 3 % e 8 %, com o melaço, respectivamente, foi determinado pela Equação (89):

$$Y_{X_{/GLC}} = \frac{X_F - X_o}{S_o - S_f}$$
⁽⁸⁹⁾

O subíndices $F \in O$ correspondem à instantes de tempo final e inicial, respectivamente.

• Produtividade

Dado que o interesse prático está na avaliação do desempenho dos respectivos processos fermentativos, as Equações (90) e (91) descrevem a produtividade das células (P_x) e a produtividade do produto (etanol) (P_P).

$$P_x = \frac{X_m - X_o}{t_f} \tag{90}$$

$$P_p = \frac{P_m - P_o}{t_f} \tag{91}$$

Nas quais, os subíndices $m \in 0$ correspondem à instantes de tempo máximo e inicial, respectivamente.

3.7.4. Resultados e Discussão da Fermentação das Misturas de HE+PA com Melaço e HE+PA+NaOH com Melaço

Nesta seção, os resultados das amostragens nas fermentações são apresentados e a discussão das fermentações das misturas é realizada: **HE+PA** 3 % com melaço, **HE+PA** 8 % com melaço, **HE+PA+NaOH** 3 % com melaço, **HE+PA+NaOH** 8 % com melaço, e **HE+PEOX** 7 % com melaço, e esse último provém da dissertação de mestrado de William Eduardo Herrera (Fapesp – 2009/13600-0) e os dados experimentais foram utilizados.

O estudo cinético das fermentações foi realizado analisando os resultados da CLAE. As Tabela 13-16 mostram os dados obtidos nas bateladas, como: a) tempo (h), que corresponde ao momento que foi feita a amostragem; b) concentração de células; c) ART ou substrato, que é composto pelos açúcares: glicose, frutose e sacarose; d) produtos da fermentação, como: etanol, glicerol e ácido acético. Os resultados do CLAE apresentam um ruídos mas que são associados com problema analíticos.

Após a inoculação das leveduras no meio de cultura, o processo de fermentação alcoólica foi iniciado. Nas Figuras 22 a 26, as cinéticas de todas as bateladas foram observadas, tendo sido realizadas desde o tempo inicial, *t*₀, até o tempo final, *t*_f. Nestas figuras, a concentração de substrato, etanol, glicerol e de células no ponto de amostragem foram apresentadas. Assim, a junção das amostras durante o processo de fermentação traz como resultado o estudo cinético da fermentação alcoólica. Além disso, observa-se a diminuição da concentração de substrato, que foi consumido pela *S.cerevisiae*, a geração de diferentes produtos e coprodutos da fermentação (etanol, glicerol, ácidos orgânicos), e, paralelamente, o crescimento da concentração de células no sistema (Tabela 13-Tabela 17). Esta dinâmica é própria dos processos em que a adaptação da levedura na matriz do hidrolisado enzimático é favorável.

Na produção de etanol, nas primeiras horas (entre 0 - 2 h), observa-se a fase *lag*, que corresponde ao período de adaptação em que a célula sintetiza enzimas necessárias para o metabolismo dos componentes presentes no meio. Esta fase *lag* é pouco extensa devido ao processo do inóculo, que é o pré-cultivo das células no meio de cultura com a mistura do hidrolisado enzimático com o melaço e sais nutrientes, no qual a célula se adapta ao meio; isto beneficia a diminuição desta etapa e dá início a etapa de transição, que descreve o aumento da velocidade de formação de células com um aumento exponencial da quantidade da biomassa no tempo de 2 a 5 horas para os processos fermentativos descritos.

Posteriormente, entre 6 e 11 horas de produção, o processo apresenta um crescimento linear, no qual a velocidade de crescimento é constante. Em torno das 12 horas ocorre uma desaceleração devido ao esgotamento de um ou mais componentes do meio de cultura, necessários para o crescimento, e também, pelo acúmulo de metabólitos inibidores. Neste momento, as velocidades de crescimento e específica diminuem até se anularam em t_f (tempo final), que está na faixa de 14 até 16 horas.

A fase estacionária é a última etapa da fermentação, que aproximadamente começa depois das 16 horas até o tempo do consumo total do substrato ou tempo final, t_f . Esta fase caracteriza-se por um equilíbrio entre a velocidade de formação de células e de morte do microrganismo.

Nos resultados das fermentações a partir do **HE+PA** 3 % com melaço, **HE+PA** 8 % com melaço, **HE+PA+NaOH** 3 % com melaço, **HE+PA+NaOH** 8 % com melaço, e **HE+PEOX** 7 % com melaço, tiveram concentrações médias de etanol que foram significativas, com valores de 82,81 g/L, 74,48 g/L, 78,74 g/L, 77,71 g/L e 65,74 g/L, respectivamente. Estes resultados demonstram que o principal produto da fermentação é produzido de forma satisfatória.

Durante o processo de fermentação, observa-se a formação de glicerol, que é o maior subproduto da fermentação alcoólica realizado pela *S.cerevisiae*, e usualmente entre 2 - 3 % do açúcar fermentado é transformado nesse composto (JAIN *et al.*, 2011). Os valores de concentração de glicerol destes experimentos estiveram dentro da faixa de 2 - 4 %. Adicionalmente, foram produzidos ácido acético, ácido fórmico, ácido lático e ácido succínico, sendo que suas concentrações não ultrapassaram de 2 g/L.

Todo este processo mostra que as condições do desenvolvimento do meio, sob temperatura controlada e agitação adequada, foram apropriadas para a produção de etanol a partir das misturas dos hidrolisados com o melaço.
Fermentação da mistura	Tempo / h	Células (g/L)	ART (g/L)	Frutose (g/L)	Glicose (g/L)	Sacarose (g/L)	Xilose (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Acido Acético (g/L)
HE+PA	0,0	2,90	157,67	51,17	52,01	51,77	1,27	1,56	0,00	0,67
3 %	3,3	4,77	138,39	56,81	52,41	27,72	1,38	15,27	1,95	0,60
com melaço	6,0	6,90	117,62	59,12	43,46	14,28	1,25	33,21	3,65	0,60
T = 30 °C	9,0	8,83	70,08	47,34	22,75	0,00	1,15	45,52	4,84	0,59
	12,7	9,87	37,48	29,54	7,95	0,00	1,41	61,03	5,93	0,60
	15,2	10,93	22,58	19,07	3,51	0,00	1,55	67,24	6,56	0,62
	18,0	11,47	8,86	7,36	1,49	0,00	2,29	74,70	7,08	0,59
	21,3	11,33	1,51	0,00	1,51	0,00	2,78	80,26	7,54	0,58
HE+PA	0,0	2,50	138,59	44,47	46,18	45,55	-	0,83	0,98	0,91
3 %	3,0	4,23	104,90	47,50	43,36	13,34	-	10,40	2,04	0,80
com melaço	6,0	6,57	85,96	49,87	31,13	4,72	-	34,40	4,21	0,78
T = 32 °C	9,0	8,53	52,22	37,23	14,55	0,42	-	45,67	5,53	0,97
	12,0	9,77	29,49	25,13	4,25	0,11	-	62,70	6,56	1,01
	15,0	10,23	12,58	12,00	0,45	0,13	0,54	69,70	7,01	0,91
	18,0	11,13	2,04	1,47	0,41	0,15	0,67	74,73	12,13	0,60
	20,0	10,43	0,52	0,00	0,36	0,15	0,63	72,86	7,15	0,87
HE+PA	0,0	2,87	132,54	43,53	44,43	42,36	-	1,97	0,02	nd
3 %	3,0	5,25	111,19	52,09	45,11	13,29	-	13,33	1,23	0,18
com melaço	6,0	7,87	74,26	45,02	26,08	3,01	-	32,23	4,02	0,28
T = 34 °C	9,0	8,73	48,25	35,62	12,22	0,39	-	47,47	5,19	0,34
	12,5	10,40	20,36	18,71	1,29	0,34	-	66,19	6,33	0,38
	15,0	10,03	8,72	8,31	0,00	0,39	0,61	64,67	6,20	0,30
	18,0	11,77	0,21	0,00	0,00	0,20	0,71	74,82	7,03	0,25
HE+PA	0,0	3,43	132,90	44,16	43,86	42,57	nd	0,52	0,74	0,67
3 %	3,0	5,57	113,87	55,73	45,05	10,72	0,49	11,26	2,13	0,69
com melaço	5,5	7,83	82,33	49,82	28,38	2,64	0,51	28,20	3,75	0,54
T = 36 °C	9,0	10,07	47,07	35,09	11,02	0,38	0,54	42,89	5,05	0,49
	12,5	9,97	20,12	18,64	1,14	0,28	0,48	57,31	5,95	0,50
	15,0	10,67	8,81	8,61	0,00	0,20	0,64	66,74	6,59	0,50
	18,0	10,40	1,44	1,44	0,00	0,00	0,65	69,98	6,32	0,46

Tabela 13. Valores experimentais das concentrações do substrato, produtos e células durante o processo fermentativo do HE+PA 3 % com melaço

Fermentação da mistura	Tempo / h	Células (g/L)	ART (g/L)	Frutose (g/L)	Glicose (g/L)	Sacarose (g/L)	Etanol (g/L)	Glicerol (g/L)	Ácido Acético (g/L)
HE+PA 8 %	0,00	1,33	166,88	51,53	62,49	50,21	1,14	0,80	0,71
com melaço	2,00	1,83	129,02	44,07	52,19	31,12	8,90	1,13	0,74
$T = 30 ^{\circ}C$	5,00	3,27	131,61	48,99	49,25	31,70	17,67	1,83	0,71
	10,16	5,03	93,38	39,97	23,76	28,17	31,02	3,13	0,46
	16,75	7,80	42,17	22,37	4,88	14,17	66,22	4,74	0,48
	20,67	7,97	20,60	12,34	1,96	6,00	71,85	5,66	0,54
	23,75	8,67	10,57	6,13	1,31	2,98	76,67	5,72	0,53
	29,83	8,63	4,07	2,01	0,72	1,28	77,98	5,75	0,50
HE+PA 8 %	0	1,90	194,24	56,76	67,13	66,83	0,82	0,94	1,06
com melaço	2	1,83	191,16	57,74	64,68	65,30	3,24	1,24	1,06
T = 32 °C	4	2,33	180,42	56,44	59,43	61,31	10,75	1,59	0,99
	6	3,00	168,81	55,13	51,25	59,31	14,01	2,37	0,97
	14	6,23	104,17	42,70	23,47	36,11	49,32	5,52	0,87
	17	6,63	86,35	42,35	17,81	24,88	59,43	5,32	0,76
	20	7,17	69,27	39,67	14,44	14,40	68,45	6,02	0,85
	23,5	7,90	58,73	36,27	14,31	7,74	75,67	6,63	0,85
	28	7,47	34,12	27,90	4,14	1,97	87,34	6,92	0,90
	30,5	7,83	21,54	21,54	0,00	0,00	91,71	7,20	0,91
	40,75	8,03	7,64	7,64	0,00	0,00	98,29	7,25	0,87
	44	8,10	3,07	3,07	0,00	0,00	99,24	7,02	0,86
HE+PA 8 %	0	1,43	169,78	46,84	58,20	61,51	0,00	0,64	0,55
com melaço	2	2,23	145,74	54,42	60,31	29,46	5,08	1,26	0,68
T = 34 °C	6	4,63	103,27	53,97	35,49	13,13	26,40	2,92	0,60
	12	7,67	41,07	30,49	8,91	1,58	67,78	5,11	0,51
	18	7,62	7,07	7,07	0,00	0,00	77,45	5,71	0,50
	22	7,77	0,57	0,57	0,00	0,00	73,41	5,88	0,49
HE+PA 8 %	0	1,80	161,91	48,53	61,05	49,71	1,37	0,67	0,63
com melaço	2	1,93	138,09	52,88	53,56	30,08	7,54	1,19	0,67
T = 36 °C	5	2,73	108,28	52,99	41,70	12,92	22,38	2,49	0,62
	8	6,03	74,46	47,13	23,14	3,98	41,30	3,89	0,57
	11	7,07	50,93	37,05	12,69	1,13	55,19	4,37	0,53
	17,17	7,20	11,01	11,01	0,00	0,00	73,36	5,46	0,60
	19	7,30	4,62	4,62	0,00	0,00	67,24	5,56	0,61
	21	7,63	1,52	1,52	0,00	0,00	76,64	5,18	0,54
	30,67	6,81	0,68	0,68	0,00	0,00	80,61	4,84	0,53

Tabela 14. Valores experimentais das concentrações do substrato, produtos e células durante o processo fermentativo do HE+PA 8 % com melaço

Tese de Doutorado – William Eduardo Herrera Agudelo

Fermentação da mistura	Tempo	Células	ART	Frutose	Glicose	Sacarose	Xilose	ETANOL	Glicerol	Ac. Acético
3	h	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
HE+PA+NaOH	0,0	5,20	177,57	75,20	48,26	75,20	0,35	1,22	0,74	0,50
3 % com melaço	3,3	5,60	156,71	49,38	55,76	49,38	0,32	5,83	1,70	0,67
T = 30 °C	6,0	8,37	114,69	27,26	53,08	27,26	0,30	19,25	3,37	0,63
	9,0	10,27	84,61	13,52	48,33	13,52	0,30	33,80	5,12	0,62
	12,7	11,63	46,75	3,96	38,99	3,96	0,34	45,84	6,25	0,67
	15,2	12,20	29,84	0,81	28,55	0,81	0,32	54,51	6,50	0,68
	18,0	13,53	17,81	0,40	17,36	0,40	0,43	68,06	7,21	0,69
	21,3	14,40	8,60	0,61	7,96	0,61	0,49	71,90	7,47	0,69
	24,0	14,00	2,28	0,64	1,61	0,64	0,49	78,20	7,73	0,68
HE+PA+NaOH	0,0	3,47	179,47	44,58	45,07	85,32	0,39	2,53	0,85	0,70
3 % com melaço	3,0	5,25	152,83	51,79	43,68	54,50	0,35	10,21	2,04	0,78
T = 32 °C	6,0	8,00	107,93	49,54	27,54	29,32	0,43	30,62	4,00	0,67
	9,1	10,95	76,25	45,05	17,47	13,04	0,44	47,61	5,64	0,63
	12,0	12,03	52,54	38,01	10,37	3,96	0,49	52,79	6,31	0,62
	15,1	11,80	29,50	26,12	2,41	0,93	0,53	64,44	7,13	0,64
	18,1	13,30	18,12	16,19	1,36	0,54	0,53	71,09	7,57	0,66
	21,1	12,60	17,64	14,81	1,49	1,28	0,53	77,02	7,80	0,67
	24,5	12,47	6,72	5,55	0,00	1,12	0,62	78,98	7,81	0,64
HE+PA+NaOH	0,0	3,73	188,13	59,24	48,62	76,25	0,47	1,98	0,85	0,73
3 % com melaço	3,0	6,85	143,95	59,08	53,21	30,08	0,42	16,05	2,04	0,86
T = 34 °C	6,0	8,70	97,92	58,79	33,05	5,78	0,52	37,07	4,84	0,84
	9,0	10,30	62,46	46,15	15,38	0,88	0,52	48,63	6,40	0,84
	12,0	12,33	38,34	33,15	4,65	0,53	0,59	55,34	7,18	0,87
	17,0	12,23	10,27	9,63	0,00	0,61	0,58	72,43	7,58	0,83
	18,0	10,47	6,90	5,75	0,00	1,10	0,60	74,49	7,81	0,86
	21,0	11,67	1,95	0,86	0,00	1,03	0,65	77,25	7,94	0,86
HE+PA+NaOH	0,0	5,20	187,57	37,44	41,62	103,08	1,74	0,00	0,79	0,65
3 % com melaço	3,0	5,60	132,12	54,43	44,27	31,75	1,91	13,27	2,31	0,67
$T = 36 ^{\circ}\text{C}$	6,0	8,37	86,13	51,46	28,17	6,17	1,94	31,74	4,70	0,64
	9,0	10,27	55,82	40,49	13,80	1,46	1,73	45,27	6,00	0,65
	12,1	11,63	35,34	28,35	5,84	1,09	1,78	56,64	6,53	0,66
	15,0	12,20	18,15	15,43	1,55	1,11	2,90	64,44	7,05	0,69
	18,1	13,53	6,73	4,47	1,10	1,11	2,90	70,84	7,35	0,69
	21,0	14,40	3.47	1.04	0,70	1,65	2,23	80,56	7.24	0,68

Tabela 15. Valores experimentais das concentrações do substrato, produtos e células durante o processo fermentativo do HE+PA+NaOH 3 % com melaço

Tabela 16. V	Valores experimentais das concentrações d	lo substrato, produtos e	e células durante o proce	sso fermentativo do H	E+PA+NaOH 8 % com
melaço					

Fermentação da mistura	Tempo	Celulas	ART	Frutose	Glicose	Sacarose	Xilose	ETANOL	Glicerol	Ac.Acetico
	h	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
HE+PA+NaOH	0,00	3,27	182,81	38,25	49,57	90,24	2,85	1,20	0,81	0,76
8 % com melaço	3,00	5,03	160,59	47,55	55,24	54,92	2,78	6,60	1,64	0,76
$T = 30 ^{\circ}C$	6,00	7,53	111,08	49,89	38,75	21,31	4,37	20,39	3,07	0,51
	9,00	9,67	77,31	42,48	25,88	8,50	3,38	35,24	4,48	0,54
	12,00	11,07	61,89	41,54	15,01	5,07	3,29	45,93	5,66	0,64
	15,00	11,67	40,13	30,83	6,29	2,86	3,71	52,46	5,98	0,62
	18,00	12,17	28,47	22,97	2,66	2,71	3,42	68,56	6,83	0,67
	21,17	11,90	15,64	12,90	0,00	2,61	2,59	75,66	6,54	0,62
	24,00	12,43	10,22	7,09	0,00	2,98	2,89	75,39	7,39	0,66
HE+PA+NaOH	0,00	3,20	184,62	49,25	60,04	71,56	1,07	2,56	0,78	0,90
8 % com melaço	3,00	5,03	152,32	62,95	64,62	23,51	0,94	11,26	2,08	0,93
T = 32 °C	6,00	7,37	102,81	57,94	42,08	2,65	0,73	29,31	3,76	0,92
	9,00	8,93	64,21	42,88	20,21	1,07	0,93	41,44	4,49	0,71
	12,00	9,97	43,52	33,56	9,01	0,90	1,16	55,19	5,56	0,80
	15,00	10,17	24,88	21,47	2,12	1,23	1,16	61,27	6,35	1,111
	18,00	10,87	12,06	10,49	0,08	1,42	1,13	71,53	6,50	1,498
	21,00	10,93	6,71	4,13	0,91	1,59	1,21	72,99	6,86	1,085
	24,00	10,83	3,48	0,99	0,88	1,54	1,15	76,11	7,52	1,09
HE+PA+NaOH	0,00	4,03	182,93	56,78	56,57	66,10	1,20	1,26	0,40	0,93
8 % com melaço	3,00	5,33	148,90	64,82	66,24	16,95	1,23	13,70	1,97	0,73
T = 34 °C	5,25	7,33	116,47	62,50	49,38	4,36	1,05	24,62	3,43	0,64
	9,00	9,80	67,09	46,37	19,64	1,02	1,29	47,44	4,48	0,75
	12,00	10,90	42,43	34,00	7,41	0,97	1,31	57,99	6,05	0,97
	15,00	10,87	22,91	21,06	0,95	0,86	1,13	66,33	6,61	0,75
	18,00	11,30	9,49	7,74	0,53	1,16	1,37	69,84	7,16	1,00
	21,00	11,13	3,70	1,62	0,91	1,12	1,32	79,50	7,31	0,73
	24,00	11,30	3,13	0,99	0,45	1,61	1,32	80,80	7,67	0,95
HE+PA+NaOH	0,00	4,87	191,05	53,21	55,28	78,43	1,22	2,01	0,78	0,42
8 % com melaço	3,00	7,73	147,01	58,34	57,24	29,86	4,19	10,60	2,08	0,49
T = 36 °C	6,00	10,07	83,24	45,68	29,51	7,64	2,68	28,37	3,77	0,53
	9,00	11,20	61,91	42,49	14,75	4,45	2,26	44,94	5,52	0,69
	12,00	11,83	41,40	32,96	5,50	2,79	3,28	52,25	5,75	0,64
	18,00	12,80	17,26	14,30	0,00	2,81	3,10	72,801*	6,76	0,70
	21,17	13,17	3,47	0,00	0,00	3,30	2,88	78,57	6,99	0,70

Fermentação da mistura	Tempo	Celulas	ART	Frutose	Glicose	Sacarose	ETANOL	Glicerol	Ac.Acetico
	h	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
HE+PEOX 7 %+ melaço	0,00	2,56	149,46	54,14	58,27	35,28	5,50	0,00	0,71
T = 30 °C	3,75	3,92	111,26	0,00	0,00	0,00	19,86	0,00	0,00
	7,56	4,73	96,56	58,66	44,45	7,76	33,22	1,74	0,66
	10,45	5,34	77,94	55,54	31,54	9,03	38,03	2,84	0,53
	12,71	6,09	69,76	46,60	21,79	9,10	39,77	3,71	0,52
	16,75	6,41	46,79	0,00	0,00	0,00	40,50	0,00	0,00
	19,75	6,39	42,35	29,40	8,34	8,62	58,08	3,54	0,41
	24,75	6,83	12,35	26,83	5,59	9,46	61,43	4,55	0,52
	27,75	6,74	8,47	13,89	0,00	0,00	71,26	5,18	0,50
	31,46	6,86	0,00	10,02	0,00	0,00	70,70	5,95	0,00
HE+PEOX 7 %+ melaço	0,00	2,82	141,26	46,42	47,50	45,10	1,31	1,28	0,62
T = 32 °C	2,10	2,97	134,89	67,92	60,29	6,36	4,91	2,56	0,98
	5,10	3,97	111,35	59,26	41,44	10,15	18,70	3,58	0,86
	7,10	4,55	97,28	54,62	33,29	8,93	20,69	3,85	0,98
	9,18	4,73	75,65	48,73	24,93	1,89	27,78	4,29	0,94
	12,52	5,03	58,79	40,84	15,45	2,38	36,61	4,89	0,966
	14,18	5,54	53,65	39,56	12,35	1,66	43,07	5,33	1,05
	16,53	5,98	34,87	27,78	5,42	1,59	46,95	5,21	0,81
	18,52	6,37	27,29	22,72	2,75	1,73	55,26	5,82	0,789
	21,10	6,41	4,34	0,00	1,37	2,82	59,15	5,92	0,699
HE+PEOX 7 %+ melaço	0,00	2,69	150,63	53,54	55,42	39,68	2,44	1,09	0,71
T = 34 °C	2,57	2,86	127,88	63,35	52,58	11,38	7,10	1,98	0,66
	4,67	3,66	101,79	53,24	38,11	9,94	12,46	3,83	0,50
	6,37	4,03	98,34	53,39	33,77	10,64	23,35	3,28	0,46
	10,95	5,19	70,35	40,34	18,91	10,57	34,04	3,92	0,46
	13,62	5,57	52,46	39,06	13,40	0,00	44,70	4,71	0,50
	20,35	6,33	24,97	20,66	4,31	0,00	65,46	6,38	0,53
	23,38	6,24	15,98	12,68	3,31	0,00	73,14	6,32	0,57
	26,95	6,51	0,00	0,00	0,00	0,00	68,33	5,68	0,54
	30,45	6,39	0,00	0,00	0,00	0,00	72,50	5,95	0,51
HE+PEOX 7 %+ melaço	0,00	3,06	149,33	57,58	58,80	31,38	1,97	1,01	0,78
T = 36 °C	3,58	3,97	123,70	63,42	48,83	10,91	14,86	2,56	0,73
	6,00	4,40	105,49	57,48	36,13	11,32	18,55	3,61	0,60
	9,75	5,46	77,15	45,01	20,55	11,05	31,95	4,51	0,55
	11,58	5,42	64,87	38,80	14,88	10,66	35,71	4,58	0,58
	14,33	6,36	42,29	32,94	9,35	0,00	45,52	5,19	0,61
	16,30	6,34	30,35	25,21	5,14	0,00	55,43	4,93	0,52
	19,30	6,62	14,34	14,34	0,00	0,00	51,10	5,69	0,58
	23,25	6,83	0,00	0,00	0,00	0,00	59,06	5,68	0,57
	27,08	6,44	0,00	0,00	0,00	0,00	62,94	5,68	0,56

Tabela 17. Valores experimentais das concentrações do substrato, produtos e células durante o processo fermentativo do HE+PEOX 7 % com melaço



Figura 22. Dados experimentais da fermentação do sistema HE+PA 3 % com melaço, a 30, 32, 34 e 36 °C. Símbolos fazem referência a concentração de: (o) Substrato (s); (■) Células (X); (□) Etanol (P) e (▲) Glicerol; _____ ajuste linha sigmóide



Figura 23. Dados experimentais da fermentação do sistema HE+PA 8 % com melaço, a 30, 32, 34 e 36 °C. Símbolos fazem referência a concentração de: (o) Substrato (s); (■) Células (X); (□) Etanol (P) e (▲) Glicerol; _____ ajuste linha sigmóide



Figura 24. Dados experimentais da fermentação do sistema HE+PA+NaOH 3 % com melaço, a 30, 32, 34 e 36 °C. Símbolos fazem referência a concentração de: (o) Substrato (s); (■) Células (X); (□) Etanol (P) e (▲) Glicerol; _____ ajuste linha sigmóide



Figura 25. Dados experimentais da fermentação do sistema HE+PA+NaOH 8 % com melaço, a 30, 32, 34 e 36 °C. Símbolos fazem referência a concentração de: (o) Substrato (s); (■) Células (X); (□) Etanol (P) e (▲) Glicerol; _____ ajuste linha sigmóide



Figura 26. Dados experimentais da fermentação do sistema HE+PEOX 7 % com melaço, a 30, 32, 34 e 36 °C. Símbolos fazem referência a concentração de: (o) Substrato (s); (■) Células (X); (□) Etanol (P) e (▲) Glicerol; _____ ajuste linha sigmoide

Inicialmente, a Tabela 18 expõe, resumidamente, as principais variáveis do processo fermentativo. Observam-se os valores das concentrações iniciais de substrato (132,5 g/L e 191,48 g/L, valor mín. e máx.) e células (1,33 g/L e 5,2 g/L, valor mín. e máx.), os valores da concentração final de etanol (59,14 g/L e 99,24 g/L, valor mín. e máx.), glicerol (4,84 g/L e 7,94 g/L, valor mín. e máx.) e ácido acético (0,25 g/L e 1,095 g/L, valor mín. e máx.). Adicionalmente, a viabilidade foi determinada para realizar um seguimento da viabilidade das células durante o processo. Nota-se que todos os valores estão acima de 92 %, demostrando uma baixa morte celular no processo. Altas viabilidades indicam uma boa adaptação da levedura à matriz dos substratos, devido a baixas concentrações celulares e uma adequada quantidade de nutrientes e pouco estresse sofrido pela levedura.

Ainda na Tabela 18 os valores dos rendimentos das fermentações são reportados baseados no rendimento teórico, e todos os resultados estão na faixa de 79 % a 99,64 %. A fermentação do **HE+PA+NaOH** 3 % com melaço teve uma produção de etanol de 77,25 g/L (34 °C), apresentando o menor rendimento. A fermentação **HE+PA** 3 % com melaço teve uma produção de 67,67 g/L (36 °C), apresentando o maior rendimento. Martins et al. (2015) reportou uma produção de etanol de 26 g/L (84,48 \pm 0.65 % de rendimento), 24 g/L (79.30 \pm 0.34 % de rendimento) e 18 g/L (70.28 \pm 0.46% de rendimento) para as fermentações dos hidrolisados enzimáticos decorrentes dos prétratamentos: peróxido de hidrogênio alcalino (AHP), ácido diluído e peróxido de hipoclorito de hidrogênio (Ox-B), respectivamente. Portanto, pode-se afirmar que no trabalho desenvolvido, usando a mistura do hidrolisado com o melaço, afere-se uma produção de etanol três vezes maior e com altos rendimentos, quando comparado com a rota bioquímica de MARTINS *et al.* (2015). Consequentemente, podemos salientar que esta integração dos processos de pré-tratamento químico/celulase fúngica.

Tabela 18	. Compilação d	dos valores de	e concentração d	lo substrato inic	al, célula	s iniciais	, etanol final,	glicerol final,	ácido acético f	inal, Y _{P/ART}	, rendimento e
viabilidad	e para todas as	fermentações									

Fermentação da		So	Xo	Etanol final	Glicerol Final	A. Acético	V	Rendimento	Viabilidade
mistura	T (*-C)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	$\Upsilon_{P/ART}$ (g _{etanol} /g _{art})	% *	%
	30	166,9	1,3	77,98	5,75	0,5	0,47	92,35	98,63
	32	194,2	1,9	99,24	7,02	0,86	0,51	100	97,21
HE+PA 8_%+ melaço	34	169,8	1,4	73,41	5,88	0,49	0,43	84,9	98,91
	36	161,9	1,8	80,61	4,84	0,53	0,49	96,18	98,67
	30	157,7	2,9	80,26	7,54	0,58	0,406	91,12	96,27
	32	138,6	2,5	72,86	7,15	0,87	0,486	95,09	94,64
HE+PA 3_% +melaço	34	132,5	2,9	74,82	7,03	0,25	0,5	97,87	97,63
	36	132,9	3,4	69,98	6,32	0,46	0,51	99,64	92,49
	30	177,6	5,2	78,19	7,73	0,67	0,439	85,94	99
HE+PA+NaOH 3 % +	32	179,5	3,5	78,97	7,81	0,63	0,443	86,60	96,75
melaço	34	188,1	3,73	77,25	7,94	0,85	0,404	79,12	97,88
	36	187,6	5,2	80,56	7,24	0,67	0,438	85,63	99
	30	182,8	3,2	75,38	7,39	0,66	0,43	84,12	98,65
HE+PA+NaOH 8 %	32	184,6	3,2	76,11	7,52	1,09	0,406	79,46	96,6
+melaço	34	182,9	4,0	80,8	7,67	0,95	0,442	86,57	99,06
	36	191,0	4,9	78,56	6,99	0,69	0,408	79,86	93,15
	30	149,5	2,6	68,38	5,61	0,51	0,421	82,33	99
HE+PEOX 7 %	32	141,3	2,8	59,14	5,92	0,69	0,422	82,65	99
+melaço	34	150,6	2,7	72,49	5,71	0,55	0,465	91,02	99
	36	149,3	3,0	62,94	5,69	0,56	0,408	79,96	99

Rendimento baseado no valor de 0,511 (100 % de rendimento) de uma fermentação teórica.

3.8. Conclusões

Os concentrações dos hidrolisados enzimáticos produzidos apresentam valores apropiados de glicose (31,70 g/L para HE+PA 8 %; 8,35 g/L para HE+PA 3 %; 26,01 g/L para HE+PA+NaOH 8 %; e 8,10 g/L para HE+PA+NaOH 3 %), quando comparados com 34,54 g/L e 12,67 g/L no HE+PA 8 % e HE+PA 3 %, respectivamente, valores apresentados no trabalho de PLAZAS (2015) e a concentração de 34 g/L para o **HE+PA+NaOH** 8 % apresentado no trabalho de SAVIOLI (2015). A concentração da glicose diminuiu, dado que o processo não utilizou biocidas. Portanto, os açúcares liberados ficaram accessíveis a outros microrganismos durante o processo. No entanto, as biomassas **PA** e **PA+NaOH** produzidas possuem um alto potencial de hidrólise enzimática (**HE**) da celulose à glicose, e posterior produção de etanol de segunda geração, e para processo de segunda geração ligado com a primeira geração.

Em relação às fermentações realizadas, constatou-se que a configuração: reator-sensores-*Biocommand* (*Software* de aquisição de dados) – analisador de gases, foi adequada para o projeto, Apêndice B. Foi necessário um aperfeiçoamento no tempo de amostragem, nas configurações inicias e no correto uso dos equipamentos. Assim, as fermentações foram realizadas de maneira bem-sucedida para a amostragem *online* e *offline* no processo.

Considerando os resultados obtidos na avaliação da produção de etanol na fermentação, a partir do **HE+PA 3** % com melaço, **HE+PA 8** % com melaço, **HE+PA+NaOH 3** % com melaço e **HE+PA+NaOH 8** % com melaço, junto com a mistura de **HE+PEOX 7** % com melaço, pode-se concluir que as concentrações médias de etanol foram consideradas ideais, sendo de 82,81 g/L, 74,48 g/L, 78,74 g/L, 77,71 g/L e 65,74 g/L, respectivamente, levando em consideração que foram 4 fermentações do tipo segunda geração ligado ao processo de primeira geração, superando as produções da fermentação de segunda geração, como o caso descrito por MARTINS *et al.* (2015). A contribuição do melaço (entenda-se melaço brasileiro, não esgotado e de pureza comparativamente alta) tem um impacto muito positivo na fermentação, decorrente do aporte de sais minerais críticas ao fermento. No trabalho de Yamakawa (2016) comprova que os hidrolisados são deficientes em nutrientes minerais e o melaço complementa o meio.

Verificou-se nos resultados das fermentações o altíssimo potencial para produção de etanol dos açúcares celulósicos, gerados do hidrolisado enzimático, enriquecido com melaço. Este processo não tinha sido testado em escala de reator como o utilizado neste trabalho. Neste processo, a levedura conseguiu superar os inibidores gerados nas etapas de pré-tratamento e

hidrólise enzimática, aumentando concentração de células, consumindo todos os açúcares fermentescíveis e produzindo etanol.

Tendo finalizado com êxito toda a etapa do estudo cinético, o seguinte passo é o desenvolvimento dos modelos determinísticos e modelos entrada-saída, e os controladores baseados nas redes neurais.

Referências Bibliográficas

JAIN, V. K., DIVOL, B., PRIOR, B. A., BAUER, F. F. Elimination of glycerol and replacement with alternative products in ethanol fermentation by Saccharomyces cerevisiae." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **38**(9): 1427-1435. 2011

MARTINS, L. H. DA S., RABELO, S. C. AND COSTA, A. C. DA. Effects of the pretreatment method on high solids enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of the cellulosic fraction of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology* **191**: 312-321, 2015.

PLAZAS, L. Modelagem e avaliação de diferentes cenários operacionais dos processos de pré-tratamento, hidrólise e fermentação para produção de etanol 2G. Post-Doutorado, Universidade Estadual de Campinas. 2015.

RABELO, S. C. Avaliação e otimização de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açucar para a produção de etanol de segunda geração. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas. 2010.

RABELO, S. C., AMEZQUITA FONSECA, N. A., ANDRADE, R. R., MACIEL FILHO, R. COSTA, A. C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. Biomass and Bioenergy **35**(7): 2600-2607. 2011.

SAVIOLI, E. *Cinética, estudo e avaliação do processo de deslignificação do bagasso de canade-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico diluído*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidad Estadual de Campinas, 2015. Dissertação (Mestrado).

YAMAKAWA, C. Avaliação da fermentação alcoólica com reciclo de células de hidrolisado celulósico de bagaço de cana-de-açúcar em unidade integrada e autônoma. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas. 2010.

CAPÍTULO 4

MODELAGEM DO PROCESSO FERMENTATIVO

4. MODELAGEM DO PROCESSO FERMENTATIVO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um estudo cinético baseado em modelos nãoestruturados e não-segregados para a fermentação de etanol, a partir de hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana enriquecido com melaço, mistura que resultou da integração de produtos de primeira e segunda geração.

4.1. Generalidades do Processo

O consumo energético tem aumentado ao longo dos anos, e o uso de alternativas de produção de energia a partir de outras fontes tem sido estudado para suprir essas demandas. A produção de biocombustíveis de primeira geração (1G), tais como: etanol de cana-de-açúcar no Brasil, o etanol de milho nos Estados Unidos, o biodiesel da oleaginosa colza na Alemanha e o óleo de palma na Malásia, é caracterizada por mercados comerciais bem estabelecidos e tecnologias bem compreendidos (SIMS *et al.*, 2008). A utilização de energias renováveis está em aumento e pode conduzir à diminuição das emissões de gases que geram o efeito estufa (MENEGOL *et al.*, 2016).

Desta forma, a biomassa lignocelulósica, composta principalmente de celulose, hemicelulose, lignina, extrativos e cinzas, é uma abundante fonte de matéria-prima que pode ser transformada em produtos e energia (MENEGOL *et al.*, 2016).

O processo de obtenção de etanol lignocelulósico, usando a rota bioquímica, está baseado na produção-adição de enzimas, no pré-tratamento para alterar a composição do bagaço de cana-de-açúcar, tornando-o mais acessível, na hidrólise enzimática. Nesse processo variedades de enzimas quebram a matriz celulósica em açúcares e, finalmente, ocorre a fermentação alcoólica, usando microrganismos, principalmente a *S. cerevisiae* na indústria (MENEGOL *et al.*, 2016).

Nas últimas décadas de pesquisa e atividades desenvolvidas, os processos de prétratamento e hidrólise enzimática foram projetados para otimizar o processo de fermentação. O desempenho da fermentação depende em grande parte das condições e composição das matérias-primas utilizadas, justamente pela a ação dos microrganismos que transformam os açúcares liberados em metabólitos secundários, como etanol, ácido láctico e outros produtos finais, (CHANDEL *et al.*, 2010).

A indústria sucroalcooleira evoluiu de forma contínua, em termos de produtividade agrícola, produtividade industrial, inserção no inquérito ambiental e integração energética.

No entanto, novas metas tecnológicas estão sendo apresentadas no setor atual, dentro de um contexto mundial. Além disso, o carácter inovador inclui o desenvolvimento de processos para a obtenção de etanol de segunda geração (2G), integrado nos processos de etanol primeira geração (1G). Além disso, o acoplamento do processo de produção de etanol 2G com a de 1G é considerado uma tecnologia viável no Brasil (PEREIRA *et al.*, 2015).

Os modelos cinéticos são uma ferramenta necessária para prever os fenômenos físicos em muitos campos da engenharia e da ciência (WANG, 2001). Estes são importantes por fornecerem a base para o desenho, controle e otimização do processo, visando atingir configurações eficientes e ótimas para a produção em larga escala.

Vários tipos de modelos cinéticos foram propostos para descrever os comportamentos dinâmicos na produção de etanol de primeira geração. Diferentes pesquisas estimaram os parâmetros da cinética de fermentação, considerando os efeitos da temperatura (ATALA *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2007). Além disso, vários pesquisadores avaliaram a cinética de fermentação considerando substrato e produtos de efeitos (ATALA *et al.*, 2001; ANDRADE. *et al.*, 2007; JARZĘBSKI, 1992), por outro lado, os modelos cinéticos da produção de etanol de segunda geração foram propostos levando em consideração a cinética adicional aos efeitos do inibidor e co-produtos relacionados ao pré-tratamento e processo de hidrólise enzimática (GHOSE & TYAGI, 1979; SCHNEIDERMAN, *et al.*, 2015). Vários fatores afetam esta cinética da produção de etanol a partir de bagaço de cana hidrolisado: concentração inicial de açúcar, pH e a presença de inibidor (ANDRADE *et al.*,2013; MARTINS *et al.*, 2015). Assim, a realização de estudos na modelagem cinética é necessária, levando em consideração as variações do processo, variações da cana-de-açúcar, pré-tratamento do bagaço e hidrólise enzimática.

Estudos mais recentes sugerem que a integração dos processos de produção de etanol de primeira geração com a segunda geração deve ser realizada, a fim de atingir melhores resultado econômico (DIAS *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2015).

4.2. Modelagem Matemática do Processo Fermentativo

A modelagem matemática do processo de fermentação é realizada por meio de métodos adotados para: o tratamento de dados; determinação de velocidades específicas; estimativa de parâmetros cinéticos; avaliação da qualidade dos parâmetros; e, o efeito da temperatura nos parâmetros. Dessa maneira, as metodologias e os resultados da modelagem para o processo de 1G+2G são apresentados a seguir. O desenvolvimento do modelo matemático deste trabalho

foi realizado em colaboração com o projeto de pós-doutorado de PLAZAS (2015), intitulado como *Modelagem e avaliação de diferentes cenários operacionais dos processos de prétratamento, hidrólise e fermentação para a produção de etanol 2G* (FAPESP N° 2012/10857-3).

A partir desse momento, para facilitar a forma de nomear os diferentes sistemas de fermentação, considera-se as condições de desenvolvimento dos hidrolisados enzimáticos:

Sistema H1: Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H_2SO_4 e submetido ao processo de hidrólise enzimática com uma carga de sólidos de 8,0 % nesta última etapa (**HE+PA 8**%).

Sistema H2: Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com H_2SO_4 e submetido ao processo de hidrólise enzimática com uma carga de sólidos de 3,0 % nesta última etapa (**HE+PA 3%**).

Sistema H3: Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado ácido H_2SO_4 e deslignificado com NaOH (20 % de carga de sólidos, 90 min, 0,5 % m/v NaOH e 80 °C) e em seguida submetido ao processo de hidrólise enzimática com uma carga de sólidos de 8,0 % nesta última etapa, (**HE+PA+NaOH** – 8 % m/v).

Sistema H4: Bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado ácido H_2SO_4 e deslignificado com NaOH (20 % de carga de sólidos, 90 min, 0,5 % m/v NaOH e 80 °C) e em seguida submetido ao processo de hidrólise enzimática com uma carga de sólidos de 3,0 % nesta última etapa, (**HE+PA+NaOH** – 3 % m/v).

Sistema H5: Bagaço de cana-de-açúcar com peróxido de hidrogênio (**HE+PEOX** a 7 % m/v, em base seca)

4.2.1. Ajuste de Dados Experimentais

Inicialmente, para ajustar os dados experimentais aos modelos cinéticos é importante realizar uma revisão e limpeza dos dados coletados experimentalmente, especificamente em relação aos pontos que encontram-se fora da curva cinética (erros de medição).

Posteriormente, os dados coletados de concentrações de células, substrato e produtos, nas fermentações das Misturas de **H1** com melaço, **H2** com Melaço, **H3** com Melaço, **H4** com Melaço e **H5** com Melaço são ajustados à curva sigmoide *Boltzman*, Eq (92), com o programa *OriginPro 8.0*.

$$C = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{t - t_0}{\Delta t}}} + A_2$$
(92)

No qual:

C = Concentração de Substrato (S), etanol (P) e de Células (X)

 A_1 = Limite superior da curva C(t);

 A_2 = Limite inferior da curva C(t);

 $t_0 = Posição em t em que a inclinação é máxima;$

 Δt = Largura do passo de uma diminuição exponencial.

Então, a equação C representa a concentração de substrato (S), etanol (P) e células (X), que está em função dos parâmetros referidos acima. A obtenção dos parâmetros foi realizada por meio da aplicação do método *Levenberg-Marquardt* (*software OriginPro 8.0*) sobre os dados experimentais (as concentrações de substrato (S), etanol (P) e células (X)), apresentados no **Capítulo 3**.

As novas funções são utilizadas para a geração de dados e representação dos valores experimentais durante a etapa de otimização.

4.2.2. Determinação das Velocidades Instantânea e Específica

As equações (1)-(3) definem as velocidades instantâneas: r_s é a velocidade instantânea no consumo de substrato; r_p é a velocidade instantânea de produção de etanol; e r_x é a velocidade instantânea do crescimento celular.

As velocidades específicas (μ) de transformação celular, do substrato e do produto (Eq (12) - (14) ficam definidas como a velocidade instantânea, r, dividida pela concentração de células (X) em cada instante.

O cálculo da velocidade instantânea e específica, a partir dos dados experimentais, foi feito usando o método geométrico de cálculo de derivadas proposto por LEDUY E ZAJIC (1973), conforme descrito em SCHMIDELL ET AL. (2001), realizado em Microsoft Excel.

4.2.3. Estimativa dos Parâmetros Cinéticos

A estimativa de parâmetros foi realizada para os dados experimentais descritos no Capítulo 3, com o modelo matemático global constituído por três equações diferenciais ordinárias, as quais representam o balanço de massa de substrato (S), etanol (P) e células (X), junto a um valor especificado (problema de valor inicial) e um modelo cinético, com 6 parâmetros cinéticos ajustáveis: μ_{max_i} , K_{s_i} , K_{l_i} , r, P_{max_i} , X_{max} .

Nesse trabalho o modelo cinético utilizado está representado na equação (93) para a estimativa da velocidade específica do crescimento microbiano nas simulações do processo.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_I}} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^r \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)^n$$
(93)

Na qual:

 μ : velocidade específica de crescimento;

 μ_{max} : velocidade específica máxima de crescimento;

S : concentração de substrato limitante;

 K_s : constante de Monod que depende do microrganismo e das condições de cultura;

K_i : constante de inibição por substrato;

P_{max}: concentração limite do produto inibidor;

X_{max} : concentração limite das células;

r: constante do termo de inibição pelo produto.

O modelo foi selecionado por considerar o termo de inibição pelo produto e limitação pelo substrato e pela concentração celular.

Os parâmetros ajustáveis do modelo foram determinados utilizando a sub-rotina do algoritmo genético *PIKAIA*, que é uma sub-rotina de otimização desenvolvida por *High Altitude Observatory* e está disponível para domínio público (METCALFE e CHARBONNEAU, 2003).

A estratégia para calcular os valores dos parâmetros é feita por meio de otimização, minimização do erro gerado entre os dados simulados e dados experimentais por meio da função objetivo (Eq.(94)).

$$F_{s}(\theta) = \sum_{i}^{nep} \sum_{j}^{nsp} (error)^{2}$$
⁽⁹⁴⁾

Na qual, *nep* é o número de perfis experimentais e *nsp* é o número de pontos experimentais.

O error é definido como:

$$error = \frac{C_{j,i}^{\text{Predita}} - C_{j,i}^{\text{Experiemtnal}}}{S_i^{Ult}}$$
(95)

A Tabela 19 apresenta os parâmetros genéticos selecionados no algoritmo genético *PIKAIA*, baseado no *User's Guide*.

Tabela 19. Parâmetros do algoritmo genético PIKAIA

Opção escolhida	Parâmetros	Valor
Elitismo,	Número de segmentos do cromossomo	9
modo de mutação: variável,	Tamanho da população	100
plano de reprodução: substituição	Probabilidade do crossover	0,85d
geracional completa	Taxa inicial de mutação	0,005
	Mínima taxa de mutação	0,0005
	Máxima taxa de mutação	0,25

4.2.4. Avaliação da Qualidade dos Parâmetros Estimados

Na avaliação da qualidade da estimativa dos parâmetros ajustados do modelo de fermentação o desvio padrão residual (RSD) Eq. (96) foi utilizado, e para a qualidade da predição do modelo foi usado o coeficiente de correlação (COR (%)) Eq. (98) foi empregado, conforme descrito em MANTOVANELLI et al. (2007).

$$RSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (y_i - y_{pi})^2}{n}}$$
(96)

$$RSD = \frac{RSD}{\overline{y_i}} \times 100$$
⁽⁹⁷⁾

$$COR(\%) = \left(1 - \frac{SEE}{S_{TT}}\right) \times 100$$
⁽⁹⁸⁾

$$SEE = \sum_{i=1}^{n} (y_i - y_{pi})^2$$
⁽⁹⁹⁾

$$S_{TT} = \sum_{i=1}^{n} (y_i - \bar{y}_i)^2$$
(100)

4.2.5. Efeito da Temperatura nos Parâmetros Cinéticos

A temperatura influência nos processos fermentativos de forma significativa, uma vez que estes processos envolvem uma série de reações químicas em equilíbrio. As fermentações realizadas em menores temperaturas necessitam de um tempo maior em comparação às fermentações conduzidas sob temperaturas superiores.

A *S. cerevisiae* enfrenta uma série de fatores que produzem um estresse durante a produção de etanol. A manutenção de uma temperatura ideal durante o processo de fermentação é uma tarefa difícil, a qual as usinas de etanol enfrentam devido as condições do processo e as variações do clima. A faixa de temperatura ideal para a levedura durante o processo fermentativo é entre 32 °C e 35°C.

Nesse trabalho o modelo cinético Eq. (93) foi utilizado para a estimativa da velocidade específica do crescimento microbiano nas simulações do processo. Este modelo refere-se ao tipo não estruturado no qual os parâmetros das equações estão em função da temperatura. Trabalhos como ATALA *et al.*, (2001), e ANDRADE *et al.* (2013) também utilizam modelos não estruturados e com parâmetros dependentes da temperatura. O modelo cinético Eq. (93) pode ser definido em função da temperatura para verificar o efeito na cinética da fermentação alcoólica. A faixa de temperatura em que os experimentos foram realizados é entre 30 a 36 °C.

Os parâmetros cinéticos obtidos $\mu_{max}(T)$, $K_s(T)$, $K_I(T)$, r(T), $P_{max}(T)$, $X_{max}(T)$, no qual o procedimento foi descrito anteriormente, são ajustados por meio de função exponencial da temperatura definida por *Arrhenius*, corrigida conforme apresentado na Eq.(101)

$$P(T) = \exp(A)\exp\left(\frac{B}{T}\right)\exp(CT)$$
⁽¹⁰¹⁾

Na qual, P(T) representa os parâmetros $\mu_{max}(T)$, $K_s(T)$, $K_I(T)$, r(T), $P_{max}(T)$, $X_{max}(T)$; A, B e C são os parâmetros ajustáveis para cada um dos parâmetros descritos anteriormente.

Posteriormente, os parâmetros estequiométricos, $Y_{X/S}$, e $Y_{X/P}$, foram representados por meio de uma função exponencial da temperatura, conforme apresentado na Eq. (102)

$$Y_{j}(T) = \exp(D)\exp(ET^{3})\exp(F\exp(T))$$
(102)

Na qual, $Y_j(T)$ representa os parâmetros estequiométricos, $Y_{X/S}$, $Y_{X/P}$, $Y_{P/S}$; D, $E \in F$ são as constantes ajustáveis para cada um dos parâmetros estequiométricos mencionados.

O Método de Integração Numérica de Runge-Kutta-Fehlberg (RKF45)

O método de integração de Runge-Kutta-Fehlberg é um algoritmo numérico de análise numérico para a resolução numérica de equações diferencias ordinárias com o formato genérico da Eq, (103).

$$\frac{du_i}{dt} = f(t, u_1, u_2, \dots, u_{neq})$$
(103)

Na qual:

u, disponível para um determinado tempo;

neq, corresponde à dimensão do vetor solução, t.

O método de integração RKF45 usa um método de integração de sistemas de equações diferenciais ordinárias do tipo *Runge-Kutta (RK)*, apresentado por FEHLBERG (1969) *apud* DE BRITO (2010) e, assim, é chamado de método de *Runge-Kutta-Fehlberg* ou quarta-quinta ordem. Esse método tem um procedimento para determinar se o tamanho do passo h que está sendo usado é adequado. O esquema baseia-se na comparação entre os resultados obtidos pela implementação dos métodos *Runge-Kutta* (de quarta e quinta ordem, respectivamente) como forma de realizar a estimativa de uma medida do erro, que possibilite um controle do passo de iteração. Se as duas respostas coincidem, a aproximação é aceita, caso contrário, se realiza uma variação do tamanho do passo h é realizada (DE BRITO, 2010).

Cada passo requer o uso dos seguintes 6 valores:

$$k_1 = hf(t_i, u_1) \tag{104}$$

$$k_2 = hf(t_i + \frac{1}{4}h, u_1 + \frac{1}{4}k_1)$$
(105)

$$k_3 = hf(t_i + \frac{3}{8}h, u_1 + \frac{3}{32}k_1 + \frac{9}{32}k_2)$$
(106)

$$k_4 = hf(t_i + \frac{12}{13}h, u_1 + \frac{1932}{2197}k_1 + \frac{7200}{2197}k_2 + \frac{7296}{2197}k_2)$$
(107)

$$k_5 = hf(t_i + h, u_1 + \frac{439}{216}k_1 - 8k_2 + \frac{3680}{513}k_3 - \frac{845}{4104}k_4)$$
(108)

$$k_{5} = hf(t_{i} + \frac{1}{2}h, u_{1} - \frac{8}{27}k_{1} + 2k_{2} - \frac{3544}{2565}k_{3} + \frac{1859}{4104}k_{4} - \frac{11}{40}k_{4})$$
(109)

Nas quais, h corresponde ao passo de integração. Para o mesmo h, aplicam-se os parâmetros k_i na avaliação de uma aproximação à solução por meio de um método *RK* de quarta ordem (DE BRITO, 2010):

$$u_{i+1}^{4} = u_{i} + \frac{25}{216}k_{i} + \frac{1408}{2565}k_{3} + \frac{2197}{4104}k_{4} - \frac{1}{5}k_{5}$$
(110)

E de um esquema *RK* de quinta ordem:

$$u_{i+1}^{5} = u_{i} + \frac{16}{135}k_{i} + \frac{6656}{12825}k_{3} + \frac{28561}{56430}k_{4} - \frac{9}{50}k_{5} + \frac{2}{55}k_{6}$$
(111)

Se os dois valores anteriores se compararem em um determinado nível de precisão, a solução obtida é aceita. No entanto, se a diferença calculada não verifica o critério de convergência pré-estabelecido, o passo é diminuído. Finalmente, se a concordância exceder um número de dígitos significativos para além da precisão requerida, o passo de integração é aumentado (DE BRITO, 2010).

Assim, um passo ótimo, *sh*, é determinado pela multiplicação do escalar *s* com o passo atual, *h*, e *s* é dado pela Eq. (112), ε é a tolerância para a avaliação do erro.(DE BRITO, 2010):

$$s = \left(\frac{\varepsilon h}{2|u_{i+1}^5 - u_{i+1}^4|}\right)^{\frac{1}{4}}$$
(112)

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Ajuste dos Dados e Determinação das Velocidades Específicas

O ajuste da função de *Boltzman* (sigmóide) Eq. (92) foi realizado com base nos dados experimentais do Capítulo 3 (Tabela 13 – Tabela 17), utilizando o software *Origin* 8 SR0 v.80724. Esta função foi escolhida para o ajuste dos dados experimentais por ser simples e apresentar um bom ajuste dos dados.

Usando o método de *Levenberg-Marquardt*, os parâmetros A_1 , A_2 , t_0 e Δt foram determinados sobre os dados experimentais das misturas de **HE+PA** com Melaço, **HE+PA+NaOH** com Melaço, e **HE+PEOX** 7% com melaço. As Tabela 20 – Tabela 22 demonstram os valores desses parâmetros. Dessa maneira, a função C(t) representa a concentração de substrato (S), etanol (P) e células (X) em relação ao tempo *t* para todos os estudos de caso nas diferentes temperaturas que as fermentações foram realizadas.

Nos resultados dos ajustes observa-se que os coeficientes de determinação (R²) obtidos são superiores a 0,91, indicando um bom ajuste das curvas sigmóides em relação a todos os valores observados ou dados experimentais.

Ao realizar uma análise dos parâmetros, observa-se que o A₂ está relacionado com concentração inicial dos componentes, A₁ é o limite superior da função, e t_o corresponde ao ponto médio da curva. Finalmente, o parâmetro Δt estabelece a largura da parte mais íngreme da função.

Coeficient	te Eq. (92)	I	A1	Α	2		t_0	4	Δt	Parâmetros estatís	sticos
Sistema	T (°C)	Valor	desvio	Valor	desvio	Valor	desvio	Valor	desvio	chi-cuadrado reducido	\mathbb{R}^2
H1+melaço	30	185,3842	43,0887	-5,6589	18,0709	10,1426	2,9331	6,0409	2,6776	115,3774	0,9713
	32	256,7760	23,5575	-2,6283	5,2684	11,4793	1,7401	9,1180	1,1788	16,9399	0,9969
	34	232,9204	25,5868	-9,3142	5,2767	5,1642	1,0751	5,1004	0,7301	7,2746	0,9986
	36	212,4185	22,0649	-4,2339	3,4535	5,3883	1,0421	4,7554	0,6283	12,5083	0,9968
H2+melaço	30	172,9064	9,2989	-0,2886	4,9162	8,1539	0,4690	3,4303	0,4628	17,8937	0,9953
	32	190,8321	36,8271	-11,7317	8,9899	5,1278	1,7441	5,0906	1,2709	16,6929	0,9937
	34	167,7820	14,4272	-7,7567	5,1537	5,7508	0,6419	4,0700	0,5903	6,4403	0,9976
	36	157,9589	8,7612	-3,6391	3,5857	6,1737	0,4055	3,5431	0,3879	5,1975	0,9981
H3+melaço	30	285,4269	81,1896	3,7353	10,2438	3,5713	3,2934	5,8480	1,6516	37,7691	0,9904
	32	257,1156	26,2779	1,2127	3,4967	4,3125	0,9785	4,4818	0,5247	11,8792	0,9973
	34	245,9880	11,8871	-1,6385	1,8892	4,8712	0,4599	4,4922	0,2654	3,3225	0,9993
	36	462,9932	517,7420	-0,9770	16,5769	-1,9121	11,5692	5,8166	3,0784	77,3901	0,9837
H4+melaço	30	219,6375	15,9766	-0,8768	4,3900	6,8463	0,7068	4,5393	0,5383	13,7594	0,9968
	32	241,1215	26,1054	5,4690	4,3286	5,0762	1,1078	4,7454	0,6549	14,4349	0,9964
	34	318,9908	27,2658	-8,0538	2,6135	2,1761	0,8584	5,3220	0,3838	2,0665	0,9996
	36	662,3149	264,1432	-9,3380	4,0426	-5,8498	4,2473	6,6568	0,8025	2,8435	0,9993
H5+melaço	30	547,0119	1098,0917	-34,65592	36,6338	-13,2971	52,1494	16,6580	12,7682	31,0095	0,9875
	32	3528,224	511173,29	-683,2078	24608,55	-134,280	18735,046	95,374	5086,366	21,34813	0,99009
	34	10958,377	574159,18	-43,67704	49,16733	-77,93812	1103,36309	19,370	19,886	17,58781	0,994
	36	188,13432	14,51861	-12,27048	4,74523	8,35923	0,84835	6,06208	0,70752	7,59558	0,99725

Tabela 20. Parâmetros estimados da Eq. (92) para a concentração de açúcares (S), (g/L) em função do tempo *t*, para os sistemas H1+melaço, H2+melaço, H3+melaço, H4+melaço e H5+melaço, nas diferentes temperaturas do processo fermentativo

Coeficien	te Eq. (92)	A_{I}	,	A	2	1	to	2	1 <i>t</i>	Parâmetros estatísti	icos
Sistema	T (°C)	Valor	desvio	Valor	desvio	Valor	desvio	Valor	desvio	chi-cuadrado reducido	\mathbb{R}^2
H1+melaço	30	-0,0786	1,1073	8,8404	0,3046	8,1127	1,4169	4,9150	1,1035	0,0789	0,9918
	32	1,1472	0,4622	7,9155	0,1198	10,1267	0,9759	4,1891	0,5927	0,0539	0,9921
	34	1,1807	0,4642	7,7734	0,1492	5,7197	0,4177	2,0080	0,5149	0,0459	0,9945
	36	1,8242	0,2053	7,2230	0,1223	6,6758	0,2838	1,0614	0,1885	0,0701	0,9886
H2+melaço	30	-0,1144	1,7424	11,6700	0,3074	4,5110	1,2874	4,1560	0,8019	0,0634	0,9939
	32	0,6792	1,2571	10,8452	0,2631	4,9960	0,9430	3,2691	0,6475	0,0870	0,9914
	34	-2342,4677	1246530	13,0148	5,2020	-53,9207	5388,7059	9,9116	23,3438	0,3523	0,9638
	36	2,5166	0,8293	10,4423	0,1876	3,9832	0,5549	1,9742	0,4415	0,0864	0,9891
H3+melaço	30	1,3971	0,6505	12,2600	0,1168	5,1902	0,4789	3,2788	0,3071	0,0289	0,9975
	32	0,2400	1,2388	10,9226	0,1277	3,6004	0,9508	3,6843	0,4687	0,0300	0,9962
	34	3,2303	0,3442	11,2084	0,0835	5,2404	0,2835	2,3349	0,2174	0,0241	0,9970
	36	-29,6569	30,1837	87,1386	9,8777	6,2364	2,6027	5,9930	2,4025	8,3992	0,9903
H4+melaço	30	2,5669	2,6540	14,5214	0,7368	6,8717	2,2258	4,8050	1,7040	0,3128	0,9743
	32	2,5585	1,0080	12,6357	0,2466	5,5014	0,6982	2,4029	0,5199	0,2034	0,9839
	34	0,6031	7,2203	11,7020	0,5801	2,5964	4,2842	2,9004	1,9555	0,8014	0,9105
	36	1,9733	3,8497	14,9007	1,3304	6,5558	2,8453	5,2671	2,5523	0,3084	0,9744
H5+melaço	30	1,01054	2,25938	6,63153	0,16897	4,0634	4,07772	4,48834	1,76002	0,09526	0,94978
	32	-27,8826	611,6021	9,1790	10,8549	-32,75666	533,4073	21,0789	95,0526	0,04316	0,97421
	34	1,82358	0,47054	6,44709	0,08795	6,87011	1,02879	4,29771	0,67897	0,01671	0,99267
	36	2,26125	0,91764	6,73463	0,18391	6,19034	2,02261	4,2995	1,25772	0,04752	0,97123

Tabela 21. Parâmetros estimados da Eq. (92) para a concentração de células (X), (g/L) em função do tempo *t*, para os sistemas H1+melaço, H2+melaço, H3+melaço, H4+melaço e H5+melaço, nas diferentes temperaturas do processo fermentativo

Coeficient	te Eq. (92)		A_{I}	A	2		t_0	2	1 <i>t</i>	Parâmetros estatí	ísticos
Sistema	T(°C)	Valor	Desvio	Valor	Desvio	Valor	Desvio	Valor	Desvio	chi-cuadrado reducido	\mathbb{R}^2
H1+melaço	30	-0,1243	5,6705	79,5779	3,4706	11,2018	0,9494	4,0125	0,9004	12,4054	0,9883
	32	-23,1656	7,0347	100,9248	1,6576	11,8682	1,0143	7,8354	0,6980	2,7913	0,9981
	34	-2,3776	3,1532	75,6875	1,8027	7,1640	0,3659	2,1991	0,3628	5,4524	0,9957
	36	-20,9555	17,5236	79,0027	3,2134	5,9605	1,7489	4,5499	1,1557	11,5537	0,9876
H2+melaço	30	-3625,4850	126728,5490	80,3460	10,6971	-36,7659	361,0483	9,6352	6,7981	4,6173	0,9925
	32	-11,2601	5,5297	71,2680	1,9543	6,6521	0,5474	3,6742	0,4866	2,5176	0,9965
	34	-11,1541	6,1048	69,7581	2,2880	5,9565	0,5626	3,5924	0,5262	2,0596	0,9969
	36	-23,3928	15,3094	76,8919	5,3911	5,4786	1,2938	4,8420	1,1776	3,3501	0,9952
H3+melaço	30	-17,6620	15,5756	85,0265	7,9927	9,1971	1,5352	5,8876	1,7820	9,9693	0,9878
	32	-20,1673	11,3166	78,8574	2,7819	6,3798	1,1755	5,0681	0,8535	3,6954	0,9951
	34	-32,9137	20,6258	84,1386	3,8306	5,1524	1,9493	5,6164	1,1905	5,3869	0,9937
	36	-197,1039	2072,1751	13,4496	0,3711	-20,9560	74,6048	6,6429	2,1758	0,0322	0,9964
H4+melaço	30	-16,64106	11,48027	86,23156	6,71847	9,82453	1,13627	5,92159	1,39477	6,38797	0,99227
	32	-32,74487	28,29247	82,93383	5,28744	5,18985	2,77335	5,80171	1,70871	9,29419	0,98843
	34	-106,78751	185,62931	89,60691	13,76167	-1,64981	13,65261	8,16938	4,96545	7,1758	0,99081
	36	-124,41485	182,58648	97,59483	17,0665	-2,20787	13,88822	9,73982	5,49893	4,35653	0,9946
H5+melaço	30	-728,22187	16917,8454	89,9579	53,3609	-46,7863	595,52118	21,4723	53,2612	24,36482	0,94874
	32	-97,4179	286,6034	118,2742	131,6757	3,2732	26,9906	18,0356	33,6244	3,50051	0,99135
	34	-6,69448	9,08616	74,8033	3,54368	10,41424	1,27402	5,1626	1,26077	10,21783	0,98721
	36	-14,7188	18,74357	65,14454	5,20851	7,62267	2,78108	6,02986	2,09695	10,32271	0,97587

Tabela 22. Parâmetros estimados da Eq. (92) para a concentração de etanol (P), (g/L) em função do tempo t, para os sistemas H1+melaço, H2+melaço, H3+melaço, H4+melaço e H5+melaço, nas diferentes temperaturas do processo fermentativo

Em relação às velocidades específicas de transformação celular $\mu = \mu(t)$, os resultados oferecem a estrutura para a classificação dos processos de fermentação proposta por GADEM (1955).

As Figuras 27 a 30 apresentam variações das velocidades específicas experimentais para cada um dos sistemas estudados: H1+melaço, H2+melaço, H3+melaço, e H4+melaço.

Dessa forma, a partir das figuras mencionadas, observa-se que as velocidades específicas de consumo de substrato - açúcares (μ_S) e a produção de etanol (μ_P) apresentam perfis similares, mostrando uma relação entre si. A velocidade específica de crescimento (μ_X) do microrganismo apresenta, aproximadamente, a mesma tendência das duas curvas anteriores. Diz-se então que a formação de produto está associada ao crescimento. Estas configurações representam o caso em que o produto ou metabólito primário formado está diretamente ligado às reações de catabolismo ou decomposição do substrato (açúcares) (SCHMIDELL et al., 2001).



Figura 27. Velocidades específicas no processo fermentativo H1+melaço



Figura 28. Velocidades específicas no processo fermentativo H2+melaço



Figura 29. Velocidades específicas no processo fermentativo H3+melaço



Figura 30. Velocidades específicas no processo fermentativo H4+melaço

Tese de Doutorado – William Eduardo Herrera Agudelo

4.3.2. Modelagem Cinética

Inicialmente, com os perfis determinados no subitem 4.2.1 de concentração de etanol, substrato e células, e do volume do fermentador, a formulação do modelo matemático fenomenológico foi realizada para descrever o comportamento das células para executar suas funções vitais, tais como: o crescimento ou morte celular, a geração de produtos e o consumo de substratos. Os modelos foram baseados em modelos reportados na literatura.

Para a realização da modelagem, o modelo fenomenológico (tipo não estruturado e não segregado) foi utilizado, no qual o microrganismo é representado por uma única variável (massa celular). Além disso, as células são consideradas homogêneas, isto é, todas apresentam o mesmo comportamento. O modelo fenomenológico tem como objetivo determinar a velocidade específica de crescimento da levedura (μ_X) em função das condições do meio fermentativo. A produção de etanol está associada ao crescimento celular, e este, por sua vez, com o processo de obtenção de energia das células (metabolismo). Em conclusão, as velocidades de consumo e produção específica estão em função da velocidade específica de crescimento celular (μ_X).

Como explicado no subitem 4.2.3, o modelo matemático foi definido pelas Eqs. (18); (23); (24) e (93) e ajustado com os dados experimentais usando o algoritmo genético de *PIKAIA*, que é uma sub-rotina de otimização desenvolvida por *High Altitude Observatory*.

Como resultado final, a Tabela 23 apresentam os parâmetros cinéticos do modelo proposto para os sistemas H1+melaço, H2+melaço, H3+melaço, H4+melaço e H5+melaço.

		Parâmetros								R^2				RSD (%)	
Sistema	Temperatura (°C)	Y _{X/S}	$Y_{X/P}$	μ_{max}	K_S	X_{max}	P_{max}	K _I	r	C(t) = X(t)	C(t) = P(t)	C(t) = S(t)	C(t) = X(t)	C(t) = P(t)	C(t)=S(t)
		(kg/kg)	(kg/kg)	(h ⁻¹)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	-	C(t) = H(t)	0(1)-1(1)	0(1)-5(1)	C(t) = M(t)	0(1)-1(1)	0(1)-5(1)
H1+melaço	30	0,044837	0,095007	0,4363151	8,599250	65,087109	84,801612	97,980000	0,9947401	0,993	0,985	0,966	6,720	13,003	22,153
	32	0,037500	0,086400	0,4851525	12,975002	74,032150	91,803155	98,463000	0,9364985	0,964	0,852	0,836	12,194	33,930	44,002
	34	0,037468	0,086364	0,4979851	18,376250	83,863800	90,490400	93,730010	0,8050610	0,988	0,996	0,970	7,063	5,303	19,262
	36	0,031095	0,063267	0,4512201	20,685000	85,413900	84,238012	75,651010	0,7604001	0,954	0,978	0,980	13,488	16,346	17,047
H2+melaço	30	0,053983	0,115935	0,330737	12,185667	71,791209	74,686080	93,037000	0,955180	0,969	0,944	0,994	12,299	17,969	9,624
	32	0,057000	0,118000	0,385975	22,583003	56,522000	76,149600	99,960010	0,942230	0,981	0,997	0,994	9,494	4,868	8,116
	34	0,067256	0,134482	0,428880	21,530200	53,767800	77,090412	95,409010	0,967150	0,952	0,997	0,998	9,151	3,136	4,035
	36	0,053020	0,103000	0,391380	13,514250	54,869400	75,020412	66,142000	0,997790	0,925	0,995	0,998	12,800	4,850	5,118
H3+melaço	30	0,053112	0,123555	0,445175	10,595250	85,113909	72,931200	71,319000	0,872220	0,974	0,958	0,981	7,728	16,597	11,331
	32	0,042141	0,103784	0,471344	15,249500	77,459409	75,619200	82,697010	0,898360	0,989	0,966	0,991	4,119	15,726	12,302
	34	0,040415	0,091357	0,488195	16,508500	63,359100	75,130812	85,319010	0,905240	0,991	0,919	0,954	4,395	20,650	23,278
	36	0,044249	0,108419	0,470120	15,521500	57,467700	73,899612	79,266600	0,901340	0,977	0,923	0,980	5,562	24,704	11,745
H4+melaço	30	0,050202	0,114316	0,353400	12,489200	59,293800	80,072412	55,405000	0,872710	0,979	0,978	0,994	4,673	17,416	6,718
	32	0,052099	0,117726	0,391685	19,792003	55,151409	82,208401	80,505010	0,990260	0,911	0,988	0,986	15,474	6,283	12,946
	34	0,042611	0,105391	0,384720	17,278000	46,224009	81,751212	81,457010	0,981090	0,829	0,986	0,982	16,473	7,791	21,079
	36	0,049973	0,114201	0,344565	10,033155	46,988800	78,129612	92,765000	0,979160	0,977	0,989	0,980	5,891	6,756	27,378
H5+melaço	30	0,029	0,066	0,1285100	22,4347500	52,8191090	74,2320000	98,2580000	0,3091800	0,864	0,936	0,967	14,734	14,978	20,253
	32	0,026	0,062	0,1773000	24,1080025	40,5244090	73,2592120	91,5850000	0,4231501	0,953	0,958	0,952	7,629	24,206	30,423
	34	0,025	0,053	0,1941170	24,1710025	30,6886040	69,9231996	88,3050100	0,6481100	0,991	0,979	0,980	4,327	11,654	12,118
	36	0,023	0,055	0,1524900	13,9585000	24,5475000	62,7967992	89,5640100	0,6989400	0,956	0,984	0,999	10,303	6,789	8,915

Tabela 23. Parâmetros cinéticos estimados para os sistemas fermentativos H1+melaço, H2+melaço, H3+melaço, H4+melaço e H5+melaço

Para os sistemas de fermentação com concentração de açúcares redutores totais menores que 170 g/L, observa-se que as velocidades específicas máximas (μ_{max}) de crescimento de *S. cerevisiae* esteve na faixa de 0,33 < μ_{max} (h⁻¹) < 0,49. Para concentrações maiores que 170 g/L, a faixa de (μ_{max}) foi de 0,34 < μ_{max} (h⁻¹) < 0,48. Esses resultados obtidos são consistentes quando comparados aos resultados apresentados por DE SÁ (2012), em que as velocidades específicas máximas de crescimento de *S. cerevisiae* IA1238, nos meios com baixa (50 g/L) e alta (200 g/L) concentração de glicose, estão dentro da faixa de $\mu_{max} = 0,32$ h⁻¹ e $\mu_{max} = 0,46$ h⁻¹ e, respectivamente.

Os valores de K_S e K_I estão consistentes. Segundo REHM E REED (1985), o valor do parâmetro cinético K_S deve corresponder ao valor de S, no qual a velocidade específica de crescimento (μ) deve ser igual à metade do valor máximo, e K_I deve corresponder à concentração de substrato, na qual inicia-se a inibição pelo mesmo. Dessa forma, K_I deve ser maior que K_S , conforme os parâmetros obtidos, reportados na Tabela 23. K_S variou entre 8,59 e 24,17 g/L, enquanto que K_I teve uma variação de 55,40 e 99,96 g/L.

Analisando o parâmetro *Xmax*, observa-se que a concentração celular máxima obteve os valores mais baixos no sistema fermentativo **H4+melaço** e **H5+melaço**. Assim, dada a presença de inibidores nesses sistemas, provenientes, possivelmente, do pré-tratamento ácido e deslignificado com NaOH, e do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio, a concentração celular máxima teve seu intervalo reduzido até 46,22 g/L a 34 °C, e 24,54 g/L a 36 °C, respectivamente.

A concentração máxima de etanol (*Pmax*) apresenta pouca variação em relação à temperatura dos sistemas estudados. Entretanto, ao analisar todos os valores de *Pmax* observase que a variação é significativa, com os valores dentro da faixa de 62,49 até 91,80 g/L. Os sistemas com o maior limite de concentração de etanol foram H1+melaço, H4+melaço e H5+melaço.

Finalmente, quando analisados os valores de r, pode-se reparar que o termo de inibição por produto não é linear ($r \neq 1$). Deste modo, o modelo cinético proposto representou os resultados experimentais de forma satisfatória quando comparado a os dados simulados (Figura 32 a Figura 36), e também ao comparar os desvios e os parâmetros estatísticos apresentados na Tabela 24. No entanto, existem desvios maiores de 20% nos parâmetros cinéticos estimados (indicados em cinza).
Tabela 24. Avaliação do modelo de fermentação para os sistemas fermentativos H1+melaço, H2+melaço, H3+melaço, H4+melaço e H5+melaço (RSD e COR correspondem às Eqs. (96) e (98))

C(t)	Sistema	a H1+melaço		H2+melaço		H3+melaço		H4+melaço		H5+melaço	
X(t)		COR	RSD (%)	COR	RSD (%)	COR	RSD (%)	COR	RSD (%)	COR	RSD (%)
	T = 30 °C	0,993	6,72	0,969	12,299	0,974	7,728	0,979	4,673	0,864	14,734
	T = 32 °C	0,946	12,194	0,981	9,494	0,989	4,119	0,911	15,474	0,953	7,629
	T = 34 °C	0,988	7,063	0,952	9,151	0,991	4,395	0,829	16,473	0,991	4,327
	T= 36 °C	0,954	13,488	0,925	12,8	0,977	5,562	0,977	5,891	0,956	10,303
S(t)		COR	RSD (%)	COR	RSD (%)	COR	RSD (%)	COR	RSD (%)	COR	RSD (%)
	T = 30 °C	0,966	22,153	0,994	9,624	0,981	11,331	0,994	6,718	0,967	20,253
	T = 32 °C	0,853	44,002	0,994	8,116	0,991	12,302	0,986	12,946	0,952	30,423
	T = 34 °C	0,97	19,262	0,998	4,035	0,954	23,278	0,982	21,079	0,98	12,118
	T= 36 °C	0,98	17,047	0,998	5,118	0,98	11,745	0,98	27,378	0,999	8,915
P(t)		COR	RSD (%)	COR	RSD (%)	COR	RSD	RSD (%)	RSD	COR	RSD (%)
	$T = 30 ^{\circ}\text{C}$	0,985	13,003	0,944	17,969	0,958	16,597	0,978	17,416	0,936	14,978
	T = 32 °C	0,852	33,93	0,997	4,868	0,966	15,726	0,988	6,283	0,958	24,206
	T = 34 °C	0,996	5,303	0,997	3,136	0,919	20,65	0,986	7,791	0,979	11,654
	T= 36 °C	0,978	16,346	0,995	4,85	0,923	24,704	0,989	6,756	0,984	6,789

Adicionalmente, uma estimativa dos parâmetros foi realizada a partir de todos os 5 sistemas simultaneamente. Porém, os resultados não foram aceitáveis, reportando erros de até 60%, observando-se pouco acompanhamento dos dados simulados quando comparados aos dados experimentais. Por esse motivo, a análise foi realizada para cada sistema de fermentação de forma isolada, devido ao caráter específico de cada conjunto de parâmetros cinéticos.

Efeito da Temperatura sobre os Parâmetros Cinéticos do Modelo de Fermentação

A temperatura afeta diretamente às reações bioquímicas no crescimento, metabolismo, viabilidade e fermentescibilidade da levedura. O efeito da temperatura nos estudos de caso demonstrou ser uma variável de processo importante devido a sua influência nas taxas de crescimento celular, produção de etanol e consumo de açúcar. Além disso, a temperatura também pode influenciar nas inibições de substrato, produto e células. Portanto, a modelagem do processo fermentativo em função da temperatura é vital para realizar estudos posteriores que incluam simulação, otimização e controle do processo.

Na Figura 31, observa-se a variação dos rendimentos limites ($Y_{X/S}$ e $Y_{X/P}$), da velocidade específica de crescimento (μ_{max}), do valor máximo (K_S), da concentração máxima de células (X_{max}) e, da concentração máxima de etanol (P_{max}). Os dois últimos mencionados correspondem

ao crescimento celular igual a zero, à concentração de substrato na qual inicia-se a inibição pelo (K_l) e pelo parâmetro parabólico, *r*.

Nessa seção, os parâmetros cinéticos $\mu_{max}(T)$, $K_S(T)$, $K_I(T)$, r(T), $P_{max}(T)$, $X_{max}(T)$ são ajustados por meio de uma função exponencial, com temperatura definida por *Arrhenius* corrigida apresentada na Eq. (101). Por outro lado, os parâmetros estequiométricos, $Y_{X/S}$ e $Y_{X/P}$, são representados por meio de uma função exponencial da temperatura conforme apresentada na Eq. (102).

As Tabelas 25 a 29 exibem os parâmetros A, B, C, D, E e F estimados a partir das equações Eq. (101) e Eq. (102), as quais correlacionam os parâmetros cinéticos, de cada sistema de fermentação com a temperatura.

	D?			D .	. 1		Análise do erro residua	l
Parâmetro cinético	R ²		Parametro	Desvio	t valor	T (°C)	Parâmetro predito	Erro residual (%)
$Y_{X/S}$	0,899	D	-2,712206	0,330211	-8,213551	30	0,043816	2,28
		E	$-1,538719 \times 10^{-05}$	0,000010	-1,472457	32	0,040073	-6,86
		F	$-8,091595 \times 10^{-18}$	0,000000	-0,168996	34	0,036091	3,68
						36	0,031273	-0,57
$Y_{X/P}$	0,962	D	-2,229141	0,224075	-9,948189	30	0,093356	1,74
		E	$-5,240380 \times 10^{-06}$	0,000007	-0,746308	32	0,090173	-4,37
		F	-6,541816×10 ⁻¹⁷	0,000000	-1,993385	34	0,084308	2,38
						36	0,063566	-0,47
$\mu_{max}(T)(h^{-1})$	0,965	Α	26,732319	4,009532	6,667191	30	0,434759	0,36
,	,	В	-0,413913	0,060890	-6,797762	32	0,489659	-0.93
		С	-454,436842	65.778512	-6,908591	34	0.493363	0.93
			- ,	,	-)	36	0,453032	-0,40
$K_{\rm s}(T)(g/L)$	0.909	Α	42,500768	12.443622	3.415466	30	8,381513	2.53
	,	В	-0,529129	0,186200	-2,841719	32	13,451263	-3,67
		С	-735,025675	207,306259	-3,545603	34	18,028688	1,89
				,	,	36	20,795314	-0,53
$X_{max}(T)(g/L)$	0.988	Α	18.501694	6.993184	2.645675	30	64,607658	0.74
,	-)	В	-0,191324	0,105780	-1,808692	32	75,398465	-1.85
		С	-257,809099	115.165186	-2,238603	34	82.603527	1.50
			- ,	-,	,	36	85,855080	-0.52
$P_{max}(T)(g/L)$	0.950	Α	25.089690	1.425206	17.604252	30	84,901377	-0.12
	,	В	-0.313695	0.021654	-14,486820	32	91,508901	0.32
		С	-337.120850	23.367580	-14,426862	34	90.808648	-0.35
		-		- ,	,	36	84,117650	0.14
$K_{l}(T)(g/L)$	0.989	Α	34,436483	8.272491	4.162771	30	97.980000	0.54
	-)	В	-0.474389	0.126287	-3.756449	32	98,463000	-1.73
		Ċ	-468.765842	135.011022	-3.472056	34	93,730010	1.89
		-	,		-,	36	75.651010	-0.84
r(T)(-)	0.842	А	3.231920	11.088152	0.291475	30	1.000968	-0.63
. (- / ()	-,	В	-0.075108	0.169118	-0.444116	32	0.915632	2.23
		С	-29.331418	181.054218	-0.162004	34	0.831571	-3.29
		-		,		36	0.750716	1.27

Tabela 25. Parâmetros estimados das Eq. (101) e Eq. (102) para correlacionar os parâmetros cinéticos do modelo de fermentação para o sistema de fermentação **H1+melaço**

Darômatra ainática	D ²		Dorâmatro	Daguio	t volor -		Análise do erro residual	l
Parametro cinetico	K-		Parametro	Desvio	t valor	T (°C)	Parâmetro predito	Erro residual (%)
$Y_{X/S}$	0,914	D	-3,571891	0,249156	-14,335966	30	0,052604	2,56
		E	$2,326042 \times 10^{-05}$	0,000008	3,088276	32	0,059732	-4,79
		F	$-1,037370 \times 10^{-16}$	0,000000	-3,329946	34	0,065994	1,88
						36	0,053190	-0,32
$Y_{X/P}$	0,899	D	-2,636337	0,255820	-10,305448	30	0,113082	2,46
		E	$1,695363 \times 10^{-05}$	0,000008	2,174639	32	0,123865	-4,97
		F	-9,832773×10 ⁻¹⁷	0,000000	-2,952148	34	0,131682	2,08
						36	0,103388	-0,38
$\mu_{max}(T)(h^{-1})$	0,952	Α	32,113512	10,900802	2,945977	30	0,326987	1,13
		В	-0,486275	0,165192	-2,943696	32	0,396455	-2,72
		С	-559,292637	179,231550	-3,120503	34	0,419106	2,28
						36	0,395223	-0,98
$K_{S}(T)(g/L)$	0,995	Α	149,756826	11,548704	12,967414	30	12,412204	-1,86
-		В	-2,224782	0,175070	-12,707921	32	22,198740	1,70
		С	-2414,840921	190,101661	-12,702892	34	21,966490	-2,03
						36	13,273551	1,78
$X_{max}(T)(g/L)$	0,993	Α	-30,390859	5,498600	-5,527018	30	71,605943	0,26
		В	0,501463	0,083845	5,980819	32	57,281034	-1,34
		С	588,544487	89,753253	6,557361	34	52,932218	1,55
						36	55,161434	-0,53
$P_{max}(T)(g/L)$	0,892	Α	10,539525	2,240918	4,703216	30	74,556148	0,17
		В	-0,093611	0,034042	-2,749840	32	76,558843	-0,54
		С	-102,589614	36,739120	-2,792381	34	76,663235	0,55
						36	75,175932	-0,21
$K_I(T)(g/L)$	0,963	Α	62,833145	16,042778	3,916600	30	92,001657	1,11
		В	-0,911090	0,245432	-3,712184	32	103,109537	-3,15
		С	-929,359248	261,374902	-3,555656	34	92,018814	3,55
						36	67,922960	-2,69
r(T)(-)	0,975	Α	-6,402483	1,840297	-3,479048	30	0,953848	0,14
		В	0,100525	0,027936	3,598357	32	0,946563	-0,46
		С	100,184211	30,186672	3,318823	34	0,962685	0,46
						36	0,999322	-0,15

Tabela 26. Parâmetros estimados das Eq. (101) e Eq. (102) para correlacionar os parâmetros cinéticos do modelo de fermentação para o sistema de fermentação **H2+melaço**

Donômotro oinótico	D ²		Darâmatro	Desuis	trolog		Análise do erro residual	[
Parametro cinetico	K²		Parametro	Desv10	t valor —	T (°C)	Parâmetro predito	Erro residual (%)
$Y_{X/S}$	0,901	D	-2,203714	0,288732	-7 632375	30	0,052147	1,82
		E	$-2,781227 \times 10^{-05}$	0,000009	-3,012773	32	0,044691	-6,05
		F	8,966370×10 ⁻¹⁷	0,000000	2,241231	34	0,038987	3,53
						36	0,044389	-0,32
$Y_{X/P}$	0,998	D	-1,292677	0,040497	-31,920083	30	0,123227	0,27
		E	$-2,971048 \times 10^{-05}$	0,000001	-22,917040	32	0,104575	-0,76
		F	$1,061205 \times 10^{-16}$	0,000000	19,189335	34	0,090854	0,55
						36	0,108464	-0,04
$\mu_{max}(T)(h^{-1})$	0,957	Α	11,761258	3,680819	3,195283	30	0,443793	0,31
,		В	-0,184967	0,055874	-3,310423	32	0,475547	-0,89
		С	-210,739752	60,397511	-3,489213	34	0,483921	0,88
			,	,	,	36	0.471696	-0.34
$K_{\rm s}(T)({\rm g/L})$	0,994	Α	57.639310	7,048391	8,177655	30	10,703502	-1,02
	,	В	-0,804135	0,106323	-7,563142	32	15.011911	1,56
		С	-934,340651	116,470067	-8,022153	34	16,745203	-1,43
				,	,	36	15,433527	0,57
$X_{max}(T)(g/L)$	0,978	Α	10,259757	12,485550	0,821731	30	85,640797	-0,62
	,	В	-0,125768	0,190823	-0,659083	32	75,634310	2,36
		С	-61,096556	203,468327	-0,300276	34	65,804197	-3,86
			,	,	,	36	56,541696	1,61
$P_{max}(T)(g/L)$	0.951	Α	11,481219	1,704758	6,734808	30	73.029125	-0,13
	,	В	-0,108010	0,025890	-4,171836	32	75,317783	0,40
		С	-118,501614	27,956952	-4,238717	34	75,454489	-0,43
			,	,	,	36	73,783810	0,16
$K_l(T)(g/L)$	1.000	A	33.873443	0.517122	65,503797	30	71.283283	0.05
	,	В	-0,438893	0,007842	-55,964336	32	82,795663	-0,12
		С	-493,199829	8,495675	-58.053048	34	85,217534	0.12
		-		-,	- ,	36	79,305182	-0,05
r(T)(-)	0,997	Α	4,318024	0,419815	10,285550	30	0,872510	-0,03
	,	В	-0,064570	0,006374	-10,130332	32	0,897459	0,10
		С	-75,519428	6,886431	-10,966411	34	0,906191	-0,11
			~	*	,	36	0.901003	0.04

Tabela 27. Parâmetros estimados das Eq. (101) e Eq. (102) para correlacionar os parâmetros cinéticos do modelo de fermentação para o sistema de fermentação **H3+melaço**

Darâmatra ainática	D ²		Darâmatra	Desvio	t valor —	Análise do erro residual				
	К		Farametro	Desvio	t valoi	T (°C)	Parâmetro predito	Erro residual (%)		
$Y_{X/S}$	0,999	D	-2,538497	0,016092	-157,746816	30	0,050263	-0,12		
		E	$-1,676984 \times 10^{-05}$	0,000001	-33,062254	32	0,045864	0,29		
		F	7,526609×10 ⁻¹⁷	0,000000	35,880842	34	0,042694	-0,19		
						36	0,049966	0,01		
$Y_{X/P}$	0,920	D	-1,945385	0,081924	-23,746109	30	0,115108	-0,69		
		E	-8,032306×10 ⁻⁰⁶	0,000003	-3,139538	32	0,110157	1,45		
		F	3,468066×10 ⁻¹⁷	0,000000	3,292484	34	0,106368	-0,93		
						36	0,114106	0,08		
$\mu_{max}(T)(h^{-1})$	1,000	Α	28,107679	0,577964	48,632261	30	0,353572	-0,05		
		В	-0,444028	0,008785	-50,545150	32	0,391188	0,13		
		С	-474,794846	9,473671	-50,117303	34	0,385259	-0,14		
						36	0,344353	0,06		
$K_{S}(T)(g/L)$	0,998	Α	141,764657	7,283100	19,464880	30	12,589734	-0,80		
		В	-2,131563	0,111150	-19,177431	32	19,590838	1,02		
		С	-2258,546785	119,073583	-18,967656	34	17,525850	-1,43		
						36	9,884692	1,48		
$X_{max}(T)(g/L)$	0,903	Α	-2,930183	17,940552	-0,163327	30	59,879628	-0,99		
		В	0,082655	0,273363	0,302364	32	53,181875	3,57		
		С	136,285942	293,182118	0,464851	34	48,837690	-5,65		
						36	46,114306	1,86		
$P_{max}(T)(g/L)$	0,993	Α	14,195376	0,881630	16,101289	30	80,018246	0,07		
		В	-0,150778	0,013399	-11,252789	32	82,377458	-0,21		
		С	-158,693863	14,448206	-10,983638	34	81,570969	0,22		
						36	78,196278	-0,09		
$K_l(T)(g/L)$	0,910	Α	31,914437	29,936373	1,066076	30	57,840209	-4,40		
		В	-0,380802	0,450341	-0,845586	32	75,423903	6,31		
		С	-492,980949	495,869257	-0,994175	34	87,159137	-7,00		
						36	91,072548	1,82		
r(T)(-)	0,911	Α	16,984065	8,184680	2,075104	30	0,879286	-0,75		
		В	-0,250154	0,124066	-2,016288	32	0,971955	1,85		
		С	-288,243019	134,501218	-2,143051	34	1,001106	-2,04		
						36	0,972178	0,71		

Tabela 28. Parâmetros estimados das Eq. (101) e Eq. (102) para correlacionar os parâmetros cinéticos do modelo de fermentação para o sistema de fermentação **H4+melaço**

<u> </u>					Análise do erro	residual
Parâmetro cinético	R ²		Parâmetro	T (°C)	Parâmetro predito	Erro residual (%)
$Y_{X/S}$	0,999	D	-3,15807	30	0,028843	0,54
		Ε	-1,4E-05	32	0,026573	-2,20
		F	1,33E-17	34	0,024353	2,59
				36	0,023024	-0,10
$Y_{X/P}$	0,920	D	-2,18735	30	0,066938	-1,42
		Ε	-1,9E-05	32	0,060106	3,05
		F	4,13E-17	34	0,054151	-2,17
				36	0,054867	0,24
$\mu_{max}(T)(h^{-1})$	1,000	Α	74,16785	30	0,126799	1,33
		В	-1,13723	32	0,181341	-2,28
		С	-1263,48	34	0,190278	1,98
				36	0,154242	-1,15
$K_{S}(T)(g/L)$	0,998	Α	81,66894	30	21,8771	2,49
		В	-1,22442	32	25,84966	-7,22
		С	-1255,53	34	22,45305	7,11
				36	15,09125	-8,12
$X_{max}(T)(g/L)$	0,903	Α	3,832822	30	52,88927	-0,13
		В	-0,0684	32	40,23304	0,72
		С	65,62152	34	31,10164	-1,35
				36	24,36714	0,73
$P_{max}(T)(g/L)$	0,993	Α	17,69886	30	74,12125	0,15
		В	-0,21777	32	73,61948	-0,49
		С	-205,8	34	69,52427	0,57
			-3,15807	36	62,95422	-0,25
$K_I(T)(g/L)$	0,910	Α	-1,4E-05	30	98,3497	-0,09
		В	1,33E-17	32	91,27088	0,34
		С		34	88,65244	-0,39
			-2,18735	36	89,44343	0,13
r(T)(-)	0,911	Α	-1,9E-05	30	0,292084	0,54
		В	4,13E-17	32	0,466335	-2,20
		С		34	0,620203	2,59
			74,16785	36	0,708338	-0,10

Tabela 29.Parâmetros estimados das Eq. (101) e Eq. (102) para correlacionar os parâmetros cinéticos do modelo de fermentação para o sistema de fermentação **H5+melaço**



Figura 31. Parâmetros $Y_{X/S}(T)$, $Y_{X/P}(T)$, μ_{max} , $K_S(T)$, $X_{max}(T)$, $P_{max}(T)$, $K_I(T)$ e r(T) em função da temperatura (°C). Símbolos correspondem aos seguintes sistemas de fermentação: (**a**) **H1+melaço** (**•**) **H2+melaço**; (**•**) **H3+melaço**; (**•**) **H4+melaço** e (×) **H5+melaço**; (**--**) Ajuste das Eq. (101) e Eq. (102)

A taxa específica máxima de crescimento celular (μ_{max}), apresentada na Figura 31C, possui uma forma de domo com um nível máximo no ponto central. Assim, o maior valor de μ_{max} está entre 32 e 34°C e, consequentemente, tem-se uma maior produção de etanol.

A Figura 31E apresenta a variação de X_{max} com a temperatura. Nota-se que esse parâmetro tem valores mais altos abaixo de 32 °C, mostrando não existir muita inibição de produto a baixas temperaturas, porém a acima desse valor a levedura passa a ter um valor mais baixo de X_{max} .

A Figura 31F apresenta a variação de P_{max} em relação à temperatura. Ao realizar a análise do desvio padrão (DP) e a média desse parâmetro para todos os sistemas de fermentação obtémse os seguintes valores: DP = 2,97 e uma média de 87,7 g/L para H1+melaço; DP = 1,05 e uma média de 75,02 g/L H2+melaço; DP = 0,94 e uma média de 74,39 g/L H3+melaço; DP = 1,42 e uma média de 80,54 g/L H4+melaço; e um DP = 4,01 e uma média de 70,4 g/L H5+melaço. O valor em porcentagem do desvio padrão em relação à média do valor de P_{max} se encontra na faixa de 1,26 % a 3,3 % para os sistemas H1+melaço, H2+melaço, H3+melaço, e H4+melaço, mostrando que a inibição para esses sistemas é praticamente constante, com uma variação muito baixa entre os valores de P_{max} do mesmo sistema de fermentação. Para o sistema H5+melaço pode-se observar que para temperaturas mais baixas a inibição é menor quando comparado aos valores de P_{max} do mesmo sistemas, e uma porcentagem do DP em relação à média do valor de P_{max} de 5,8% mostrando uma maior variabilidade.

A Figura 31D apresenta o parâmetro *Ks*, a variável cresce atingindo o valor máximo entre as temperaturas 32 e 34 graus, e posteriormente decresce com o aumento da temperatura.

Por meio da análise das Figuras 32 a 36, nas quais houve a comparação dos valores experimentais junto aos valores simulados do processo, foi possível concluir que o modelo cinético obtido para o processo fermentativo teve um ajuste adequado, pois, os dados simulados acompanham a tendência dos valores experimentais.

Adicionalmente, na Tabela 30 demonstra a avaliação do modelo de fermentação, correlacionando o efeito da temperatura, a partir dos parâmetros *RSD e COR*, Eq. (101) e Eq. (102), para os sistemas fermentativos **H1+melaço**, **H2+melaço**, **H3+melaço**, **H4+melaço** e **H5+melaço**, O modelo descreveu os dados experimentais de forma satisfatória ao comparar os valores de RSD e o COR. Porém, desvio maiores que 20 % foram observados para o perfil de concentração de (*S*(*t*)), (*P*(*t*)) e (*X*(*t*)).



Figura 32. Perfis de concentração de(•) Substrato (s); (Δ) Células (X); (\blacksquare) Etanol (P) da fermentação do sistema H1+melaço, a: (A) 30 °C; (B) 32 °C; (C) 34 °C e (D) 36 °C.; ;(-----) Modelo Cinético



Figura 33. Perfis de concentração de (•) Substrato (s); (Δ) Células (X); (**n**) Etanol (P) da fermentação do sistema **H2+melaço**, a: (A) 30 °C; (B) 32 °C; (C) 34 °C e (D) 36 °C.; ;(-----) Modelo Cinético



Figura 34. Perfis de concentração de(•) Substrato (s); (Δ) Células (X); (\blacksquare) Etanol (P) da fermentação do sistema **H3+melaço**, a: (A) 30 °C; (B) 32 °C; (C) 34 °C e (D) 36 °C.; ;(-----) Modelo Cinético



Figura 35. Perfis de concentração de(•) Substrato (s); (Δ) Células (X); (\blacksquare) Etanol (P) da fermentação do sistema **H4+melaço**, a: (A) 30 °C; (B) 32 °C; (C) 34 °C e (D) 36 °C.; ;(-----) Modelo Cinético



Figura 36. Perfis de concentração de(•) Substrato (s); (Δ) Células (X); (\blacksquare) Etanol (P) da fermentação do sistema **H5+melaço**, a: (A) 30 °C; (B) 32 °C; (C) 34 °C e (D) 36 °C.; ;(---) Modelo Cinético

Tabela 30. Avaliação do modelo de fermentação correlacionando o efeito da temperatura para os sistemas fermentativos **H1+melaço**, **H2+melaço**, **H3+melaço**, **H4+melaço** e **H5+melaço** (RSD e COR correspondem as Eq. (101) e Eq. (102))

C(t)	Sistema	Sistema H1+melaço		H2+melaço		H3+	H3+melaço		nelaço	H5+melaço	
X(t)		COR	RSD (%)	COR	RSD (%)	COR	RSD (%)	COR	RSD (%)	COR	RSD (%)
	T = 30 °C	0,993	5,45	0,969	13,789	0,975	7,788	0,979	4,656	0,863	14,906
	T = 32 °C	0,961	33,961	0,982	7,162	0,989	4,028	0,925	17,939	0,961	7,35
	T = 34 °C	0,987	8,14	0,95	9,604	0,991	4,332	0,848	15,19	0,991	3,947
	T= 36 °C	0,955	12,872	0,931	12,005	0,978	5,491	0,977	5,766	0,956	10,447
S(t)		COR	RSD (%)	COR	RSD (%)	COR	RSD (%)	COR	RSD (%)	COR	RSD (%)
	$T = 30 ^{\circ}\text{C}$	0,964	22,841	0,994	10,068	0,981	11,793	0,995	6,677	0,965	20,756
	T = 32 °C	0,85	51,483	0,994	8,12	0,992	9,304	0,99	11,057	0,96	27,431
	T = 34 °C	0,972	18,794	0,998	4,66	0,955	25,403	0,988	15,973	0,978	14,004
	T= 36 °C	0,979	17,69	0,997	6,517	0,98	11,608	0,979	27,745	0,999	9,876
P(t)		COR	RSD (%)	COR	RSD (%)	COR	RSD	RSD (%)	RSD	COR	RSD (%)
	$T = 30 ^{\circ}\text{C}$	0,983	12,905	0,945	18,08	0,957	16,876	0,973	18,891	0,935	15,049
	T = 32 °C	0,865	28,069	0,997	3,959	0,968	15,495	0,986	6,466	0,966	27,494
	T = 34 °C	0,994	7,459	0,998	3,192	0,92	20,737	0,987	6,943	0,978	11,434
_	T= 36 °C	0,977	16,733	0,993	5,89	0,923	24,476	0,989	6,512	0,984	6,773

4.4. Validação cruzada (Cross Validation) dos Modelos de Fermentação em Batelada

A validação cruzada ou *cross validation* é uma técnica utilizada para avaliar os resultados do modelo matemático desenvolvido e garantir que são independentes da partição entre os dados de entrada e de prova. Nesse estudo de caso, essa técnica avalia a capacidade de generalização dos modelos fenomenológicos, a partir de dados independentes aos dados de treinamento. Desse modo, duas bateladas foram realizadas a 33 °C, na qual a temperatura difere das fermentações para desenvolver o modelo. Os dados experimentais obtidos para a validação cruzada são as fermentações dos sistemas H2 + melaço e H4+ melaço.

Os resultados obtidos por meio dos experimentos realizados em sistema batelada a 33 ° C são apresentados a seguir, junto aos dados da simulação, utilizando o modelo fenomenológico dos sistemas H2 + melaço e H4+ melaço, conforme apresentado na Tabela 31 e na Figura 37 e 38.

As amostras foram retiradas periodicamente visando à realização de perfis de consumo de açúcares redutores totais, da formação de etanol e de massa seca e do acompanhamento da viabilidade do meio fermentativo.

			S(g/L)			P(g/L)			X(g/L)	
Sistema	t(h)	E*	S**	RDS (%)	E*	S**	RDS (%)	E*	S**	RDS (%)
H2+Melaço	0	151,1	151,11		2,12	2,12		3,87	3,87	
	3	128,31	131,5		14,30	11,76		5,47	5,11	
	6	93,38	86,51		42,75	33,88		8,63	7,97	
	9	62,4	53,07		51,93	50,32		10,07	10,09	
	12	42,67	29,33	12,02	51,06	61,99	15,52	11,93	11,59	5,52
	15	20,56	16,44		59,87	68,33		12,30	12,41	
	18,17	6,54	9,83		58,25	71,57		12,47	12,83	
	21,25	0,25	6,59		68,77	73,17		12,60	13,03	
	24	0,05	4,47		73,01	74,21		11,87	13,17	
H4+Melaço	0	182,87	182,87		1,49	1.49		2,90	2,9	
	3	140,72	158,16		10,29	11.55		4,53	3,99	
	6	110,75	127,31		32,86	24.12		7,43	5,34	
	9	78,19	91,8	14 17	44,21	38.58	0.09	8,73	6,9	14.02
	12	48,15	56,17	14,17	56,31	53.09	9,98	9,70	8,47	14,03
	18	14,04	11,65		66,13	71.21		11,33	10,42	
	21	3,11	4,58		71,04	74.09		10,20	10,73	
	24	0,00	1,8		73,66	75.23		10,90	10,86	

Tabela 31. Dados experimentais e os dados simulados da fermentação em batelada, utilizando o modelo fenomenológico desenvolvido em função da temperatura (33 °C)

E*= experimental, S**=Simulado

Na Tabela 31, o desvio padrão residual RDS, definido pela (Eq. (96)), foi utilizado, sendo definido como a razão do desvio padrão pela média, para verificar a precisão do valor determinado pelo modelo determinístico. Os valores de RDS para H2+melaço são de 12,02% para a concentração de substrato, 15,52% para concentração de produtos, e 5,52% para concentração de células. Adicionalmente, os valores de RDS para H4+melaço são de 14,17% para a concentração de substrato, 9,98% para concentração de produtos, e 14,03% para concentração de células. Assim, esses valores estão dentro dos limites dos valores aceitáveis (< 20 %) para esse tipo de ajustes.

Com o auxílio das Figuras 37 e 38 pode-se verificar que o modelo cinético desenvolvido para H2+melaço e H4+melaço tem a capacidade de descrever o processo fermentativo em batelada a 33 °C. Desse modo, confirma-se que os modelos cinéticos desenvolvidos são capazes de representar as concentrações de substrato (S), produto ou etanol (P) e células (X).



Figura 37. Perfís de concentração de(●) Substrato (s); (△) Células (X); (■) Etanol (P) da fermentação do sistema H2+melaço, a 33 °C;(──) Modelo Cinético.



Figura 38. Perfís de concentração de(●) Substrato (s); (Δ) Células (X); (■) Etanol (P) da fermentação do sistema H4+melaço, a 33 °C;(──) Modelo Cinético.

4.5. Conclusões Gerais

Ao analisar os dados experimentais, bem como os dados obtidos na modelagem do processo fermentativo dos sistemas H1+melaço, H2+melaço, H3+melaço, H4+melaço e H5 melaço foi possível concluir que:

- Os modelos cinéticos desenvolvidos com parâmetros os quais estão em função da temperatura proposto foi capaz de descrever o processo fermentativo em toda a faixa estudada e para todos os sistemas de estudo de caso, obtendo desvios, em sua maioria, menores que 20 %. A avaliação cruzada em que foram utilizados dados distintos do desenvolvimento dos modelos, apresentou um ajuste adequado aos dados experimentais. Assim, o modelo cinético permite a realização de simulações do processo em diversas situações operacionais de temperatura e concentração inicial de substrato, produto e células, possibilitando a obtenção de diversas informações.
- A Equação (93) incorpora os termos de inibição por substrato, pelo produto e pela própria concentração de células, resultando em um modelo adequado para expressar a taxa específica máxima de crescimento celular (μ).
- Este modelo pode ser utilizado para posterior simulações, otimização e controle de processos de segunda geração enriquecidos com melaço que é decorrente da primeira geração) em diversas situações operacionais de temperatura e concentração inicial de substrato, produto e células. Destaca-se, que quando ocorrem mudanças decorrentes de matéria primas de diferente safra ou microrganismos de outras linhagens, os parâmetros cinéticos devem ser re-estimados.

Referências Bibliográficas

ANDRADE, R. R. *Procedimento para o desenvolvimento de um modelo matematico robusto para o processo de fermentação alcoólica*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidad Estadual de Campinas, 2007. Dissertação (Mestrado).

ANDRADE, R., CCOPA RIVERA, E., COSTA, A., ATALA, D. P., FILHO, F., FILHO, R. Estimation of temperature dependent parameters of a batch alcoholic fermentation process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 137-140(1-12), 753-763, 2007.

ANDRADE, R. R., MAUGERI FILHO, F., MACIEL FILHO, R., DA COSTA, A. C. Kinetics of ethanol production from sugarcane bagasse enzymatic hydrolysate concentrated with molasses under cell recycle. *Bioresource Technology*, 130, 351-359, 2013.

ATALA, D. P., COSTA, A., MACIEL, R., MAUGERI, F. Kinetics of ethanol fermentation with high biomass concentration considering the effect of temperature. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 91-93, n. 1-9, p. 353-365, 2001.

CHANDEL, A. K., SINGH, O. V., CHANDRASEKHAR, G., RAO, L. V., NARASU, M. L. Key drivers influencing the commercialization of ethanol-based biorefineries. *J Commer Biotechnol*, v. 16, n. 3, p. 239-257, 2010.

DE BRITO, P. M. P. *Métodos numéricos adaptativos para resolução de modelos multidimensionais em engenharia química*. Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade de Coimbra, Coimbra. 2010. Tese (Doutorado).

DE SÁ, C. B. C. Caracterização de linhagens de Saccharomyces cerevisiae E Zymomonas mobilis para aplicação na produção de bioetanol. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco. 2012. Dissertação (Mestrado).

DIAS, M. O. S., JUNQUEIRA, T. L., CAVALETT, O., CUNHA, M. P., JESUS, C. D. F., ROSSELL, C. E. V., BONOMI, A. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. *Bioresource Technology*, 103(1), 152-161, 2012.

FEHLBERG, E. Low-order classical Runge-Kutta formulas with stepsize control and their application to some heat transfer problems. National Aeronautics and Space Administration, 1969. Disponível em: <u>https://ntrs.nasa.gov/archive/nasa/casi.ntrs.nasa.gov/19690021375.pdf</u>

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*, 21(8), 1401-1420, 1979.

JARZĘBSKI, A. Modelling of oscillatory behaviour in continuous ethanol fermentation. *Biotechnology Letters*, 14(2), 137-142. 1992.

LEDUY, A., ZAJIC, J. E. A geometrical approach for differentation of an experimental function at a point: Applied to growth and product formation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 15, n. 4, p. 805-810, 1973.

MANTOVANELLI, I. C.; RIVERA, E.; DA COSTA, A.; MACIEL FILHO, R. Hybrid neural network model of an industrial ethanol fermentation process considering the effect of temperature. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 137-140, n. 1-12, p. 817-833, 2007.

MARTINS, L. H. D. S., RABELO, S. C., COSTA, A. C. D. Effects of the pretreatment method on high solids enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of the cellulosic fraction of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 191, 312-321, 2015.

MENEGOL D, FONTANA RC, DILLON AJ, CAMASSOLA M. Second-generation etanol production from elephant grass at high total solids. Bioresour Technol. 2016 Jul; 211: 280-90. doi: 10.1016/j.biortech.2016.03.098. Epub 2016 Mar 22. PubMed PMID: 27023383.

METCALFE, T. S. CHARBONNEAU, P. Stellar structure modeling using a parallel genetic algorithm for objective global optimization. *Journal of Computational Physics*, v. 185, n. 1, p. 176-193, 2003.

PEREIRA, L. G., CHAGAS, M. F., DIAS, M. O. S., CAVALETT, O., & BONOMI, A. Life cycle assessment of butanol production in sugarcane biorefineries in Brazil. *Journal of Cleaner Production*, 96, 557-568, 2015.

PLAZAS, L. Modelagem e avaliação de diferentes cenários operacionais dos processos de prétratamento, hidrólise e fermentação para produção de etanol 2G. Post-Doutorado, Universidade Estadual de Campinas. 2015.

REHM, H. J.; REED, G. Fundamentals of Biochemical Engineering. In: MOSER, R. A. (Ed.). Cap 14: Kinetics of Batch Fermentations: Wiley VCH, v.2, 1985. p.243-283. 1985.

SCHMIDELL, W., LIMA, U. D. A., AQUARNE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial. São Pulo: Edgar Blucher Ltda, 2001.

SCHNEIDERMAN, S. J., JOHNSON, R. W., MENKHAUS, T. J., & GILCREASE, P. C. Quantifying second generation ethanol inhibition: Design of Experiments approach and kinetic model development. *Bioresource Technology*, 179, 219-226, 2015.

SIMS, R., TAYLOR, M., SADDLER, J., & MABEE, W. From 1st- to 2nd-generation bioful technologies: An overview of current industry and RD&D activities. In I. Bioenergy (Ed.), (pp. 124). France: International Energy Agency (IEA). 2008.

WANG, F.-S., SU, T.-L., & JANG, H.-J. Hybrid Differential Evolution for Problems of Kinetic Parameter Estimation and Dynamic Optimization of an Ethanol Fermentation Process. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 40(13), 2876-2885, 2001.

CAPÍTULO 5

PLANTA INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO: IMPLEMENTAÇÃO DOS MODELOS CINÉTICOS DE PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÃO (1G+2G)

166

5. PLANTA INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE ETANOL CELULÓSICO: IMPLEMENTAÇÃO DOS MODELOS CINÉTICOS DE PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÃO (1G+2G)

5.1. Introdução

Nas etapas anteriores dessa pesquisa, foram desenvolvidos modelos cinéticos de cinco processos de desconstrução do material lignocelulósico. Esses processos de desconstrução processam inicialmente o bagaço in natura a partir de três pré-tratamentos: pré-tratamento ácido; pré-tratamento ácido com deslignificação com NaOH; e pré-tratamento de peróxido de hidrogênio. Posteriormente, a fração sólida do downstream do pré-tratamento foi utilizada para a realização da hidrólise enzimática, com 8 e 3% de carga de sólidos, nas condições de 15 FPU/g de substrato Cellic® Cetc2 (Novozymes Latin América Ltda, Brazil) e 33IU/g de substrato de Aspergillus Níger (Sigma-Aldrich corporation, USA), carregando as cargas de inibidores relacionadas ao pré-tratamento, produzindo açúcares fermentescíveis de dois tipos (C6 e C5). Nessas fermentações de substrato de segunda geração (2G) adiciona-se melaço para complementar nutrientes ausentes no licor e para enriquecer o mosto com os açúcares C6 do processo de primeira geração (1G), atingindo 180 g/L de ART. No processo fermentativo, apenas os açúcares C6 são utilizados, devido à afinidade do microrganismo utilizado, Saccharomyces cerevisiae, com o substrato. Sendo assim, os açúcares C5 não são aproveitados para a produção de etanol. Apenas para facilitar a forma de nomear os sistemas, a seguinte notação foi utilizada: Sistema 1 – S1: Planta de Produção de etanol com o modelo cinético H1 + Melaço (advindo do fluxograma da Figura 39A); Sistema 2 – S2: Planta de Produção de etanol com o modelo cinético H2+ Melaço(advindo do fluxograma da Figura 39B);Sistema 3 – S3: Planta de Produção de etanol com o modelo cinético H3+ Melaço (advindo do fluxograma da Figura 39C); Sistema 4 – S4: Planta de Produção de etanol com o modelo cinético H4 + Melaço (advindo do fluxograma da Figura 39D); Sistema 5 – S5: Planta de Produção de etanol com o modelo cinético H5+ Melaço (advindo do fluxograma da Figura 39E).

Nesse estudo de caso, os modelos cinéticos são utilizados para realizar a modelagem e simulação de uma planta de produção de etanol 1G+2G. O objetivo desse estudo foi estudar o comportamento dos modelos cinéticos em relação às concentrações de etanol, substrato, células e como o rendimento e a produtividade são influenciados pelas características de cada sistema. A planta industrial foi baseada no processo de fermentação contínua, o qual foi apresentado nos trabalhos de ANDRIETTA (1994) e MELEIRO (2002). A simulação dinâmica foi

implementada no software *Matlab*®, e como resultado obteve-se a planta virtual de produção de etanol 1G+2G, aplicando um modelo cinético desenvolvido para baixa densidade celular num sistema operado em alta densidade celular com reciclo de células de levedura.





- B. Processo com pré-tratamento ácido e hidrólise enzimática com 3 % de sólidos;
- C. Processo com pré-tratamento ácido, deslignificação e hidrólise enzimática com 8 % de sólidos;
- D. Processo com pré-tratamento ácido, deslignificação e hidrólise enzimática com 3 % de sólidos;
- E. Processo com pré-tratamento com peróxido de hidrogênio, deslignificação e hidrólise enzimática
 - com 7 % de sólidos

5.2. DESCRIÇÃO DO PROCESSO

No trabalho de ANDRIETTA (1994) apresenta-se uma simulação e otimização das variáveis do processo de uma planta industrial de fermentação alcoólica contínua de 1G com a finalidade de aumentar a produtividade, rendimento e conversão de açúcares. A planta estudada tem a configuração do processo *Melle-Boinot*.



Figura 40. Fluxograma da planta de produção de etanol. 1-4. Reatores ou fermentadores. 5-8. Trocadores de calor. 9. Centrífuga. 10. Unidade de tratamento ácido.

O processo de fermentação alcoólica contínua é constituído por:

- Unidade de tratamento ácido;
- Unidade de separação de leveduras: Centrífuga;
- Unidade de fermentação: Fermentadores ligados em série.

A planta industrial (Figura 40) mostra as três unidades anteriormente descritas. A unidade de fermentação consta de um sistema de quatro fermentadores com seus respectivos sistemas de refrigeração (*coolers*) e o sistema de agitação para mistura perfeita, uma centrífuga em seguida e por último a unidade de tratamento ácido. No processo de transformação do substrato em etanol, a planta é alimentada no primeiro reator com uma corrente rica em açúcares (~180 g/L). O processo de transformação do etanol acontece na medida que a corrente de açúcares avança pelos reatores. Após a conclusão da fermentação, o vinho levedurado, meio fermentado que ainda contém as leveduras em suspensão, é enviado diretamente para as centrífugas, nas quais são separadas duas frações: a primeira corresponde à uma suspensão concentrada de leveduras, chamada de leite ou creme de leveduras, e a segunda, vinho delevedurado. Uma vez feita a separação, a levedura recuperada ou creme de leveduras passa por um processo de tratamento ácido, que consiste em diluição com água e ácido sulfúrico até pH 2,5, e, posteriormente, volta ao fermentador. Esta suspensão de fermento diluído é conhecida como pé de cuba. A fase leve ou vinho livre de leveduras é levado para a dorna volante que alimenta a unidade de destilação (VANZELLA *et al.*, 2012).

Esse arranjo de fermentadores que é usado industrialmente, segundo Andrietta (1994), possui as seguintes vantagens;

• Economia de açúcar devido à menor geração de células, elevando o rendimento e concentração de etanol;

• Separação dos componentes que realizam efeitos inibitórios nas células;

• Fermentação mais pura, devido ao tratamento do leite de levedura (tratamento ácido);

• Eliminação da necessidade de cultura nova no preparo do pé-de-cuba, prática exigida na metodologia clássica, decorrendo da diminuição da complexidade do processo.

5.3. MODELAGEM MATEMÁTICA

As equações do modelo matemático são originadas dos balanços de massa e energia dos componentes presentes na mistura reacional. Na realização da modelagem matemática da planta industrial de etanol, considerou-se um reator de fermentação contínua, representado na Figura 41. Algumas considerações foram feitas para realizar a simulação desses reatores: considerou-se uma operação com uma mistura perfeita; desprezou-se a retenção gasosa (*hold-up*), pois no estudo de ANDRIETTA (1994) confirma que o efeito do volume das células de *Saccharomyces cerevisae* é desprezível para fermentadores operando com volume de células em torno de 10 %, o que corresponde a 30 g/L de massa seca.

Na Figura 41 está representado o reator da fermentação, i representa cada um dos quatro reatores do processo, j e je representam a água que chega e sai do trocador de calor, respectivamente; V é o volume do reator, T é a temperatura do fluido reagente, tji é a temperatura do fluido refrigerante no trocador de calor, F é o fluxo volumétrico de entrada e saída dos reatores.



Figura 41. Diagrama do reator de mistura do processo de fermentação. 1. Reator. 2. Trocador de calor

Os balanços de massa e energia estão referenciados na seção 2.4.

5.3.1. Rendimento

$$REND = \frac{F_{\nu}P_4}{FS_0} \left(\frac{100}{0.511}\right)$$
(113)

Esta equação é a relação entre a quantidade de etanol produzido e na quantidade de açúcar que entrou no processo. O valor 0,511 é o rendimento teórico de etanol a partir de glicose, sendo considerada somente etanol e gás carbônico são produzidos.

5.3.2. Produtividade

$$PROD = \frac{F_{\nu}}{V}P_4 \tag{114}$$

A produtividade é uma função do volume total de reator, a vazão de entrada no reator 1, e concentração de etanol no efluente.

5.4. Modelo Cinético

No Capítulo 4 foi estudada a modelagem cinética para 5 diferentes cenários, sendo determinados os parâmetros cinéticos e a sua dependência com a temperatura. A equação (93) representa a velocidade específica de crescimento celular.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_I}} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^r \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)$$

Nesse trabalho, a velocidade específica de crescimento, μ , é uma função com seis parâmetros, como μ_{max} , K_s , K_l , r, P_{max} , e X_{max} , que são influenciados pela temperatura, e por esse motivo são modelados como funções de T na equação (101). Outros dois parâmetros, $Y_{X/S}eY_{X/P}$, também são influenciados pela temperatura e foram modelados pela equação (102).

$$P(T) = \exp(A) \exp\left(\frac{B}{T}\right) \exp(CT)$$
$$Y_j(T) = \exp(D) \exp\left(ET^3\right) \exp\left(F\exp(T)\right)$$

No qual, *T* é temperatura; e A, B, C, D, E e F são constantes ajustadas para cada um dos parâmetros dependentes. As Tabela 25 a Tabela 29 apresentam os valores ajustados às constantes das equações (101) e (102) para o sistema S1, S2, S3, S4, e S5, respectivamente.

5.5. Estado de Referência, e Variáveis da Planta de Produção de Etanol

O modelo matemático que descreve o processo é um sistema de equações diferenciais ordinárias de primeira ordem. Na resolução desse problema matemático é necessário ter os valores do estado de referência e das constantes para cada uma das equações.

Na Tabela 32 estão os valores de estado de referência, retirados das unidades industriais, e como critério, a quantidade de produtividade aceitável foi estabelecida dentro da viabilidade econômica e operacional da planta. Os parâmetros do projeto (Tabela 33) foram obtidos a partir da otimização realizada do processo. As outras informações necessárias para a integração do sistema de equações estão nas Tabela 34 e

Tabela 35. Todos os valores mencionados estão referenciados em Andrietta (1994).

Reator	S (g/L)	P (g/L)	X (g/L)	T(°C)	Tc(°C)	Tj(°C)
1	54,24	41,83	29,37	33,50	31,20	30,20
2	21,44	56,42	30,46	33,50	31,30	30,20
3	5,05	63,72	31,00	33,50	31,30	30,10
4	0,88	65,57	31,13	33,50	31,90	29,60

Tabela 32. Estado estacionário de referência

Tabela 33.Parâmetros	do	projeto
----------------------	----	---------

Reator	Área (m ²)	Vol (m ³)	$Vc(m^3)$	Vj (m ³)	Fc (m^3/h)	Fj (m ³ /h)
1	76,361	210,374	20	20	400	400
2	63,242	268,037	20	20	350	350
3	31,061	316,663	20	20	180	180
4	6,809	208,208	20	20	60	60

Tabela 34. Valores das variáveis do processo

Variáveis	Valores
Concentração de ART no mosto	180 g/L
Concentração de células no creme	180 g/L
Concentração de células no reciclo	90 g/L
Concentração de células no vinho delevedurado	3 g/L
Taxa de reciclo	30%
Temperatura fluido resfriamento	28°C

Parâmetros	Valores
ΔΗ	-157,57 kcal/h
ρ	950 kg/m ³
Ср	1 kcal/kg °C
U	3500 kcal/h°C m ²
Pj	1000 kg/m ³
Cpj	1 kcal/kg°C

Tabela 35. Parâmetros do modelo fenomenológico

5.6. Avaliação das Plantas de Produção de Etanol

O estudo do comportamento dos modelos cinéticos na planta industrial de produção de etanol em relação ao rendimento, produtividade e conversão de substrato é de grande importância para definir se os modelos cinéticos desenvolvidos conseguem desempenhar um papel adequado dentro de uma planta virtual otimizada de produção de etanol e representar matematicamente as variáveis do bioprocesso.

Nessa etapa, os dados das variáveis de saída, gerados nas simulações das plantas industriais, são analisados usando os modelos cinéticos dos sistemas S1, S2, S3, S4 e S5, e comparados com os dados de saída de uma planta de primeira geração. Adicionalmente, na avaliação é utilizado o critério do estudo de ANDRIETTA (1994), que considera que a quantidade máxima de açúcares na saída do reator 4 seja de 1 g/L, correspondendo a 99,2 % de conversão de açúcares, sendo a condição utilizada na indústria. As simulações do processo industrial foram realizadas utilizando *Matlab*®, e para resolução do sistema de equações diferenciais ordinárias obtidas na modelagem matemática foi utilizado o método de *Runge-Kutta* de 4ª ordem.

Inicialmente, as simulações foram realizadas para obter os valores das variáveis de saída de cada um dos sistemas. Como resultado, a Tabela 36 apresenta todos os valores das concentrações de etanol, substrato e células para cada um dos reatores, o rendimento, a produtividade e a conversão de açúcares depois de atingir 100 horas, que é o tempo final da simulação.



Figura 42. Perfis de concentração de substrato, células e produtos da planta de produção de etanol do sistema S1

A Figura 42 a, b, e c mostram os perfis cinéticos da simulação nos 4 reatores para o sistema S1. As figuras para os sistemas S2, S3, S4 e S5 estão no Apêndice A. No tempo inicial (t = 0) começa a simulação, podendo-se observar que o sistema inicia nos valores do estado de referência, e logo depois entra no estado dinâmico do sistema até a sua estabilização, que ocorre em torno de 10 horas depois (t = 10 h). Após esse período, o sistema não apresenta nenhuma

variação durante as 100 horas de simulação. Portanto, pode-se averiguar que os sistemas atingem uma estabilização rápida. Os sistemas S1 ao S4 requerem um tempo de aproximadamente 10 horas, e o S5 precisa de um tempo superior a 10 horas.

	S 1	S2	S 3	S4	S5	Andrietta
[] Etanol g/L						
Reator 1	53,04	30,38	41,73	28,53	23,05	41,8
Reator 2	64,44	47,21	58,44	46,36	37,97	56,5
Reator 3	65,73	58,11	62,75	56,30	47,25	63,7
Reator 4	65,83	62,78	63,42	59,15	50,52	65,6
[] Células g/L						
Reator 1	30,18	29,52	29,96	29,19	28,00	28,37
Reator 2	31,14	31,66	31,47	31,09	28,89	30,45
Reator 3	31,26	33,08	31,88	32,15	29,41	30,99
Reator 4	31,27	33,69	31,95	32,45	29,59	31,19
[] Substrato g/L						
Reator 1	29,81	84,88	51,03	79,84	95,50	54,5
Reator 2	3,18	50,35	12,07	35,66	61,82	21,5
Reator 3	0,26	28,38	2,03	10,90	41,08	5,2
Reator 4	0,03	19,12	0,46	3,81	33,80	0,85
Conversão %	99,98	89,37	99,75	97,88	81,22	99,3
Rendimento %	86,9	82,88	83,7	78,1	66,7	86,5
Produtividade g/Lh	7,967	7,59	7,676	7,159	6,115	7,99

Tabela 36. Valores finais de concentração de substrato, células e produtos na simulação da planta de produção de etanol usando os 5 modelos cinéticos e o modelo de Andrietta (1994).

A Tabela 36 mostra a comparação das concentrações de etanol, células e substrato na saída do reator 4 (no estado estacionário) dos sistemas S1- S5 com a os resultados reportados por ANDRIETTA (1994). As concentrações de etanol para os sistemas S1, S2 e S3 foram muito similares com a concentração de etanol reportada por ANDRIETTA (1994), porém, as concentrações de etanol para os sistemas S4 e S5 foram significativamente baixos (59,15 e 50,62 g/L, respectivamente). As concentrações de células para os sistemas S1-S2 variaram de 29,59g/L para S5 até 33,69 g/L para S2, de forma geral, apresentaram valores similares ao valor reportado por ANDRIETTA (1994). Por fim, para a concentração de substrato, apenas os sistemas S1 e S3 apresentaram valores inferior a 1,0 g/L como o reportado por ANDRIETTA

176

(1994) com conversões de 99,8% e 99,75%, respectivamente. Os sistemas S2, S4 e S5 apresentaram valores de 19,12, 3,81 e 33,80 g/L, com conversões de 86,9 %, 97,88 % e 81,22 %, respectivamente. Os valores para S2, S4 e S5 certamente não são os esperados e acarretam grandes perdas de açúcares que poderiam ser transformados em etanol.

Na Figura 43, mostram-se os valores das conversões, rendimentos e produtividades das diferentes plantas de produção de etanol desenvolvidas nesse estudo, comparados com os resultados de ANDRIETTA (1994). A variação do desempenho dos sistemas S1-S5 está relacionada ás condições operacionais do pré-tratamento e hidrolise enzimática. Para ilustrar a dinâmica dos sistemas S1-S5, as Figura 44 a, b e c mostram os perfis das concentrações de etanol, células e substrato em função do tempo em cada um dos reatores.

A partir dos resultados acima, pode-se observar que as plantas de produção de etanol 1G+2G para os sistemas S1-S5 representam de forma adequada o comportamento dinâmico do processo e na maioria dos casos, com um desempenho de fermentação similar ao apresentado por ANDRIETTA (1994) para uma planta 1G. A implementação de um controlador poderia manter os sistemas no *set point* desejado (concentração de substrato de aproximadamente 1,0 g/L no reator 4). Além disso, um controlador ajustado adequadamente minimizaria os problemas das perturbações que estão relacionadas às variáveis de entrada no processo.



Figura 43. Valores de conversão de açúcares, rendimento e produtividade para os sistemas S1-

S5.



Figura 44. Valores das variáveis de saída da planta após atingir estabilidade na simulação: a. Concentração de substrato; b. Concentração de células e c. concentração de etanol

As condições operacionais para o pré-tratamento e hidrólise para cada sistema definiram a qualidade da matéria prima (hidrolisado + melaço) para as fermentações. Em alguns casos (sistemas S1 e S3), poderia ser factível a produção de etanol 1G+2G em plantas de etanol 1G.

5.7. Conclusões

Nesse capítulo, os desempenhos dos modelos cinéticos foram estudados para cinco sistemas diferentes dentro de uma planta de produção continua de etanol, e a partir dos resultados obtidos conclui-se que eles podem ser usados para descrever o bioprocesso sob diferentes condições de temperatura e outras variáveis ajustáveis.

O comportamento dinâmico das variáveis dos sistemas industriais estudados, assim como seus desempenhos, foram semelhantes aos resultados obtidos por ANDRIETTA (1994), e tal fato indica que os resultados obtidos na resolução numérica e implementados no trabalho correspondem a valores próximos das plantas industriais 1G. Apesar do fato de que as simulações tenham sido satisfatórias, os sistemas S2, S4 e S5 têm uma concentração alta de açúcares na saída do último reator e uma produtividade baixa em comparação com os outros sistemas. O desafio do melhoramento da produção de etanol é o ponto de partida para ter um monitoramento e controle robusto que consiga operar, otimizar e controlar a fermentação alcoólica.

Apesar das diferentes dinâmicas do processo 1G e 1G+2G, pode-se concluir que as instalações de produção de etanol 1G podem ser utilizadas para a produção de bioetanol 1G+2G. Com a ressalva que esse é um processo 2G com enriquecimento da 1G, para o caso de só 2G seria necessário outro modelo cinético que represente o modelo e customizar o design.

No próximo capítulo, duas importantes ferramentas serão estudadas para auxiliar nesse processo de monitoramento e controle da fermentação alcoólica: o Sistema de monitoramento por meio das redes neurais artificiais atuando como um *soft-sensor*; e um sistema de controle preditivo baseado em modelo do processo usando redes neurais artificiais. Assim, a planta de produção terá a robustez para absorver os problemas relacionados com as mudanças na corrente de açúcares alimentada.

Referências Bibliográficas

ANDRIETTA, S.R. Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua em escala industrial. In: Galindo, E., Ramírez, O. (Eds.), *Advances in Bioprocess Engineering*. Springer Netherlands, pp. 47–52, 1994.

MELEIRO, L.A. Projeto e aplicação de controladores baseados em modelos lineares, neurais e nebulosos. Biblioteca Digital da Unicamp, 2002.

179

VANZELLA, E., BARICCATTI, R.A., CAMARGO, C.E., NOGUEIRA, V.C., MICUANSKI, M.A. DA C. 2012. Processo Fermentativo na indústria sucroalcooleira 33–43.

CAPÍTULO 6 MODELOS DE INFERÊNCIA DE INFORMAÇÃO USANDO REDES NEURAIS ARTIFICIAIS
6. MODELOS DE INFERÊNCIA DE INFORMAÇÃO USANDO REDES NEURAIS ARTIFICIAIS

6.1. Introdução

Neste capítulo, um sistema de inferência de informação ou *soft-sensor* é proposto com a finalidade de observar o processo fermentativo de forma *online* e fornecer medições precisas sobre as variáveis do sistema, que são necessárias para o sistema de controle NNMPC, que é estudado no Capítulo 7. Esse *soft-sensor* é baseado nas redes neurais artificiais artificiais, RNA, com *estrutura multicamada perceptron* (MLP). O desenvolvimento do *soft-sensor* é uma ferramenta poderosa para obter informação do processo com um baixo custo, e utilizando os sensores de variáveis de fácil medição.

Para o desenvolvimento das RNAs, as medições das fermentações apresentadas no Capítulo 4 foram utilizadas. Nesses experimentos, dois grupos de informações foram coletados; dados *online* e dados *offline*.

As variáveis medidas *online* são pH, vazão de CO₂, temperatura e a capacitância medida pelo *ABER*, para todos os sistemas (S1, S2, S3 e S4), exceto para S5, no qual a turbidez é medida ao invés da capacitância.

As informações *offline*, que são variáveis de difícil medição e, portanto, com tempo longo de obtenção de resultados, são as escolhidas para serem estimadas. Essas variáveis são: concentração de células, *X*; concentração de substrato, *S*; e concentração de produto, *P*. Devido a pequena quantidade de dados experimentais disponíveis, estes foram ajustados às curvas e, em seguida, interpolados, com objetivo de gerar dados suficientes, que requer o treinamento das RNAs. Nessa proposta, as variáveis *online* são as entradas da RNA, e as variáveis *offline* são as variáveis de saída. Finalmente, um conjunto de dados de entrada-saída foram gerados e utilizados para a generalização das RNAs de predição de X, S e P.

No esquema utilizado para a construção das RNAs, diferentes tipos de arquiteturas foram realizados, variando a quantidade de neurônios na camada intermediária e, assim, essas RNAs foram testadas, escolhendo a que apresentava um melhor desempenho.

Os resultados do sistema de monitoração, usando as RNAs, comportam-se de forma adequada e conseguem modelar a informação fornecida, realizando predições adequadas e precisas. Finalmente, o *soft-sensor* demonstra que pode ser utilizado, ajudando no trabalho de controle do processo fermentativo.

6.2. Soft-sensor ou Software sensor

Os *soft-sensors* são instrumentos de medição, que fornecem medidas precisas das variáveis de difícil obtenção, os quais usam informação do próprio processo e medidas disponíveis para melhorar as medições das variáveis. O termo *soft-sensor* é derivado da palavra *software*, devido ao fato de que os modelos de avaliação estão geralmente implementados em computadores, e *sensor*, pelos modelos cumprirem a mesma função de um sensor tradicional, fornecendo informação do processo (LUTTMANN *et al.*, 2012).

O diagrama de blocos, na Figura 45, ilustra a essência do *soft-sensor*, que está constituído pelo bloco do bioprocesso, o qual representa o sensor, ou os sensores, e o bloco do modelo que realiza as estimações.



Figura 45. Esquema geral de um soft-sensor

Os *soft-sensors* fornecem estimativas de variáveis de processo, as quais não podem ser medidas ou não podem ser realizadas com os instrumentos clássicos, ou devido ao elevado custo dos instrumentos de medição.

As vantagens dos Soft-sensors são variadas:

- Proporciona estimativas das variáveis desejadas de forma online;
- Estimativas de baixo custo;
- Realiza estimações utilizando as variáveis disponíveis;
- Pode realizar diferentes estimativas, usando as medições disponíveis em diferentes locais e, posteriormente, correlacioná-las.

Na área de bioprocessos, uma das principais finalidades do uso dos *soft-sensor* é o monitoramento e observação do produto final. Alguns estudos preliminares apresentam resultados bem-sucedidos sobre *soft-sensor* em bioprocessos.

Em RADKE (2002), os modelos híbridos foram estudados, os quais combinavam equações de balanço de massa com redes neurais artificiais para descrever a cinética do processo fermentativo. As medidas secundárias utilizadas no *soft-sensor* são pH, turbidez e Brix.

XIONG *et al.* (2005) propõe um novo *soft-sensor*, que está baseado na mistura de processos *Gaussian* (GP) com *expectation maximization* (EM), para realizar uma estimativa da concentração de leveduras dentro do processo fermentativo, demonstrando que o *soft-sensor* é uma poderosa ferramenta, tanto para monitorar o comportamento de sistemas biológicos de forma *online*, como para o melhoramento do desempenho do controle automático.

6.3. Metodologia

A metodologia para desenvolver esse sensor virtual envolve diferentes etapas, como: a aquisição de dados; ajuste de dados *online* e *offline*; ordenar os pares de informação; construção do modelo de inferência de informação, utilizando as RNAs e, por último, realizar os testes das RNAs. Essa metodologia está apresentada na Figura 46.



Figura 46. Metodologia empregada para a construção do soft-sensor

6.3.1. Aquisição de Dados Durante a Fermentação

Nessa seção, a forma de aquisição dos dados durante os experimentos realizados é apresentada. As fermentações dos sistemas S1, S2 S3 e S4 foram realizadas na configuração em batelada e executadas em um biorreator (capacidade de 1 L) *Bioflo[®]*/ *CelliGen15, Bioreactor. New Brunswick Scientific Co.* (Figura 47). Um sistema de coleta de informação foi ajustado no biorreator, o qual está dividido em medições *offline* e medições *online*.

Para o sistema 5, os dados obtidos no trabalho de mestrado de HERRERA (2012) foram utilizados.



Figura 47. BiorreatorBioflo® / CelliGen15, Bioreactor. New Brunswick Scientific Co.

Medições Online

Na coleta de informação *online*, são usados os sensores de pH, termopar, sonda de DO, sonda de ABER (pF/cm), espectrômetro de massas para análise de gases residuais (*HIDEN ANALYTICAL*), Espectrômetro por Infravermelho Médio (*FTIR ALPHA Bruker e Biocommand*) (*Software* de aquisição de dados). Todos os sensores mencionados foram utilizados nas fermentações para realizar um monitoramento das bateladas, porém apenas algumas variáveis são utilizadas para o desenvolvimento do *soft-sensor*: pH, temperatura, capacitância (ABER) e vazão de CO₂ (espectrômetro de massas para análise de gases) Figura 48. As Figuras com a informação dos dados sensores para cada uma das fermentações estão apresentadas no Apêndice B.

Temperatura

Demonstrou-se que a temperatura é um fator importante no estudo do processo fermentativo, já que todos os parâmetros cinéticos são dependentes dessa variável. Essa variável afeta diretamente a duração da fermentação, a temperatura que está relacionada com as taxas de consumo de açúcares, de crescimento celular e produção de etanol. Nesse estudo de caso são realizadas as fermentações em 30, 32, 34 e 36 °C.



Figura 48. Sensores e equipamentos utilizados na aquisição de dados durante a fermentação A) Sonda de pH B) Sonda de capacitância ou Aber C) Espectrômetro de massas para a análise de gases residuais (HPR 20 EGA HIDEN ANALITICAL)

pН

Os processos metabólicos são tipicamente susceptíveis à pequenas mudanças no pH, portanto, o controle dessa variável é importante para algumas fermentações. As fermentações são realizadas em uma ampla faixa de valores de pH. A levedura caracteriza-se por ter uma tolerância grande à acidez, conseguindo realizar um crescimento em diferentes valores de pH, porém apresenta um efeito negativo no rendimento e na produtividade, com valores menores que 3,5. Um pH baixo apresenta perda de nutrientes, tais como nitrogênio e potássio, e aumenta a sensibilidade da levedura em relação ao etanol, aos ácidos orgânicos e ao SO₂ (*HERRERA et al.*, 2014).

Capacitância

A capacitância (pF/cm) é medida por meio de um monitor de células, da marca *Futura*, que possui a tecnologia baseada no uso da impedância de sinal de radiofrequência, na qual os íons do ambiente e do citoplasma são ordenados em função do sinal de suas cargas em ambos lados da membrana, transformando a célula em um pequeno capacitor, o qual é medido. As

células danificadas ou não viáveis têm a membrana danificada e não produzem sinal. A capacitância está relacionada com a concentração de células viáveis.

Turbidez

Essa medida da interferência óptica está relacionada com a concentração celular já que na medida que o número de células na fermentação aumenta, o espaço livre em que a luz passa se reduz, assim, permite realizar uma correlação (HERRERA *et al.*, 2014). Essa medição é muito utilizada tanto na indústria, como na área científica e, apesar de ter sido desenvolvida há muitos anos, ainda está em vigência para realizar medições da concentração de células nas fermentações. RAINBOW (1968) e RØNNEST *et al.* (2011) utilizam essa medição para conhecer a concentração de células na fermentação.

Vazão de CO₂

Na glicólise, a glicose é convertida em piruvato por meio de uma série de reações, e a energia liberada permanece na forma de moléculas de ATP. Em seguida, o piruvato é transformado em etanol em duas etapas. Na primeira etapa, um grupo carboxila é retirado do piruvato, e libera CO_2 , produzindo uma molécula mais reativa que o acetaldeído. Na segunda etapa, o acetaldeído é reduzido e o etanol é gerado. Assim, para cada molécula de glicose transformada, 2 moléculas de etanol e 2 de CO_2 (NELSON, 2000) são produzidas. Em conclusão, o monitoramento do CO_2 é uma forma indireta de acompanhar a produção de etanol devido a sua relação estequiométrica. Para medição da vazão de CO_2 é utilizado o espectrômetro de massas para a análise de gases residuais, (HPR 20 EGA HIDEN ANALITICAL).

Medições Offline

Na amostragem *offline* do processo, amostras do reator (alíquotas de 5 mL) são retiradas a cada 3 horas aproximadamente, para realizar medições de massa seca com o objetivo de determinar a concentração de células (X), utilizando gravimetria. Outra parte da amostra é utilizada para a determinação das concentrações de açúcares (S) e etanol (P) por cromatografia liquida, HPLC.

A metodologia experimental está detalhadamente descrita no Capítulo 3.

6.3.2. Ajuste de Dados

Após realizar as fermentações e coletar as informações *online* e *offline*, com o intuito de obter uma descrição do processo para cada tempo de amostragem (k), é realizado um conjunto de dados que é utilizado no treinamento, avaliação e teste das redes neurais artificiais, RNA.

Este conjunto de dados está associado em pares de informação, ou seja, os dados de entrada da RNA têm uma informação na saída que descreve o processo no instante de amostragem (k). Com o objetivo de realizar a base de dados, foi definido um t = 60 segundos para cada linha de informação do processo, já que a maioria dos sensores estão realizando amostragem nesse período.

Devido à pequena quantidade de dados gerados de (X), (S), e (P), dados *offline* em comparação com os dados *online*, esses dados foram ajustados à equação (sigmoide-*Boltzman*), e as tabelas com esses ajustes estão apresentadas no capítulo 4 e Tabela 20 – Tabela 22.

Uma vez ajustadas todas as equações, todos os dados pares de entrada são gerados (pH, Temperatura, Capacitância, Fluxo de CO₂) e pares de saída (X, S e P).

6.3.3. Modelagem com Redes Neurais Artificiais

Nessa seção, são apresentadas a estruturas das RNAs utilizadas para realizar a modelagem. Para o treinamento da RNA, utilizou-se uma rede de tipo MLP, com um algoritmo de treinamento de *Levemberg-Marquardt* em conjunto com a regularização *Bayesiana* e *Backpropagation*.

Para cada um dos sistemas de produção de etanol desenvolvidos nesse trabalho (S1, S2, S3, S4 e S5), 3 RNAs são construídas, cada uma objetivando inferir as concentrações de X, S e P, respectivamente. No total, foram construídas 18 RNAs.

Na Figura 49, está representada a estrutura da RNA utilizada para os sistemas S1, S2, S3 e S4. As entradas da rede para esses sistemas são: a temperatura (°C); pH; capacitância (pF/cm); e a vazão de CO₂. As saídas das RNAs são: concentração de substrato, *S*; concentração de células, *X*; concentração de produtos, *P*. Apesar da RNA poder ter múltiplas saídas.

Na Figura 50, está apresentada a estrutura da RNA utilizada para o sistema S5, que é idêntica aos sistemas anteriores, porém foi utilizada a variável de turbidez, a qual está realizando a mesma função de monitorar a concentração de células dentro do reator, assim como é feito com a sonda de capacitância *ABER*. As entradas da rede para esse sistema são: a temperatura (°C); pH; turbidez (%); e a vazão de CO₂. As saídas das RNAs são: concentração de substrato, *S*; concentração de células, *X*; concentração de produtos, *P*.



Figura 49. Configuração de RNA utilizada para a modelagem dos sistemas S1, S2, S3 e S4



Figura 50. Configuração de RNA utilizada para a modelagem do sistema S5

A Tabela 37 apresenta a configuração das RNAs usada como modelo de predição de concentração de X, S e P. As RNAs foram desenvolvidas no programa *Matlab*®.

Capítulo 6. Modelos de inferência de informação usando redes neurais artificiais

Tabela 37. Configuração da RNA para o modelo de predição do sistema S1, S2, S3, S4 e S5

Dados gerados	62.379		
Variável de Entrada	T, pH, Vazão de CO ₂ e capacitância. Turbidez para S5		
Variável de Saída	X, S, P		
Tempo de Treino (h)	1440		
Tempo de Teste (h)	180		
Função Objetivo	SSE		
Função de Ativação	Tangente hiperbólica		

Modelo de RNA de predição do sistema S1, S2, S3, S4 e S5

6.3.4. Treinamento, Avaliação e Teste das RNA

No desenvolvimento das RNAs de todos os sistemas, a base de dados foi dividida em 75 % para realizar o treinamento, 15 % para realizar a avaliação e 10 % para a realização do teste. Esses valores foram escolhidos da base de dados de forma aleatória.

Para o treinamento, validação e teste da RNA no sistema S1, S2, S3, S4 e S5, foram utilizados 13.935, 16.395, 15.993, 16.056 e 6.672 pares de informação, respectivamente.

Na elaboração dos modelos preditivos, diferentes RNAs foram construídas, treinadas, e avaliadas, com o objetivo de escolher a RNA com melhor desempenho na generalização dos dados. Portanto, RNAs foram realizadas com diferentes topologias, com 5, 10, 20 e 30 neurônios na camada intermediária e avaliadas com os critérios MSE, RMSE, valor R e SSE.

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} (\hat{y}_i - y_i)^2$$
(115)

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} (\hat{y}_i - y_i)^2}$$
(116)

$$SSE = \sum_{i=1}^{n} (\hat{y}_i - y_i)^2$$
(117)

6.4. Resultados

6.4.1. RNA de predição de X, S e P no sistema S1

No sistema S1, os valores de MSE, RMSE, valor R e SSE para as RNAs de concentração de X, S e P, com 5, 10, 20 e 30 neurônios, estão apresentados nas Tabelas 38, 39 e 40, respectivamente. Assim, a partir da comparação desses critérios, que é realizado graficamente nas Figuras 52, 54 e 56, em cada umas das RNAs, a estrutura com 30 neurônios na camada intermediária foi escolhida, já que apresentou os valores mais baixos em cada um dos critérios e, por consequência, o melhor desempenho.

No teste das RNAs selecionadas, os valores experimentais (linha azul) são comparados com os valores estimados pela RNA (pontos vermelhos) (Figuras 51, 53 e 55). Os valores de entrada usados no teste da RNA não foram utilizados para o treinamento e a avaliação. Podese observar que as RNAs, em cada um dos casos, realizam predições com uma boa precisão, pois os valores de saída da RNA (valores preditos) acompanham os valores experimentais. Adicionalmente, o valor do erro absoluto da predição de todos os pontos é representado, observando que a grande maioria dos pontos está distribuída no eixo do zero, 0, concluindo-se que a RNA estima o X, S e P com um erro próximo a 0.



Figura 51. Predição da RNA de concentração de células, X, para o sistema S1 com 30 neurônios na camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado RNA (pontos vermelhos)

Tabela 38. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de células, X, construídas para S1

		r	-	
Neurônios	MSE	RMSE	R	SSE
5	0,0180	0,13	0,998	98,3
10	0,0015	0,04	0,998	8,1
20	0,0004	0,02	1,000	2,3
30	0.0002	0.01	1.000	1.2



Figura 52. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de células, X, no sistema S1



Figura 53. Predição da RNA de concentração de substrato, S, para o sistema S1 com 30 neurônios na camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado RNA (pontos vermelhos)

Tabela 39. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de substrato, S, construídas para S1

		1		
Neurônios	MSE	RMSE	R	SSE
5	8,4205	2,9018	1,00	46017,78
10	0,9406	0,9699	1,00	5140,65
20	0,1306	0,3613	1,00	713,52
30	0,0567	0,2381	1,00	309,87



Figura 54. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de substrato, S, no sistema S1



Figura 55. Predição da RNA de concentração de produto, P, para o sistema S1 com 20 neurônios na camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado RNA (pontos vermelhos)

Tabela 40. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de produtos, P, construídas para S1

Neurônios	MSE	RMSE	R	SSE
5	1,4129	1,1887	0,9989	7721,7
10	0,1614	0,4017	0,9999	882
20	0,0373	0,1932	1,0000	203,91
30	0.0274	0,1655	1,0000	149,72



Figura 56. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de células, P, no sistema S1

6.4.2. RNA de Predição de X, S e P no Sistema S2

Os valores de MSE, RMSE, valor R e SSE para as RNAs de concentração de X, S e P, com 5, 10, 20 e 30 neurônios estão apresentados nas Tabelas 41, 42 e 43, respectivamente. Assim, a partir da comparação desses critérios (Figuras 58, 60 e 62), a estrutura com os valores mais baixos em cada um dos critérios foi escolhida em cada umas das RNAs. A RNA de predição de S com 20 neurônios, e as RNAs de predição de X e P de 30 neurônios, respectivamente, na camada intermediária foram as selecionadas.

No teste das RNAs com melhor desempenho, os valores experimentais (linha azul) foram comparados com os valores estimados pela RNA (pontos vermelhos) (Figuras 57, 59 e 61). Os valores de entrada usados no teste da RNA não foram utilizados para o treinamento e a avaliação. Pode-se observar que as RNAs, em cada um dos casos, realizam predições precisas, pois os valores de saída da RNA (valores preditos) acompanham os valores experimentais. Adicionalmente, o valor do erro absoluto da predição é representado, observando que a grande maioria dos pontos está distribuída no eixo do zero, concluindo-se que a RNA estima o X, S e P, com um erro próximo à 0.



Figura 57. Predição da RNA de concentração de células, X, para o sistema S2 com 20 neurônios na camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado RNA (pontos vermelhos)

Tabela 41. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de células, X, construídas para S2

	comb	i uluus pui	u 02	
Neurônios	MSE	RMSE	R	SSE
5	0,0422	0,2055	0,99673	196,2
10	0,0048	0,0692	0,99963	22,2
20	0,0024	0,0489	0,99982	11,1
30	0,0025	0,0499	0,99981	11,6



Figura 58. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de células, X, no sistema S2



Figura 59. Predição da RNA de concentração de substrato, S, para o sistema S2 com 30 neurônios na camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado RNA (pontos vermelhos)

Tabela 42. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de substrato, S, construídas para S2

Neurônios	MSE	RMSE	R	SSE			
5	8,326	2,886	0,9981	38674,9			
10	2,008	1,417	0,9995	9329,0			
20	0,908	0,953	0,9998	4215,7			
30	0,437	0,661	1,0000	2030,1			



Figura 60. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de substrato, S, no sistema S2



Figura 61. Predição da RNA de concentração de produto, P, para o sistema S2 com 30 neurônios na camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado RNA (pontos vermelhos)

Tabela 43. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de produto, P, construídas para S2

Constitutions Para 5-								
Neurônios	MSE	RMSE	R	SSE				
5	5,511	2,348	0,99408	25600				
10	0,500	0,707	0,99946	2321,05				
20	0,169	0,411	0,99982	784,282				
30	0,089	0,299	0,99999	415,348				



Figura 62. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de produtos, P, no sistema S2

6.4.3. RNA de predição de X, S e P no sistema S3

A seguir, os resultados das RNAs com 5, 10, 20 e 30 neurônios na camada intermediária para o sistema S3 são apresentados. Nos resultados obtidos, temos os valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de X, S e P, que estão apresentadas nas Tabelas 44, 45 e 46, respectivamente.

Nas Figuras 64, 66 e 68 são representados os critérios anteriormente mencionados para determinar a RNA com um desempenho adequado. Assim, como resultado foram selecionadas as RNAs de X, S e P, com a estrutura de 30 neurônios na camada intermediária.

No teste realizado nas RNAs com melhor desempenho, os valores experimentais (linha azul) foram comparados com os valores estimados (pontos vermelhos) (Figuras 63, 65 e 67). Pode-se observar que as RNAs realizam predições de forma adequada, já que os valores de saída da RNA (valores preditos) acompanham os valores experimentais. O valor do erro absoluto da predição de todos os pontos é representado, observando que a maioria dos erros estão distribuídos no valor 0.



Figura 63. Predição da RNA de concentração de células, X, para o sistema S3 com 30 neurônios na camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado RNA (pontos vermelhos)

Tabela 44. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de células, X, construídas para S3

	COIL	su uluas para	35		
Neurônios	MSE	RMSE	R	SSE	
5	0,097	0,312	0,9927	521,3	
10	0,020	0,141	0,9985	105,7	
20	0,013	0,116	0,9990	71,5	
30	0,004	0,066	0,9997	23,4	



Figura 64. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de células, X, no sistema S3



Figura 65. Predição da RNA de concentração de substrato, S, para o sistema S3 com 30 neurônios na camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado RNA (pontos vermelhos)

Tabela 45. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de substrato, S, construídas para S3

		r			
Neurônios	MSE	RMSE	R	SSE	
5	42,322	6,506	0,9931	226509,9	
10	6,764	2,601	0,9989	36202,4	
20	1,837	1,355	0,9997	9829,1	
30	1.335	1.155	0.9998	7144.6	



Figura 66. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de substrato, S, no sistema S3



Figura 67. Predição da RNA de concentração de produto, P, para o sistema S3 com 30 neurônios na camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado RNA (pontos vermelhos)

Tabela 46. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de produto, P, construídas para S3

Neurônios	MSE	RMSE	R	SSE
5	7,541	2,746	0,99365	40359
10	0,908	0,953	0,99924	4861
20	0,387	0,622	0,99968	2070
30	0,197	0,444	0,99983	1055



Figura 68. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de produto, P, no sistema S3

6.4.4. RNA de predição de X, S e P no sistema S4

A seguir, os resultados das RNAs para o sistema S4 são apresentados. Das simulações realizadas para as RNAs de concentração de X, S e P, com 5, 10, 20 e 30 neurônios na camada intermediária, obtemos os valores de MSE, RMSE, valor R e SSE, e esses são apresentados nas Tabelas 47, 48 e 49.

Os critérios utilizados para determinar a RNA com melhor desempenho são representados nas Figuras 70, 72 e 74. A partir das figuras anteriores, é fácil diferenciar que as RNAs de X, S e P com a estrutura de 30 neurônios na camada intermediária tem um desempenho melhor quando comparadas com as outras.

Após realizar o teste das RNAs escolhidas, os dados preditos pelas RNA (pontos vermelhos) foram comparados aos valores experimentais (linha azul) (Figuras 69, 71, e 73). Pode-se observar que as RNAs realizam predições de forma adequada já que os valores de saída da RNA (valores preditos) acompanham os valores experimentais.

Nas mesmas Figuras 69, 71, e 73, o valor do erro absoluto da predição é representado, indicando que a distribuição está principalmente no valor 0, mostrando um bom ajuste das RNAs. Esse sistema apresenta maiores valores de erro nas predições em alguns pontos, isso é, devido aos ruídos presentes nos sensores de pH e capacitância. Porém, a RNA consegue realizar estimações adequadas.



Figura 69. Predição da RNA de concentração de células, X, para o sistema S4 com 30 neurônios na camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado RNA (pontos vermelhos)

Tabela 47. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de células, X, construídas para S4

Neurônios	MSE	RMSE	R	SSE
5	0,20	0,44	0,988	1044,9
10	0,04	0,21	0,997	238,4
20	0,02	0,13	0,999	91,1
30	0,01	0,09	1,000	40,1



Figura 70. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de células, X, no sistema S4



Figura 71. Predição da RNA de concentração de substrato, S, para o sistema S4 com 30 neurônios na camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado RNA (pontos vermelhos)

Tabela 48. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de substrato, S, construídas para S4

		I I I I I I I I I I I I I I I I I I I	-		
Neurônios	MSE	RMSE	R	SSE	
5	35,33	5,94	0,994	188320,6	
10	15,35	3,92	0,997	81827,6	
20	5,81	2,41	0,999	30956,3	
30	2,14	1,46	1,000	11425,7	



Figura 72. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de substrato, S, no sistema S4



Figura 73. Predição da RNA de concentração de produto, P, para o sistema S4 com 30 neurônios na camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado RNA (pontos vermelhos)

Tabela 49. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de produto, P,

constituidas para 54					
Neurônios	MSE	RMSE	R	SSE	
5	7,48	2,74	0,993	39884,9	
10	1,94	1,39	0,998	10350,0	
20	0,86	0,93	0,999	4568,7	
30	0,78	0.88	0,999	4162,5	



Figura 74. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de produto, P, no sistema S4

6.4.5. RNA de predição de X, S e P no sistema S5

No sistema S5, os valores de MSE, RMSE, valor R e SSE para as RNAs de concentração de X, S e P, de 5, 10, 20 e 30 neurônios na camada intermediária estão apresentadas nas Tabelas 50, 51 e 53, respectivamente. Assim, a partir da comparação desses critérios realizados nas Figuras 76, 78 e 80, em cada umas das RNAs foi escolhida a estrutura com 30 neurônios, pois, apresentaram os valores mais baixos em cada um dos critérios e por consequência o melhor desempenho.

No teste realizado nas RNAs com melhor desempenho (30 neurônios), os valores experimentais são comparados com os valores estimados pela RNA (Figura 75, 77 e 79). Os valores de entrada usados no teste da RNA não foram utilizados para o treinamento e a avaliação do modelo. Pode-se observar que a RNA, em cada um dos casos, realiza predições com uma boa precisão, pois os valores de saída da RNA (valores preditos) acompanham os valores experimentais. Adicionalmente, o valor do erro absoluto da predição de todos os pontos é representado, observando que a grande maioria dos pontos está distribuída no eixo do zero 0.



Figura 75. Predição da RNA de concentração de células, X, para o sistema S5 com 30 neurônios na camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado RNA (pontos vermelhos)

Tabela 50. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de células, X, construídas para S5

Neurônios	MSE	RMSE	R	SSE
5	9,198	3,033	0,9974	20455,9
10	4,086	2,021	0,99897	9088,15
20	4,150	2,037	0,99907	9229,03
30	1,105	1,051	0,99953	5133,06



Figura 76. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de células, X, no sistema S5



Figura 77. Predição da RNA de concentração de substrato, S, para o sistema S5 com 30 neurônios na camada intermediaria. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado RNA (pontos vermelhos)

Tabela 51. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de substrato, S, construídas para S5

		1			
Neurônios	MSE	RMSE	R	SSE	
5	0,0119	0,109	0,9959	26,4	
10	0,0033	0,058	0,9989	7,4	
20	0,0023	0,048	0,9992	5,1	
30	0,0021	0,046	0,9992	4,7	



Figura 78. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de produto, S, no sistema S5



Figura 79. Predição da RNA de concentração de produto, P, para o sistema S5 com 30 neurônios na camada intermediária. Erro do conjunto de dados. Valor experimental (linha azul). Valor estimado RNA (pontos vermelhos)

Tabela 52. Valores de MSE, RMSE, valor R e SSE das RNAs de concentração de produto, P, construídas para S5

Neurônios	MSE	RMSE	R	SSE	
5	2,086	1,444	0,99748	4639,9	
10	1,632	1,278	0,99803	3630,0	
20	1,057	1,028	0,99873	2350,1	
30	0.706	0.840	0.99915	1569.9	



Figura 80. Comparação dos valores de MSE, RMSE e SSE das RNAs construídas para a concentração de produto, P, no sistema S5

6.5. Discussão

Importantes variáveis são requeridas para serem utilizadas em cálculos para monitorar em tempo real o processo fermentativo. Porém, existe uma falta de sensores que realizem medições precisas de forma *online*. Uma forma de solucionar esse problema é a utilização dos *soft-sensors* que utilizam as RNA (aproximadores universais) como modelo de predição.

O *soft-sensor* apresentado nesse trabalho utiliza variáveis de fácil medição para realizar uma estimativa de variáveis de difícil medição de forma *online*. Adicionalmente, como estimador, é utilizada uma RNA de tipo MLP, com neurônios variáveis na camada intermediária.

Nos resultados das RNAs, pode se observar que as predições realizadas dependem da qualidade das medições realizadas pelos sensores e da associação realizada pelo algoritmo. Nesse estudo de caso, apesar de que algumas das medições dos sensores apresentam ruídos, como é o caso da capacitância e o pH, a RNA consegue aproximar as informações e dar predições com valores de erro baixos. Porém é recomendável diminuir os ruídos para aumentar a qualidade das estimações do *soft-sensor*.

A partir dos resultados obtidos das RNAs de predições de concentrações de X, S, e P, para todos os sistemas S1, S2, S3, S4 e S5, demonstrou-se que as RNAs são capazes de realizar estimações de forma precisa das variáveis desejadas.

O *soft-sensor* proposto pode ser implementado para ser utilizado no processo fermentativo para um ótimo funcionamento e monitoração *online*.

Finalmente, o *soft-sensor* é implementado na planta industrial para enviar informação da saída do reator 4, Se4, e assim o controle NNMPC mantenha o processo dentro dos valores estabelecidos. A Figura 81 apresenta-se o acoplamento do *soft-sensor* dentro do esquema da planta indústria, a função desse é servir de ponte entre a planta industrial e o controlador NNMPC.

Esse controlador NNMPC, usa RNAs como modelos internos de identificação de processo e é demonstrado no próximo capítulo.



Figura 81. Implementação do soft-sensor na planta industrial e controlador NNMPC

6.6. Conclusões

A modelagem do processo de fermentação usando redes neurais artificiais, RNAs, que utiliza variáveis secundárias como entrada (temperatura, pH, vazão de CO₂, capacitância ou turbidez), mostrou-se eficiente nas aproximações das concentrações de X, S e P em comparação com os dados experimentais.

A partir da determinação de concentrações de X, S e P para os sistemas S1, S2, S3, S4 e S5, utilizando a junção de sensores e RNAs, demonstrou-se que o *soft-sensor* é uma ferramenta poderosa para monitoramento e controle dos bioprocessos.

O *soft-sensor* é uma ferramenta poderosa que pode ser utilizada dentro do processo de produção de etanol de forma industrial. Para esse estudo de caso, a utilização do *soft-sensor* seria viável quando o controle preditivo NNMPC estiver instalado dentro da planta industrial. O *soft-sensor* seria a ponte entre a planta e o controlador, forneceria informação ao controle e este atuaria na medida das variações da variável controlada que é alterada pelas perturbações do sistema.

Referências Bibliográficas

NELSON, D. L., COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry, Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch). 2005.

HERRERA, W.E. Desenvolvimento e implementação de um software sensor para monitoração on-line de bioprocessos. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidad Estadual de Campinas, 2012. Dissertação (Mestrado).

HERRERA, W.E., CCOPA, E., MACIEL FILHO, R., 2014. On-Line Measurements and Modelling Study in Second Generation Ethanol Production from Sugarcane. Chem. Eng. Trans. 37, 415–420, 2014.

LUTTMANN, R., Bracewell, D.G., Cornelissen, G., Gernaey, K. V., Glassey, J., Hass, V.C., Kaiser, C., Preusse, C., Striedner, G., Mandenius, C.-F. Soft sensors in bioprocessing: A status report and recommendations. *Biotechnol. J.* 7, 1040–1048, 2012.

RADKE, E., 2002. Desenvolvimento de Modelos Híbridos-Neurais para Fermentação Alcoólica de Técnicas de Otimização do Processo. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidad Estadual de Campinas, 2002. Dissertação (Mestrado).

RAINBOW, C. Institute of brewing analysis committee measurement of yeast concentration. J. Inst. Brew. 74, 427–429, 1968.

RØNNEST, N.P., STOCKS, S.M., ELIASSON LANTZ, A., GERNAEY, K. V. Introducing process analytical technology (PAT) in filamentous cultivation process development: comparison of advanced online sensors for biomass measurement. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1679–1690, 2011.

XIONG, Z., HUANG, G., SHAO, H. On-line estimation of concentration parameters in fermentation processes. J. Zhejiang Univ. Sci. B 6, 530–4, 2005.

CAPÍTULO 7

CONTROLE AVANÇADO APLICADO AO PROCESSO FERMENTATIVO USANDO REDES NEURAIS ARTIFICIAIS

7. CONTROLE AVANÇADO APLICADO AO PROCESSO FERMENTATIVO USANDO REDES NEURAIS ARTIFICIAIS

7.1. Introdução

No capítulo anterior, foi realizado o estudo dos modelos cinéticos em malha aberta, os quais foram aplicados em uma típica planta industrial brasileira, com resultados satisfatórios para as predições e para a representação matemática do processo. Sendo assim, a partir desses resultados, pôde-se observar que as plantas de produção de etanol têm suas próprias dinâmicas, pois cada um dos sistemas contém açúcares C5 e C6 decorrentes de processos de desconstrução diferentes (pré-tratamento e hidrolise enzimática), gerando um comportamento específico no microrganismo e, portanto, os parâmetros cinéticos são diferentes. Por exemplo, os valores das concentrações de açúcares no reator 4 para os sistemas S2, S4 e S5 apresentam valores superiores à 1g/L, o qual é valor de referência para as plantas industriais de primeira geração.

Considerando o que foi mencionado anteriormente e visando o melhoramento do processo, nesse capítulo é proposto um sistema de controle preditivo para operar, otimizar, manter a planta industrial nos valores estabelecidos ou utilizados na indústria, e minimizar os problemas relacionados comas perturbações. Porém, o sistema de fermentação é um problema complexo devido as suas características fortemente não lineares e a sua excessiva quantidade de parâmetros, além da dificuldade de realizar medições das variáveis operacionais (NAGY, 2007; MJALLI e AL-ASHEH, 2005). Devido à estas características, é importante escolher uma ferramenta computacional que consiga ajustar e modelar o sistema não linear.

O controle preditivo baseado em modelo (MPC) é uma das ferramentas mais importantes dentre as técnicas de controle avançado para problemas de multivariáveis, e uma das estratégias de controle mais difundidas na indústria química desde o início dos anos 2000 (SEBORG *et al.*, 2004). Basicamente, essa técnica faz o uso explícito do modelo do processo e medições atuais para prever a saída do processo em instante de tempo futuro. O modelo determina uma sequência de movimentos de controle, minimizando uma função objetivo e respeitando as restrições do problema. Assim, a mudança apropriada na variável de entrada pode ser calculada tanto nas predições quanto nas medições (SEBORG *et al.*, 2004; FERNANDES *et al.*, 2014). Alguns exemplos dessa aplicação estão na literatura, como LEE et al. (2001), HERRERA *et al.* (2016), ZHU *et al.* (2000), MOHD e AZIZ, (2016).

A maioria dos MPC são baseados em modelos lineares devido às numerosas técnicas disponíveis para a identificação, controle e otimização. Porém, muitos dos processos químicos são altamente não lineares e com grandes variedades de condições, e o MPC baseado

em modelos lineares não apresentam o mesmo desempenho. Para esses casos, os modelos "não lineares" do processo são utilizados para as predições, ao invés da utilização do linear. Os controladores preditivos, baseados em modelo não linear - NMPC, geralmente são obtidos usando a integração das equações do modelo analítico do processo. Como consequência, esse procedimento tem muitas desvantagens, pois requer a elaboração do modelo de forma completa e com uma precisão adequada, além de exigir um grande esforço computacional para realizar os processos iterativos nas otimizações (NAGY, 2007).

Essa deficiência mencionada pode ser evitada com as redes neurais artificiais, RNA, uma ferramenta poderosa, que emergiu como um método atrativo para vários controladores, baseados em modelo MPC, pois consegue descrever os modelos dinâmicos sem a necessidade de muito detalhamento e sem prévio conhecimento do sistema (BHAT e MC AVOY, 1989; MJALLI e AL-ASHEH, 2005). Os outros usos das RNA na engenharia química têm sido muito próspero em diferentes aplicações, como detecção e localização de erros, detecção de falhas de controladores, *design* ótimo de processos químicos, processamento de dados e reconhecimento de padrões (NAGY, 2007).

Este capítulo apresenta o uso de redes neurais artificiais RNA, de tipo *feed forward*, para a modelagem dinâmica e controle da concentração de açúcares no efluente da planta industrial *Se4*. O modelo fenomenológico do processo é utilizado para gerar os dados de treinamento das RNA. Assim, diferentes RNA vão ser criadas e treinadas usando o algoritmo de aprendizado *back propagation*. Para os sistemas S1, S2, S3, S4 e S5, RNAs com diferentes números de neurônios na camada intermediária vão ser construídas, para que a partir dos valores dos erros, seja possível a escolha das melhores estruturas, sendo as mais simples possíveis, para evitar altos custos computacionais e o *overfitting*. A robustez do controlador vai ser estudada por meio de mudanças no *set-point*, chamado problema *servo*, e criando perturbações na concentração dos açúcares na entrada *So*.

7.2. Controle Preditivo baseado em Modelo (MPC)

O controle preditivo baseado em modelo (MPC) é uma das ferramentas mais difundidas e importantes das técnicas de controle na indústria química. O MPC refere-se ao algoritmo que usa o modelo do processo para predizer respostas futuras da planta. O algoritmo do MPC é feito para resolver um problema de otimização, para encontrar uma trajetória de controle, que otimiza algum tipo de objetivo de desempenho em um horizonte futuro de previsão. O MPC está representado como um diagrama de blocos na Figura 82. O modelo do processo é utilizado para predizer os valores atuais das variáveis de saída. Os resíduos da diferença entre o valor atual e o valor predito é o sinal de *feedback* para o bloco de predição. Posteriormente, as saídas preditas são utilizadas para as duas ações: cálculo do *set-point* e o cálculo do controlador. As duas ações têm suas respectivas restrições inferiores e superiores. Os pontos de ajuste para os cálculos de controle são obtidos através de uma otimização de uma função de custo (SEBORG *et al.*, 2004).



Figura 82. Diagrama de blocos para o MPC

O objetivo dos cálculos do controle MPC é determinar a sequência das ações de controle por meio da alteração da variável de entrada ou manipulada, e como consequência haverá uma resposta do sistema que se ajusta para o *set-point* de maneira eficiente.

A metodologia de todos os controladores pertencentes à família MPC é caracterizada pela estratégia apresentada na Figura 83, na qual são apresentadas: a saída da variável de controle atual, y; a saída da variável de controle predita, \hat{y} ; a saída manipulada, u; e a saída desejada, w para o momento de amostragem atual, k. O controlador preditivo MPC calcula uma sequência de ações em u(k + i - 1), i = 1, 2, 3, ..., M, ou seja, um valor u(k) atual, e uma sucessão de valores futuros, $\sum_{i=1}^{i=M} u(k + i - 1)$, e após o valor M, o valor de ué mantido constante, para controlar o processo nos próximos M instantes de amostragem, mas só o primeiro u(k) é colocado no sistema para realizar o controle. As entradasu(k + i - 1), i = 1, 2, 3, ..., M, são calculadas de modo que um conjunto de saídas preditivas, (k + i), i = 1, 2, 3, ..., P, atinja o ponto de ajuste de forma adequada. Todo o processo de controle está baseado na otimização de uma função objetivo, equação (118). No próximo instante de amostragem, todo o procedimento é realizado novamente, tendo a estratégia chamada como *horizonte móvel* (SEBORG *et al.*, 2004).
Capítulo 7. Controle avançado aplicado ao processo fermentativo usando redes neurais artificias

A equação (118) é o critério que determina a qualidade da predição fornecida pelo modelo do processo, ou seja, o quanto a saída predita se aproxima da saída desejada, $J = f(\hat{y}, w, u)$.

$$J = \sum_{i=1}^{M} (\hat{y}(k+i) - w(k+i))^2$$
(118)

Assim, a sequência ótima de ações do controlador é obtida através da minimização de *J* em função de *u*.

O modelo matemático do MPC está detalhadamente descrito em CLARKET *et al.* (1987), SEBORG *et al.* (2004) e MAREŠ *et al.* (2011)



Figura 83. Conceito básico para o MPC

Apesar do sucesso dos MPC baseados em modelos lineares na indústria e das muitas formas de identificação do processo, os processos industriais na engenharia química são principalmente "não lineares" e apresentam um ajuste pouco preciso usando as técnicas de identificação lineares. Portanto, isso motivou o estudo da metodologia para os problemas de controle não lineares. A estrutura do esquema de controle é igual à que foi realizada na abordagem linear, porém o modelo interno utilizado para a identificação do processo foi diferente. O controle preditivo baseado em modelo não linear NMPC faz ações de controle, calculadas através da solução de programação não linear em cada instante de amostragem, e como consequência, tem um inerente aumento na complexidade computacional até mesmo quando comparado com os métodos lineares tradicionais.

Na resolução do problema de controle na estratégia de NMPC, o tipo de modelo de processo que deve ser usado para representar o processo é importante. Os modelos determinísticos são uma opção por terem uma grande capacidade de interpretação e aplicabilidade em grandes faixas de operação. Porém, esses têm algumas desvantagens, como a falta de disponibilidade devido a necessidade de um profundo conhecimento do processo e que, frequentemente, contém parâmetros e variáveis que não podem ser medidos ou são de difícil medição. Atualmente, uma alternativa ao uso dos modelos determinísticos são os modelos empíricos ou semi-empíricos, os quais são desenvolvidos a partir dos dados experimentais ou do mesmo modelo determinístico. O algoritmo predominante para a obtenção dos modelos e também para desenvolvimento de estratégias de controle lineares e não lineares são as redes neurais artificiais (RNA)(MELEIRO, 2002).

A literatura concernente ao MPC usando redes neurais é abundante, como por exemplo: HUSSAIN (2001), MJALLI AND AL-ASHEH (2005), MÉSZÁROS AND BAKOŠOVÁ (2008), HUANG *et al.* (2017), (LAWRYŃCZUK, 2011). Uma das aplicações mais comuns das RNA é a aproximação de funções, a qual é referida como sistema de identificação, no contexto do controle de processo, no qual o modelo dinâmico é estabelecido a partir da observação dos dados subministrados de entrada e saída do processo (NAGY, 2007).

7.3. Controle Preditivo baseado em Modelo usando Redes Neurais Artificiais (NNMPC)

O Controle preditivo baseado em modelo usando redes neurais artificiais NNMPC é um controlador que usa a principal característica das RNA, sendo a sua capacidade de aprender e relacionar informação de dados de entrada e saída de qualquer sistema e realizar predições, para captar o comportamento de uma planta não linear, ou seja, a identificação do processo, como é chamado na área de controle. Tais modelos com RNA apresentam a importante propriedade de serem aproximadores universais.

O sistema do NNMPC pode ser observado na Figura 84. Este sistema consiste em 4 componentes: a planta que será controlada; o valor de referência ou *set-point*, *Yr*; a RNA que simula a planta; e o bloco do otimizador, o qual determina a entrada necessária para produzir o comportamento desejado na planta. O algoritmo do NNMPC consiste basicamente na junção do bloco do otimizador e o bloco da RNA.



Figura 84. Diagrama de bloco do sistema de NNMPC e o algoritmo NNMPC

O sistema de controle NNMPC começa com a variável de referência, Yr, que representa o valor de *set-point* do processo. Esse valor entra no bloco de otimização, e este produz um sinal que é usado de duas maneiras: como entrada da planta e como entrada do modelo de RNA. O sinal entra na planta quando o bloco de otimização obtiver a melhor entrada, u(k), e o bloco usará uma função de custo para realizar uma minimização. Quando o sistema estiver realizando as amostragens, a informação que sai do bloco vai para o modelo de RNA para calcular o próximo u(n+1), a partir das predições feitas pelo mesmo modelo de RNA. Assim, quando a função de custo for minimizada, a saída do otimizador enviada na planta.

Para realizar o algoritmo do NNMPC tem que consideram os seguintes passos:

1. O valor de referência ingressa no bloco de otimização para criar uma trajetória

2. Inicia-se o processo com o vetor de entrada prévio, u(k), e prediz o desempenho da planta usando o modelo RNA;

3. Calcula-se o novo valor de entrada na planta, que minimiza a função de custo;

- 4. Repetição dos passos 2 e 3 até que a minimização desejada seja atingida;
- 5. Envio do primeiro valor de entrada para a planta;
- 6. Repetição desse processo para cada tempo de passo.

O desempenho computacional do sistema de controle NNMPC é baseado no algoritmo de minimização, que é escolhido para ser utilizado na otimização. A escolha desse algoritmo é feita sob critérios como número de iterações, precisão da solução e o custo computacional. Existem diferentes métodos que podem ter resultados satisfatórios, como *Non-gradient, Simplex*, e *Succesive Quadratic Programming*.

futura;

A qualidade do modelo que representa a planta afeta a precisão das predições, e, por esse motivo, um modelo adequado para implementar o sistema de controle é necessário. A modelagem com redes neurais artificiais RNA tem demonstrado a capacidade de capturar a dinâmica não linear.

7.3.1. Função de Custo e Otimização

Como mencionado previamente, o algoritmo NNMPC está baseado na minimização da função de custo sobre um horizonte de predição infinita para escolher a melhor combinação de sinais de controle, com a finalidade de minimizar o erro acumulado entre o valor de referência e a saída do processo. A função de custo utilizada é a equação (119).

$$J = \sum_{i=1}^{N_{y}} (y'_{k+1} - set)^{2} + \beta \sum_{i=1}^{N_{u}} (\Delta u)^{2}$$
(119)

No qual, y'_{k+1} é a predição dos valores futuros da saída do processo até o horizonte de predição N_y , *set* é o valor de referência ou *set-point*, β é a constante de penalização para a ação de controle sobre as mudanças na variável manipulada, Δu , e por último, a variável, N_u , que representa o horizonte de controle. O algoritmo de minimização da função de custo está muito bem detalhado em SOLOWAY AND HALEY (1997).

7.3.2. Arquitetura da Rede Neural Artificial

O sistema de controle NNMPC utiliza como modelo de planta uma RNA para predizer o avanço dinâmico da mesma. Portanto, o primeiro passo no sistema de controle é determinar o sistema de identificação do processo realizado pela RNA. O treinamento inicial da RNA deve ser feito de forma *offline*, antes de ser utilizada, usando a informação coletada a partir da operação da planta.

O processo de treinamento está representado pela Figura 85.

Capítulo 7. Controle avançado aplicado ao processo fermentativo usando redes neurais artificias



Figura 85.Diagrama de blocos do treinamento offline na RNA

A Figura 86 apresenta a estrutura da rede neural usada, que é do tipo *Perceptron Multicamadas* (MLP) com uma estrutura de predição futura.



Figura 86.Rede Neural de tipo MLP com a estrutura de predição futura

As entradas da RNA, Yp e u, correspondem aos valores no instante de amostragem da variável controlada e da variável manipulada, respectivamente. Na saída da RNA está localizada Ym (k+1), que seria a predição no tempo de amostragem futuro. No treinamento das redes, o histórico de dados da planta no tempo (k) e na saída (k+1)é apresentado. Os neurônios na camada podem variar de acordo com a qualidade da predição.

7.3.3. Redes Neurais Artificiais

As RNAs têm uma estrutura matemática simples e um número limitado de parâmetros. A principal característica das RNAs é a capacidade de aprender e relacionar informação de dados de entrada e saída de qualquer sistema. Esses tipos de algoritmos são chamados de modelos *caixa preta*, por serem baseados exclusivamente em dados amostrados, assumindo muito pouco ou nada sobre o sistema (Meleiro, 2002).

As RNA *Feed forward*, do tipo *multilayer perceptron* (MLP), com o algoritmo de aprendizagem de *back propagation*, são provavelmente as mais utilizadas nas tarefas de identificação, e se caracterizam por ter todos os neurônios ou *perceptrons* de uma camada conectada com todos os neurônios da camada seguinte, sem ter conexão com os neurônios da mesma camada (NAGY, 2007).

A camada intermediária é uma camada importante, por poder conter diferentes neurônios. A quantidade desses elementos reflete na qualidade das predições, e por esse motivo, a seleção do número desses elementos é muito importante, pois apesar de poucos elementos não gerarem um ajuste ótimo, muitos deles produzem o que se conhece por *overfitting*.

O algoritmo mais utilizado para o treinamento das RNA *feed-forward* é o algoritmo de aprendizagem de *back propagation*. Esse algoritmo pertence à classe dos algoritmos de treino supervisionado, e estes basicamente funcionam por meio da apresentação repetida dos dados de entrada e saída do processo quando estão ajustando os pesos e os viés da rede para minimizar o erro entre os dados de saída da RNA e os dados de saída desejados, os quais são fornecidos pelas equações fenomenológicas do processo.

O algoritmo de aprendizagem de *back propagation* pode ser descrito, principalmente, da seguinte maneira: Inicialização dos pesos da RNA com valores aleatórios; apresentação dos dados de entrada no neurônio de entrada na RNA, permitindo que a informação se propague até a camada de saída, essa etapa é chamada de *forward step*; e o último passo é o processo matemático de passe para atrás, no qual um critério de erro é calculado e se houver uma diferença, esta é propagada de volta na RNA, realizando uma mudança nos pesos e *bias* de cada um dos neurônios que conformam a estrutura neural (NAGY, 2007).

7.4. MPC usando Redes Neurais Artificiais ao Processo de Fermentação de 1G+2G

Nesse capítulo vai ser apresentado o uso de redes neurais artificiais - RNA para a modelagem dinâmica e o controle da concentração de açúcar na saída do efluente do reator 4, *Se4*, dentro da planta industrial de produção de etanol, continuando o que foi estudado anteriormente.

Os modelos matemáticos (modelo determinístico) das plantas industriais são usados para gerar os dados do treinamento *offline* das RNA, de tipo MLP.

Para evitar o *overfitting*e alcançar um adequado desempenho na identificação do modelo com as RNAs, diferentes configurações de redes são realizadas com 5, 10, 20 e 30 neurônios na camada intermediária, para escolher a estrutura com o melhor ajuste e a mais simples possível.

A melhor RNA resultante é utilizada dentro do esquema do MPC para realizar a simulação de controle do esquema NNMPC.

A robustez dessa estrutura de controle NNMPC foi estudada no caso de mudanças na concentração de açúcares na entrada da planta industrial, *So*, e também variações do *setpoint* (Problema *servo*). Este esquema de controle NNMPC foi desenvolvido em conjunto com o trabalho de Mestrado (ASSUNÇÃO, 2017).

7.4.1. Variáveis de Entrada, Saída e Perturbação do Processo

O trabalho de ANDRIETTA (1994) apresenta uma avaliação da sensibilidade das variáveis de processo sobre os parâmetros de saída da planta de produção de etanol. Nesse procedimento, realiza-se a aplicação de um aumento de 10% na variável de processo, e quando atingir o novo estado estacionário do processo, realiza-se uma comparação do valor anterior com o novo valor. A partir dos resultados dessa pesquisa, conclui-se que a variável mais sensível às perturbações das variáveis de entrada é a concentração de ART no efluente do reator 4 (*Se4*). Esta mostrou sensibilidade à concentração de ART no meio de alimentação (S_0) e na vazão de alimentação (F).

No sistema de controle NNMPC desenvolvido nesse capítulo, considerou-se a concentração dos açúcares na entrada do sistema, *So* (kg/m³), como a principal perturbação devido as possíveis variações decorrentes da fonte de carbono ou do processamento realizado para a desconstrução dos açúcares fermentescíveis. A concentração de açúcares no mosto, *So* (kg/m³), é uma variável de entrada no processo, cujo valor nominal é de 180 kg/m³. Nesse estudo de caso, os açúcares provêm de uma mistura de hidrolisado enzimático e melaço de cana-de-açúcar. Essa concentração pode ter uma variação de 5% aproximadamente (170 a 190 kg/m³).

Outra variável é a vazão de alimentação do mosto, Fa (m³/h), que também é uma variável de entrada do processo. Com o intuito de controlar a planta industrial, essa variável foi escolhida para ser a variável manipulada do sistema NNMPC. A faixa de operação foi definida entre 40 (30 para *S2*) e 150 m³/h.

Finalmente, a concentração de açúcares no quarto reator S_4 (kg/m³), foi considerada a variável de saída no processo e a que se deseja controlar.

7.4.2. Análise Dinâmica do Processo

O comportamento dinâmico do processo foi simulado utilizando a modelagem matemática estudada previamente. As Figura 87 e Figura 88 apresentam o comportamento da variável de saída de açúcares no efluente em cada um dos reatores em "malha aberta" para o sistema S1, a partir de perturbações no fluxo de alimentação da planta *Fa*. As figuras para os sistemas S2, S3, S4 e S5 constam no Apêndice C.

Perturbações de tipo degrau foram aplicadas no fluxo de alimentação da planta *Fa*, numa faixa de \pm 20 % do valor inicial para os sistemas estudados (S1, S2, S3 S4, e S5). O comportamento dinâmico do sistema S1 com as perturbações estudadas é mostrado nas Figura 87 e Figura 88, com um tempo total de simulação de 100 horas. A simulação dá início, e logo depois atinge o estado estacionário. Em t = 50 horas, as perturbações foram aplicadas, forçando o sistema a chegarem um novo estado estacionário.

Sistema 1 Sistema 2 Sistema 3 Sistema 4 Sistema 5 Se4 (kg/m^3) Se4 (kg/m^3) Se4 (kg/m^3) Se4 (kg/m^3) Se4 (kg/m^3) -20% 0,011 11,799 0,172 1,687 16,885 Estado Estável 0,030 19,122 0,458 3,809 33,802 20% 0.073 26,071 1.045 9.017 47,265 60 Reator 1 Reator 2 50 Concentração de substrato (Kg/m³) Reator 3 Reator 4 40 30 20 10 0 -10 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 Tempo (h)

Tabela 53. Valores dos estados estáveis para os sistemas S1, S2, S3, S4 e S5

Figura 87. Concentração de substrato na saída dos reatores para os sistemas S1 em malha aberta com perturbação de +20% no Fa

Estas figuras do comportamento dinâmico mostram que a variação do fluxo de entrada do sistema cria significativos efeitos na concentração de açúcares no efluente do reator 4 (*Se4*) para todos os sistemas e especialmente no S2, S4 e S5. A Tabela *53* demonstra os valores

de estado estacionário, os quais os sistemas atingiram depois de serem alterados pelas perturbações.



Figura 88.Concentração de substrato na saída dos reatores para os sistemas S1 em malha aberta com perturbação de -20% no Fa

Analisando a dinâmica dos 5 sistemas propostos (S1, S2, S3, S4 e S5) em malha aberta, observa-se claramente um comportamento não linear em todos os reatores, como também um comportamento invertido em relação ao degrau gerado no processo. A Tabela 53 apresenta os valores da concentração de açúcares no efluente *Se4* atingidos no novo estado estacionário depois da perturbação de $\pm 20\%$ em *Fa*.

7.4.3. Identificação da Rede Neural Artificial da Planta de Produção de Etanol

Nessa seção, o modelo dinâmico das RNA foi obtido, o qual descreve as variações da concentração de açúcares no efluente do reator 4 (*Se4*) como uma função do fluxo de alimentação no sistema (*Fa*) e a variação da concentração de açúcares na entrada do sistema (*So*).

Inicialmente, para a geração dos dados de treinamento das RNA, dois sinais aleatórios foram gerados e aplicados dentro da simulação da planta industrial. O primeiro dos sinais é o Fa e o segundo sinal é *So*, ambos são aplicados na simulação da planta alternadamente para assim observar a resposta do sistema, e nessa etapa são gerados dados suficientes do processo, no qual a dinâmica das variáveis de entrada e saída possa ser captada.

Na metodologia de treinamento das RNA, um passo importante é a determinação do número adequado de neurônios na camada intermediária, o qual está associado com a qualidade de ajuste dos dados. Para fazer isso de forma simples, deve-se criar diferentes RNA começando com valores baixos até chegar em um valor que não tenha uma variação significativa nos ajustes aos dados. Para avaliar a qualidade das RNA, diferentes tipos de erros, que dão informação sobre o desempenho do modelo, são utilizados.

O tipo de estrutura de RNA utilizada está representado na Figura 89, na qual tem os valores de *Fa*, *So* e *Se4* passados como variáveis de entrada e foram associados para valores *Se4* em uma unidade de tempo à frente.



Figura 89. Estrutura inicial da RNA para a identificação da planta industrial

A equação (120) apresenta a RNA MLP de forma geral.

$$S'_{E4}(k+1) = f[Fa(k), So(k), S_{E4}(k)]$$
(120)

Na simulação a partir dos dados gerados na identificação das RNA MLP, que são os valores antigos do fluxo de alimentação, Fa(k-1),...Fa(k-n), concentração de açúcares na entrada do processo, So(k-1),...So(k-n), e da concentração de açúcares no efluente do reator 4, $S_{E4}(k-1),...S_{E4}(k-n)$, mais os valores presentes, $Fa(k), So(k), S_{E4}(k)$, consegue-se predizer o valor $S'_{E4}(k+1)$. Como consequência, para inferir os valores futuros, deve-se obter pelo próprio modelo de predição, realizando essa metodologia conhecida como simulação recursiva. A seguir será representada uma sequência de predições nos tempos (k+2), (k+3), (k+4). A sequência da modelagem recursiva pode ser observada nas equações (121), (122) e (123).

$$S'_{E4}(k+2) = f(Fa(k+1), So(k+1), S_{E4}(k+1))$$
(121)

Capítulo 7. Controle avançado aplicado ao processo fermentativo usando redes neurais artificias

$$S'_{E4}(k+3) = f(Fa(k+2), So(k+2), S_{E4}(k+2))$$
(122)

$$S'_{E4}(k+4) = f(Fa(k+3), So(k+3), S_{E4}(k+3))$$
(123)

Nas Figuras 90, 92, 94, 96 e 98, os dados de entrada e saída do treinamento usado para o treinamento da RNA são apresentados para os sistemas S1, S2, S3, S4 e S5, respectivamente. Esses dados foram gerados a partir de uma simulação de 10.000 horas, com variações de *Fa* e *So*, e tempo de amostragem em cada 0,5 horas, gerando como total 20.000 dados. Previamente, outras simulações foram realizadas com menos tempo de simulação (5.000 horas), mas os resultados não foram adequados quando da implementação.

A Tabela 54 apresenta as informações da configuração utilizada na construção das RNA, sendo a mesma para todos os sistemas estudados.

Na identificação da planta, diferentes RNAs foram construídas, treinadas, e avaliadas, com o objetivo de ter um melhor desempenho na generalização dos dados e evitar o *overfitting*. Assim, RNAs foram realizadas com diferentes topologias, com 5, 10, 20 e 30 neurônios na camada intermediária e avaliadas com os critérios MSE, RMSE, R e SSE.

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} (\hat{y}_i - y_i)^2$$
(124)

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^{n} (\hat{y}_i - y_i)^2}$$
(125)

$$SSE = \sum_{i=1}^{n} (\hat{y}_i - y_i)^2$$
(126)

Tabela 54. Configuração durante a identificação do sistema S1, S2, S3, S4 e S5

Identificação RNA do S1, S2, S3, S4 e S5	
Tempo de simulação	10.000
Dados gerados	20.000
RNA	
Variável de Entrada	Fa(k), $So(k)$, $Se4(k)$
Variável de Saída	Se4(k)
Tempo de Treino (h)	8000
Tempo de Teste (h)	2000
Função Objetivo	SSE
Função de Ativação	Tangente

Na metodologia de determinação do melhor modelo de identificação de processo usando RNA, 4 diferentes estruturas com 5, 10, 20 e 30 neurônios na camada intermediária foram comparadas. Os resultados dessas comparações foram feitos de forma gráfica para identificar qual estrutura apresenta melhor desempenho e a estrutura mais simples possível.

O caso de estudo do sistema S1, os valores de MSE, RMSE, R e o SSE estão na Tabela 55, e os valores representados na Figura 91. A partir dessas informações, a RNA com 10 neurônios na camada intermediária apresentou a melhor generalização quando comparada com as outras topologias, pois apresentou o menor valor de MSE, RMSE e SSE, R, e tem uma estrutura mais simples.

Para o caso de S2, na Tabela 56 estão apresentados os valores dos critérios de avaliação e igualmente representados na Figura 93. A melhor RNA em termos de desempenho foi a que tem 20 neurônios na camada intermediária.

A partir da Tabela 57e da Figura 95, determinou-se que a RNA com topologia ótima para o sistema S3 é a de 10 neurônios, mas a RNA com 5 neurônios tem valores similares e uma estrutura mais simples. Assim, essa foi escolhida para trabalhar junto com o NNMPC. A Figura 95 representa os critérios de seleção para o sistema S3.

Para o sistema S4, a melhor RNA é a que tem a estrutura mais simples, com 5 neurônios foi possível realizar uma identificação ótima do sistema. A Tabela 58 e a Figura 97 apresentam os valores usados para a avaliação desse sistema.

Finalmente, no sistema S5, a RNA escolhida foi a de 10 neurônios na camada intermediária. A partir da Figura 99 é fácil identificar que esta é a que apresenta o melhor desempenho. Os valores de MSE, RMSE, valor R e SSE estão representados na Tabela 59.



Figura 90. Representação dos dados gerados a partir dos sinais aleatórios aplicados na simulação da planta industrial S1. Fa e So (Dados de entrada) e Se4 (Dados de saída)

Tabela 55. Valores do MSE, RMSE, Valor R e o SSE das diferentes RNA geradas na identificação do



Figura 91. Comparação dos valores de MSE, RMSE, SSE e R das diferentes topologias das RNAs no sistema S1



Figura 92. Representação dos dados gerados a partir dos sinais aleatórios aplicados na simulação da planta industrial S2. Fa e So (Dados de entrada) e Se4 (Dados de saída)

Tabela 56. Valores do MSE, RMSE, Valor R e o SSE das diferentes RNA geradas na identificação do sistema S2



Figura 93. Comparação dos valores de MSE, RMSE, SSE e R das diferentes topologias das RNAs no sistema S2



Figura 94. Representação dos dados gerados a partir dos sinais aleatórios aplicados na simulação da planta industrial S3. Fa e So (Dados de entrada) e Se4 (Dados de saída)

Tabela 57. Valores do MSE, RMSE, Valor R e o SSE das diferentes RNA geradas na identificação do sistema S3



Figura 95. Comparação dos valores de MSE, RMSE, SSE e R das diferentes topologias das RNAs no sistema S3

16



Figura 96. Representação dos dados gerados a partir dos sinais aleatórios aplicados na simulação da planta industrial S4. Fa e So (Dados de entrada) e Se4 (Dados de saída)





Figura 97.Comparação dos valores de MSE, RMSE, SSE e R das diferentes topologias das RNAs no sistema S4



Figura 98.Representação dos dados gerados a partir dos sinais aleatórios aplicados na simulação da planta industrial S5. Fa e So (Dados de entrada) e Se4 (Dados de saída)

Tabela 59. Valores do MSE, RMSE, Valor R e o SSE das diferentes RNA geradas na identificação do



Figura 99 Comparação dos valores de MSE, RMSE, SSE e R das diferentes topologias das RNAs no sistema S5

O teste das RNAs foi realizado utilizando 20% dos valores totais dos dados gerados a partir dos sinais aleatórios aplicados à simulação da planta industrial. Assim, aproximadamente 2.000 horas do histórico do processo ou 4.000 amostras foram utilizadas para tal fim. Esses valores foram separados dos que foram utilizados no treinamento da RNA. Os dados escolhidos anteriormente no teste foram aplicados na RNA e as predições foram obtidas. Esses valores de predições devem ser comparados com os valores obtidos na simulação da planta.

Os resultados dos testes estão apresentados na Figura 100 a Figura 104. Os valores normalizados de Se4, obtidos na simulação da planta, e os valores normalizados preditos pela RNA com melhor desempenho (número ótimo de neurônios da camada intermediária) estão apresentados nessas figuras. Portanto, pode-se observar que o modelo de RNA desenvolvido realiza predições com uma alta precisão, pois os valores preditos acompanham de forma adequada os valores da simulação da planta. Dessa forma, baseando-se nos resultados do método gráfico e dos critérios de avaliação das RNA, é possível observar a excelente capacidade de generalização de informação da RNA. Adicionalmente, gerou-se o gráfico do erro de predição ponto a ponto, o qual é a subtração do valor Se4 da simulação da planta menos o valor de Se4 predito pela RNA. Estes valores devem ser principalmente distribuídos na faixa de 0.

Em conclusão, todos os modelos RNA desenvolvidos têm um excelente ajuste, dando predições com grande precisão, e podendo, assim, serem utilizados como modelo interno no controle NNMPC.



Figura 100. Desempenho da generalização da RNA ótima do S1. Valor Simulação (Linha azul). Valor RNA predito (pontos vermelhos)



Figura 101. Desempenho da generalização da RNA ótima do S2. Valor Simulação (Linha azul). Valor RNA predito (pontos vermelhos)



Figura 102. Desempenho da generalização da RNA ótima do S3. Valor Simulação (Linha azul). Valor RNA predito (pontos vermelhos)



Figura 103. Desempenho da generalização da RNA ótima do S4. Valor Simulação (Linha azul). Valor RNA predito (pontos vermelhos)



Figura 104. Desempenho da generalização da RNA ótima do S5. Valor Simulação (–). Valor RNA predito (---)

7.5. MPC baseado no Modelo de RNA para o Controle das Fermentações

No esquema de controle do NNMPC, a predição do comportamento do processo no futuro é necessária. O modelo de RNA treinado da forma "passo adiante" pode ser usado repetidas vezes para obter predições no futuro (k) ou ainda mais futuros à frente (k+1), (k+2), (k+n). O NNMPC realiza ações rápidas de controle, já que o processo de predição com RNA é de computação rápida.

Uma vez que o modelo de RNA com a melhor generalização é identificado, esse pode ser utilizado dentro do esquema de controle preditivo, NNMPC, para realizar as predições dentro dos cálculos das ações de controle. A estrutura do controle proposto nesse estudo está apresentada na Figura 105.



Figura 105. Esquema de controle do NNMPC no processo fermentativo

Em cada tempo de amostragem, o valor atual de *Se4*(k) é medido, e simultaneamente os valores passados de *Se4*(k-1), *Se4*(k-2), *Se4*(k-n) são considerados. A ação de controle próxima é calculada resolvendo o problema de otimização. O controle preditivo NNMPC utiliza o modelo de predição para escolher a melhor combinação de sinais de controle, com a finalidade de minimizar o *erro quadrado* acumulado entre o valor de referência e a saída do processo. Um algoritmo não linear de otimização é utilizado na escolha dos sinais.

Nesse trabalho, pelo fato de lidar com RNA, o método dos pontos interiores para a programação linear foi utilizado, e tal algoritmo está situado atualmente nos mais eficientes e robustos métodos de otimização quando há restrições. A função objetivo é a mesma que foi apresentada previamente na equação (119).

Uma vez que o controlador NNMPC foi acoplado dentro da planta, a robustez dele foi testada com problemas de tipo regulador e problemas *servo*.

As perturbações aplicadas no processo estão demonstradas em seguida:

• Em t = 0 h, a simulação inicia em malha aberta;

• Problema *servo*. O controlador foi programado para atuar a partir do tempo t =

20 h. O controlador lida com o problema *servo* programado para o valor de *set-point* de 1 kg/m³ em *Se4*;

• Na primeira perturbação, em t = 50 h, ocorre uma repentina diminuição de 5 kg/m³ na concentração do substrato na entrada *So*, e o novo valor de *So* é 175 kg/m³;

• Depois de 50 horas de simulação do sistema, quando o mesmo atinge o estado estacionário, uma segunda perturbação é introduzida no processo em t = 100 h. Assim, houve um incremento de 175 kg/m³ para 185 kg/m³;

• Problema *servo*. Um último teste no controle foi realizado em t =150 h, pois é mudado o *set-point* para 2 kg/m³, e, assim, o controle lida com o problema *servo*.

As perturbações anteriores foram aplicadas para os 5 sistemas, tendo as respostas de cada um deles demonstradas a seguir.

7.5.1. Processo de Controle para S1

A simulação da planta industrial acoplada ao NNMPC está representada na Figura 106. Na simulação, pode-se observar a dinâmica de 3 variáveis importantes: *Fa*, *So* e *Se4*. Esta simulação foi realizada em um tempo total de 200 horas e as perturbações mencionadas foram aplicadas.

Para o Sistema S1, em t = 0 h, o processo está em malha aberta. *Fa* tem um valor de 100 m³/h, e *So* inicial é 180 kg/m³. Em malha aberta, o processo atinge um estado estacionário de *Se4* de 0,25 kg/m³. Em t = 20 h, o controle é ligado e o processo começa a trabalhar em malha fechada. A Figura 106 mostra os movimentos do controle, podendo observar que quando este é acionado, o *Fa* aumenta abruptamente, alcançando um pico máximo, e depois estabiliza no novo valor. Isso ocorre com o objetivo de trazer o processo para o *set-point*, 1 kg/m³, e dessa forma, *Fa* passa de 100 para 138,6 m³/h.

Na primeira perturbação, a diminuição abrupta de *So* gera um grande efeito na variável *Se4*, como também na produtividade e no rendimento, como é descrito na Figura 107. O sistema de controle gera a ação e traz o processo novamente para o *set-point* depois de um incremento no *Fa*, e o seu novo valor passa a ser 147,4 m³/h.

Na segunda perturbação, 50 horas depois, com um sistema em estado estacionário, o *So* ingressa no sistema, aumentando de 175 para 185 kg/m³. O controle traz de volta o processo para o valor de *set-point* e muda o valor de *Fa*, para 130,42 m³/h, sendo um valor mais baixo que o anterior.

Um último teste para o controle é um problema *servo*, no qual é mudado o *set-point* para 2 kg/m³. Destaca-se que o controle é capaz de seguir esse novo *set-point* com a variação de *Fa* de 130, 42 para 147, 43 m³/h.

Outro ponto importante a ser observado é o comportamento do rendimento e da produtividade ao longo da simulação (Figura 107). O valor médio do rendimento no primeiro *set-point* foi de 88,77 %, e no segundo *set-point*, o valor aumentou para 91,23 %. Durante a simulação, o rendimento manteve-se estável quando o estado estacionário era atingido, e esse parâmetro era afetado e apresentava variações apenas nos momentos das perturbações. Os resultados apresentam que controlando *Se4*, o rendimento também é controlado indiretamente.

A produtividade também é afetada por todas as perturbações simuladas no sistema. Esse valor inicia com 7,98 kg/m³h em malha aberta, já em malha fechada inicia com um valor médio de 11,25 kg/m³h no primeiro *set-point*, e 12,67 kg/m³h no segundo. Para este estudo de caso, a produtividade foi afetada de forma positiva pelas variações de *Fa*.



Figura 106. Entradas e saídas da simulação para o processo fermentativo S1 em malha fechada



Figura 107. Respostas do rendimento (%) e produtividade da simulação para o processo fermentativo em malha fechada

7.5.2. Processo de Controle para S2

As entradas e a saída da simulação da planta industrial acoplada ao controlador NNMPC está representada na Figura 108. Na simulação, a dinâmica de 3 variáveis importantes pode ser observada: *Fa*, *So* e *Se4*. Esta simulação foi realizada em um tempo total de 200 horas e as perturbações mencionadas foram aplicadas.

Inicialmente, o Sistema S2, em malha aberta, atinge o estado estacionário com um valor de *Se4* de 28,02 kg/m³, *Fa* de 100 m³/h e *So* de 180 kg/m³. A ação do controle atua em t = 20 h, com um *set-point* de 1 kg/m³. A variável de saída, *Se4*, é conduzida para o valor de referência por meio da mudança do *Fa*, e assim o novo valor de *Fa* é 30 m³/h, que é o valor mais baixo dentro da restrição do problema.

Em t = 50 h, a primeira perturbação entra no sistema, e o controle atua mantendo a variável de saída no *set-point*, variando o *Fa* e atinge o valor de 34,57 m³/h. No tempo t = 100 h, a segunda perturbação é imposto no processo, e o controle tenta manter o processo no *set-point*, e realiza mudanças no *Fa* até seu valor mínimo de 30 m³/h. O sistema, nessa seção da simulação, não atinge o valor do *set-point* e tem um *offset* de 0,9.

Um último problema *servo* é ingressado no sistema. O *set-point* é mudado de 1 para 2 kg/m³, e novamente o controlador realiza uma ação que atua na *So*, modificando *Fa*, porém esse é o mesmo valor antes da perturbação, sendo o valor mínimo da restrição. Assim, nas condições de *So* de 185 kg/m³ e um *set-point* de 2 kg/m³, o valor de *Fa* que leva o processo para o valor desejado da variável de saída é 30 m³/h.

O comportamento do rendimento e da produtividade ao longo da simulação é apresentado na Figura 109. O valor final do rendimento foi 91,4 %, observando-se que este parâmetro foi influenciado pelas perturbações aplicadas durante a simulação. O rendimento é controlado indiretamente pelo controlador de *Se4*.

A produtividade tem um efeito drástico, decrescendo de 7,58 kg/m³h para um valor médio, ao longo da simulação, de 2,64 kg/m³h. Nesse estudo de caso, o controlador tem um efeito negativo para a produtividade, pelo empenho despendido para melhorar o *Se4* e o rendimento.



Figura 108. Entradas e saídas da simulação para o processo fermentativo S2 em malha fechada



Figura 109. Respostas do rendimento (%) e produtividade da simulação para o processo fermentativo S2 em malha fechada

7.5.3. Processo de Controle para S3

Para o sistema S3, *Fa*, *So* e *Se4* estão representados na Figura 110, durante a simulação da planta industrial, acoplada ao esquema de controle NNMPC. Em t = 0 h, o Sistema S3, em malha aberta, atinge o estado estacionário com um valor de *Se4* de 2,04 kg/m³, *Fa* de 100 kg/m³ e *So* de 180 kg/m³. O controle atua em t = 20 h, com um *set-point* de 1 kg/m³, com problema *servo*, trazendo a variável de saída, *Se4*, para o valor de referência por meio da mudança do *Fa*, e assim o novo valor de *Fa* é 80,88 m³/h.

No tempo t = 50 h, a primeira perturbação ($So = 175 \text{ kg/m}^3$) ingressa na simulação, e o controle atua mantendo a variável de saída no *set-point*, variando o *Fa*, atingindo o valor de 88,55m³/h. Esta mudança pode ser observada na Figura 110.

Em t = 100 h, a segunda perturbação ingressa no processo. O controle mantém o processo no *set-point*, mas realiza mudança no *Fa*, e o seu novo valor é 73,2 m³/h.

Uma última perturbação, do tipo problema *servo*, é aplicada em t = 150 h, e o *setpoint* é modificado de 1 kg/m³ para 2 kg/m³. O controlador conduz o sistema para o novo valor de 2 kg/m³ em *Se4*, e o *Fa* para 90,59 m³/h.

A Figura 111 apresenta os comportamentos do rendimento e da produtividade no sistema S3. O valor médio do rendimento durante todo o processo foi de 83,88 %. O estado estacionário desse parâmetro manteve-se constante durante quase toda a simulação, apenas mostrando abruptas variações na entrada das perturbações no sistema.

A produtividade durante a simulação é altamente afetada pelas diferentes perturbações. No tempo inicial, a produtividade atinge o valor de 7,69 kg/m³h, seu valor máximo. Quando o controle entra em funcionamento, o valor diminui para 6,31 kg/m³h. Na primeira perturbação, a produtividade é de 6,86, e depois da segunda perturbação, é de 5,70, seu valor mais baixo. Depois do problema *servo*, o valor aumenta para 6,86. A produtividade é influenciada principalmente pelo *Fa*. Nesse estudo de caso, o valor de *Fa* diminui pela ação do controlador, para trazer o sistema ao valor de *set-point*.



Figura 110. Entradas e saídas da simulação para o processo fermentativo S3 em malha fechada



Figura 111. Respostas do rendimento (%) e produtividade da simulação para o processo fermentativo S3 em malha fechada

7.5.4. Processo de Controle para S4

A simulação da planta industrial acoplada ao controlador desenvolvido é apresentada na Figura 112, da mesma forma que os sistemas anteriores.

Inicialmente, a simulação do sistema S4 está em malha aberta e atinge o estado estacionário com um valor de *Se4* de 11,04 kg/m³. A ação do controle atua em t = 20 h, lidando com o problema *servo*, com um *set-point* de 1 kg/m³. Nesse primeiro problema *servo*, o controlador faz coincidir o *Se4* com o *set-point* de forma exata, por meio da mudança do *Fa* na entrada. O novo valor de *Fa* é menor que o valor anterior, *Fa* = 50,77 m³/h.

A primeira perturbação de *So* ingressa no sistema no tempo de 50 horas, e posteriormente, o controle rejeita a perturbação, variando o *Fa*, atingindo um novo estado estacionário, $Fa = 53,86 \text{ m}^3/\text{h}$.

A segunda perturbação ingressa no processo, e o controle mantém o processo no *set-point*, mas realiza novamente uma mudança no *Fa*, atingindo o novo estado estacionário, com uma diminuição de 47,46 m³/h.

Um último problema *servo* é colocado no sistema, e novamente, o NNMPC atua de forma precisa e coincide o *Se4* com o *set-point* de 2 kg/m³. O novo valor de *Fa* é maior que o anterior, 55,46 m³/h. As perturbações, externas e internas, no controlador, mostrou que este tem uma capacidade excelente para rejeitar as perturbações, e da mesma forma, o problema *servo* teve um ótimo comportamento.

A Figura 113 mostra o comportamento do rendimento e da produtividade ao longo da simulação. Em relação ao rendimento, as perturbações do sistema claramente o afetam, porém sem o controle de *Se4*, o rendimento não teria atingido os valores de 81,79 %, 81,99 %, 82,10 % e 81,69 %, após cada uma das perturbações aplicadas na simulação. Ao realizar o controle da variável *Se4*, realiza-se indiretamente o controle do rendimento.

A produtividade é profundamente afetada pela sua estreita relação com o *Fa*. Na primeira perturbação, a produtividade desloca-se para um valor inferior, de 2,98 kg/m³h. Posteriormente, na primeira e na segunda perturbação, esta chega ao valor de 3,63 e 3,83 kg/m³h. Na última perturbação, o problema *servo*, a produtividade atinge o valor máximo, de 4,22 kg/m³h.



Figura 112. Entradas e saídas da simulação para o processo fermentativo S4 em malha fechada



Figura 113. Respostas do rendimento (%) e produtividade da simulação para o processo fermentativo S3 em malha fechada

7.5.5. Processo de Controle para S5

A simulação do processo submetido à diferentes perturbações estão representadas na Figura 114. A simulação começa em malha aberta e atinge o estado estacionário com um valor de *Se4* de 40,6 kg/m³, e os valores nominais de *Fa* e *So* se mantêm. O controle é ligado em t = 20 h, com um *set-point* de 1 g/L, com problema *servo*. O controlador traz a variável de saída, *Se4*, para o valor de referência por meio da mudança do *Fa*, com um novo valor de 40,0 m³/h.

Em t = 50 h, a perturbação entra no sistema, e o controle atua mantendo a variável de saída no *set-point* por meio da variação do *Fa*, e atinge o valor de 41,89m³/h. Em t = 100 h, a segunda perturbação ingressa no processo, e o controle leva o sistema para o *set-point*, fazendo com que *Fa* atinjam valor mínimo de 40,0 m³/h, dentro da restrição dessa variável. Porém, o valor *Se4* tem um *offset* de 0,3 g/L.

No último problema *servo*, a perturbação entra no sistema no tempo de 150 horas. O novo *set-point* é 2 kg/m³. O controlador demonstra que pode lidar com esse problema, levando o *Se4* para o valor de *set-point*. O *Fa* final é maior que o valor anterior de 43,53.

A Figura 115 mostra o comportamento do rendimento e da produtividade ao longo da simulação. Em relação ao rendimento, as perturbações do sistema claramente o afetam, porém sem o controle de *Se4*, o rendimento não teria atingido o valor médio de 83,16 %, ao longo da simulação, em comparação ao valor de 67,06 %, em malha aberta. Os resultados mostram que ao realizar o controle da variável *Se4*, realiza-se indiretamente o controle do rendimento.

Em malha aberta, a produtividade chega ao estado estacionário de 6,14 kg/m³h. Após o início do trabalho do controlador, pelo fato de ter um *set-point* de 1 kg/m³, o controle diminui drasticamente o valor de *Fa* e afeta diretamente a produtividade, caindo para o valor de 3,12 kg/m³h. Posteriormente, a produtividade é afetada com as perturbações, mas não tem uma variação muito grande, permanecendo no valor médio de 3,2 kg/m³h.

Na primeira perturbação, obtém-se um valor inferior de 3,12 kg/m³h. Em seguida, na primeira e na segunda perturbação, chega ao valor de 3,22 e 3,35 kg/m³h. Na última perturbação, o problema *servo* atinge o valor máximo, de 3,21 kg/m³h.



Figura 114. Entradas e saídas da simulação para o processo fermentativo S4 em malha fechada



Figura 115. Respostas do rendimento (%) e produtividade da simulação para o processo fermentativo S3 em malha fechada

7.6. DISCUSSÃO

Os resultados mostram que o sistema NNMPC tem o potencial para ser aplicado no processo, absorvendo os distúrbios das variações de 5 processos diferentes de desconstrução do material lignocelulósico e solubilização de açúcares. Adicionalmente, o controlador consegue conduzir o problema *servo* aplicado no sistema para os *set-points* desejados.

A variável *Se4*, o rendimento e a produtividade são afetados em cada perturbação que entra no sistema de fermentação.

Finalmente, é importante destacar que o rendimento do processo é controlado indiretamente quando o *Se4* é regulado. Porém, pode apresentar comportamentos pobres em relação à produtividade, especialmente quando as perturbações entram no processo.

Por esse motivo, é importante controlar o processo desde o ponto de vista do seguimento da produtividade e do rendimento.

7.7. CONCLUSÕES

A partir dos modelos cinéticos desenvolvidos no **capítulo 4** e com a modelagem da planta industrial no **capítulo 5**, foi possível estudar o comportamento dinâmico do processo fermentativo. Essa análise foi necessária para a obtenção do controle preditivo, baseado em modelo usando as RNA.

Os resultados apresentados nesse capítulo mostram que o esquema de controle MPC, utilizando uma RNA treinada, como modelo interno, da forma "passo a diante", é um sistema de controle promissor que consegue manipular as perturbações geradas pela qualidade da matéria-prima e do processo de solubilização de açúcares fermentescíveis. Além disso, o esquema de controle leva o processo para o *set-point* estabelecido. Por conseguinte, é comprovado de forma contundente que o uso de RNA dentro do esquema de controle é uma ferramenta poderosa e robusta.

O esquema de controle proposto pode controlar o rendimento do processo por meio do ajuste da variável *Se4*. Porém, é importante realçar que podem geradas produtividades baixas.

Como trabalho futuro, pode-se realizar um controle que esteja acoplado em um sistema de otimização de variáveis de processo, para que haja sempre a busca pelo melhoramento do processo, ao invés de um pré-definido ponto de operação ótima.

Referências Bibliográficas

ANDRIETTA, S.R. Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua em escala industrial. In: Galindo, E., Ramírez, O. (Eds.), Advances in Bioprocess Engineering. Springer Netherlands, pp. 47–52, 1994.

ASSUNÇÃO, F. L. Desenvolvimento de um Controle Preditivo Baseado em Modelo de Rede Neural Artificial em um Processo de Fermentação Contínua. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidad Estadual de Campinas, 2017. Dissertação (Mestrado)

BHAT, N., MC AVOY, T. Use of Neural Nets For Dynamic Modeling and Control of Chemical Process Systems. *1989 Am. Control Conf.* 1342–1348, 1989.

CLARKET, D.W., MOHTADIT, C., TUFFS~, P.S. Generalized Predictive Control Algorithm* Part I. The Basic. Automatica 23, 137–148, 1987.

FERNANDES, S., CAVALCANTE, C.B., DE SOUSA, B. V, BISPO, H., SILVA, J.N. Controle por Matriz Dinâmica em Malhas de Dual Composição em Colunas de Destilação. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Florianopolis, pp. 1–8, 2014.

HERRERA, W.E., RIVERA, E.C., ALVAREZ, L.A., TOVAR, L.P., TAMAYO, S.R., YAMAKAWA, C.K., BONOMI, A. Modeling And Control of a Continuous Ethanol Fermentation Using a Mixture of Enzymatic Hydrolysate and Molasses from Sugarcane. Chem. Eng. Trans. 50, 169–174, 2016.

HUANG, Y., WANG, H., KHAJEPOUR, A., HE, H., JI, J. Model predictive control power management strategies for HEVs: *A review. J. Power Sources* 341, 91–106, 2017.

HUSSAIN, M.A. Adaptive inverse model control of a continuous fermentation process using neural network. *Application of Neural Networks and Other Learning Technologies in Process Engineering Imprerial College Press*. 2001.

ŁAWRYŃCZUK, M. Online set-point optimisation cooperating with predictive control of a yeast fermentation process: A neural network approach', *Engineering Applications of Artificial Intelligence*. Pergamon, 24(6), pp. 968–982, 2011.

LEE, J.H., NATARAJAN, S., LEE, K.S. A model-based predictive control approach to repetitive control of continuous processes with periodic operations. *J. Process Control* 11, 195–207, 2001.

MAREŠ, J., DOLEŽEL, P., HRNČIŘÍK, P. Artificial Neural Network – Possible Approach to Nonlinear System Control. *Ind. Control Eng. Appl*, 2011.

MELEIRO, L.A. *Projeto e aplicação de controladores baseados em modelos lineares, neurais e nebulosos.* Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidad Estadual de Campinas, 2002. Tese (Doutorado).

MÉSZÁROS, A., BAKOŠOVÁ, M. Inverse Model Based Neural Controllers with Adaptive Integral Part *16th Mediterranean Conference on Control and Automation*. 303–308. 2008.

MJALLI, F.S., AL-ASHEH, S. Neural-Networks-Based Feedback Linearization versus Model Predictive Control of Continuous Alcoholic Fermentation Process. *Chem. Eng. Technol.* 28, 1191–1200, 2005.

MOHD, N., AZIZ, N. Performance and robustness evaluation of Nonlinear Autoregressive with Exogenous input Model Predictive Control in controlling industrial fermentation process. *J. Clean. Prod.* 136, 42–50, 2016.

NAGY, Z. K. Model based control of a yeast fermentation bioreactor using optimally designed artificial neural networks. *Chem. Eng. J.* 127, 95–109, 2007.

SEBORG, D.E., THOMAS, F.E., DUNCAN A, M. Process Dynamics and Control Seborg et al 2004.

SOLOWAY, D., HALEY, P.J. Neural Generalized Predictive Control: A Newton-Raphson Implementation NEURAL GENERALIZED PREDICTIVE CONTROL A Newton-Raphson Implementation. 1997.

VON ZUBEM, F., ATTUX, R. Redes Neurais. Slides Discip. Redes Neurais, 2010.

ZHU, G.-Y., ZAMAMIRI, A., HENSON, M.A., HJORTS, M.A. Model predictive control of continuous yeast bioreactors using cell population balance models. *Chem. Eng. Sci.* 55, 6155–6167. 2000.
CAPÍTULO 8

COTREATMENT

8. COTREATMENT-AIDED FERMENTATION OF SUGARCANE BAGASSE USING MONO AND COCULTURES OF THERMOPHILIC BACTERIA

Abstract

This study investigated a transformative approach to overcome the recalcitrance barrier lignocellulose for the conversion into bioethanol through a technology called cotreatment – mechanical disruption of lignocellulosic feedstock during fermentation. Combining cotreatment with cellulolytic microorganism has the potential to be a lignocellulose processing technology without the need for pretreating the feedstock or added cellulose during the fermentation process. Here *Clostridium thermocellum* a thermophilic Gram positive that can hydrolyze (lingo)cellulose and ferment released hexoses into ethanol was used together with continuous ball milling. When C. thermocellum is grown in the presence of Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum, which is able to ferment both hexose and pentose sugars released in the hydrolysis by the cellulose-degrading enzymes, both microorganisms can convert a majority of the carbohydrates contained in the biomass of native plants or crop wastes. The main objective was to evaluate the performance of the sugarcane bagasse with the Cotreatment. Two fermentation configurations were set up; one with mechanical disruption and one without mechanical disruption (control fermentation). Additionally both fermentation conditions were tested with culture of C. thermocellum and a co-culture of C. thermocellum and T. thermosaccharolyticum. An initial substrate loading of 5 g glucan /L of sugarcane bagasse was used in all the experiments with a chemical defined minimal medium at a temperature of 55 °C. The results at the cotreatment fermentation are a conversion of glucan after 5 days of $77\% \pm 0.0083$ for *C.thermocellum* and $97,8\% \pm 0,004$ for co-culture of *C.thermocellum* with *T. thermosaccharolyticum*. The results related to the batch fermentation essays (without cotreatment) obtained show the conversion of glucan after 7 days was 50% \pm 0.82 for *C.thermocellum*, 49% \pm 0,019 for co-culture of *C.thermocellum* and *T*. thermosaccharolyticum.

Keywords: Cotreatment fermentation, *Clostridium thermocellum*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, Sugarcane bagasse.

1. INTRODUCTION AND BACKGROUND

The world needs a low carbon transport sector that it will likely be difficult to achieve without the widespread use of biofuels. Because even with an aggressive reduction in travel

growth, shifts mass transport, efficiency improvements and penetration by vehicles running on electricity and hydrogen, there will remain a huge demand for liquid fuel in the next 60 years, in the best scenario (Fulton et al. 2015). Taking this into account, the lignocellulosic biomass has long been recognized as an attractive raw material for the production of biofuels and biochemical productions (Fulton et al. 2015; NREL 2006; Souza et al. 2015; Hogsett 1995). This feedstock includes forest products wastes, agricultural residues, organic fractions of municipal solid wastes, paper, and even undomesticated plants, have the potential to became an important source of energy (Demirbas 2006). Today the ethanol is the leading liquid fuel worldwide derived from plant biomass in the first generation and adding this, cellulosic ethanol from the second generation is the candidate for replacing a large portion of U.S. petroleum use (Grotewold et al. 2015). In this context, Brazil as a larger producer of ethanol from sugarcane has the best scenario to improve its ethanol industry, through the utilization of the large amounts of lignocellulosic material (sugarcane bagasse) generated during the sugar and ethanol productions to generate lignocellulosic ethanol and others bioproducts (Herrera et al. 2014)In the second-generation ethanol process, it can achieve the enhancement of the production, yield, and best economical results when is integrated with the first-generation ethanol industry (Dias et al. 2012)

Different approaches have been proposed in order to develop an efficient conversion process such as thermal, chemical, biochemical and microbial both individually and in combination (Dias et al. 2012; M. O. S. Dias et al. 2013; M. O. Dias et al. 2013), however none has proven to be entirely satisfactory as a stand-alone strategy. Thus, there is still a real need for conversion of lignocellulosic biomass to fermentable sugars for the production of ethanol and others biofuels that represents a major challenge in global efforts to utilize renewable resources in place of fossil fuels to meet rising energy demands (Lynd et al. 2008).

The technology used to obtain ethanol 2G from the lignocellulosic materials involve three processing strategies: separate hydrolysis and fermentation (SHF); simultaneous saccharification and fermentation (SSF); or consolidated bioprocessing (CBP). At the SHF schema typically needs the pretreatment to reduce the recalcitrance, allowing the enzyme access to the crystalline cellulose. Then, the enzymatic hydrolysis transforms the polysaccharidesin the biomass into fermentable sugars (Blumer-Schuette et al. 2014). Different pretreatment technologies based on physical treatment (mechanical factors), chemical (e.g. acid, base, solvents, or ionic liquids) and biological methods have been developed with high capital and operating costs and impacts such as inhibition and chemical recovery add yet further costs of the finished product, i.e. biofuel (Chaturvedi & Verma 2013).

Furthermore, enzymatic hydrolysis process converts lignocellulosic biomass to fermentable sugar may be the most complex in the biomass conversion due to substrate-related and enzyme-related effects and their interactions (Yang et al. 2011). This process is one of the bottlenecks in the commercialization of the process due to low hydrolysis rates and a high cost of enzymes (Kumar et al. 2013). The studies on the pre-treatment and hydrolysis processes are projected to optimize the yield of fermentable sugar from the lignocellulosic sources at low cost to the fermentation process. In both process SHF and SSF strategies, the production of enzymes is relevant for the hydrolysis, this incurring an additional economic cost to biofuel production. For that reason, a process created to combat the economic enzyme process is the CBP, which consolidate enzyme production, hydrolysis, and fermentation in a single state process, (Lynd et al. 2008; Blumer-Schuette et al. 2014).

On the other hand, a study in the late 80's developed another pathway that aimed to overcome the recalcitrance (resistance of cells wall to disruption) without thermochemical pretreatment, without enzymes addition and using thermophilic, cellulolytic bacteria (Lynd & Grethlein 1987).

Thermophilic microorganisms have been an attractive biocatalyst for the conversion of lignocellulosic biofuels because they are capable of deconstruction of lignocellulosic material using the robust, effective, carbohydrate-degrading enzymes that they produce, transform the released sugar in ethanol and survive under hard bioprocessing conditions (Blumer-Schuette et al. 2014).

The thermophillic cellulosomal bacterium called *Clostridium thermocellum* was the first microorganism from which a cellulosome was described (Lamed et al. 1983). The degradation process of lignocellulose by this microorganism includes the cellulosome and complementary free-enzymes, additionally other characteristic is the production of ethanol. However, although the *Clostridium thermocellum* has the skill to degrade plant biomass and cellulose, this bacterium does not metabolize the pentoses that are released from hemicellulose, another major component of the biomass. Therefore, *Clostridium thermocellum* has the affinity for ferment the hexose but not the pentoses (Blumer-Schuette et al. 2014).

Also, another microorganism can lead the transformation of the pentoses, as the case of *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* which can ferment pentoses and even solubilize hexoses. When this microorganism is associated with *Clostridium thermocellum*, this two can improve a solubilization of native lignocellulosic materials. However, the main restriction to use both microorganisms is the low production of ethanol during fermentation. (Hogsett 1995).

The main property of some thermophiles is a strong economy impact is its capacity of solubilizing cellulose crystal to simple sugar without added enzymes and to rapidly ferment cellulosic biomass (Olson et al. 2015). In Yang et al. (2009) and Kataeva et al. (2013) had shown a great potential from thermophilic microorganism to grow and solubilize pretreated or unpretreated plant biomass, these include hardwoods such a poplar, low ligningrasses as Napier and Bermuda grasses and high lignin grasses as switchgrass, in the final broth was observed biomass conversion by thermophilic anaerobic microorganisms. In the latest research of industrial production of biofuels an anaerobic thermophilic, Clostridium thermocellum, have attracted considerable attention for its ability to solubilizing crystalline cellulose and its capacity to produce ethanol, acetate, lactate, CO₂ and H₂ at its major products in the fermentation (Olson et al. 2015) and (Blumer-Schuette et al. 2014) although none is commercially deployed today. In (Yee et al. 2012), (Shao et al. 2011) and (Shao et al. 2015)was studied the solubilization of pretreat and unpretreated cellulosic biomass, such as winter rye, pretreated switchgrass and AFEX pretreated corn stover, using *Clostridium thermocellum*, its results showed both situations (1) comparable solubilization of AFEX pretreated corn stover for *Clostridium thermocellum* fermentation and SSF (2) greater solubilization performance by Clostridium thermocellum on avicel, pretreated switchgrass and winter rye when compared to SSF process. Another topic related to this area is the most effective lignocellulose solubilizing system, the cow. Where it alternates biological attack and mechanical disruption. There are studies that support this process and show very well results. In (Kelsey & Shafizadeh 1980) present an enzymatic hydrolysis process with simultaneous wet milling as an alternative to thermodynamic pretreatment, its results show high yield in released sugar when milling was used during hydrolysis (4-5 fold) compared to before milling (2-fold) compared with unmilled hydrolysis. More recently studies use milling in pretreatment substrate on hydrolysis process, results show the reduction of enzymes loading required in the hydrolysis and high yield in sugar conversion (Zhou et al. 2010), besides, improvement of hydrolysis enzymatic with long periods of milling and enhancement of the anaerobic digestion (Mais et al. 2002). Milling produces a continuous generation of accessible sites in the cellulosic material decreasing the recalcitrance and given entrance to enzymes and microorganism (Kelsey & Shafizadeh 1980). There have been few published reports researching milling in the context of microbial processing of cellulosic biomass to liquid fuels. However, (Paye et al. 2016) presents a complete work were compared the solubilization of minimally pretreatment lignocellulose by various biocatalysts and enhancement via cotreatment. In this study, *Clostridium thermocellum* achieved about 65% solubilization of washed mid-season switchgrass and about 35% for senescent switchgrass.

Solubilization yields for *Clostridium thermocellum* cultures and cell-free cellulase preparations were about twice as high as industry-standard fungal cellulase (CTec2 and HTec2) across a broad range of conditions, including feedstock harvest time, the presence or absence of fermenting microbes, enzyme loading, particle size, and (for fungal cellulase) incubation temperature. Recently the Lynd's group has achieved titers of 25 g/L ethanol at a yield of 75% using *Clostridium thermocellum* in pure culture.

Thereby, the present study evaluates the physical disruption during biological processing – termed "cotreatment", whose the main goal is to use the cotreatment-enhance fermentation in the Brazilian lignocellulosic material, sugar cane bagasse and straw, with an eye toward the ultimate goal of production liquid biofuels and bioproducts. Thus, it has been compared and contrasted two processing strategies: Cotreatment fermentation using *Clostridium thermocellum* biocatalyst, and a Coculture of *Clostridium thermocellum* with *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*; Batch fermentation using *Clostridium thermocellum*, and a Coculture of *Clostridium thermocellum*, and a Coculture of *Clostridium thermocellum* is thermocellum.

This new approach is a new biochemical pathway that has been tested for the first time with sugarcane bagasse and straw.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Microorganism

Clostridium thermocellum strain DSM1313 was obtained from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Leibnitz Germany).

Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum ATCC31960 was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, Virginia). Both were incubated at 55° C and at neutral pH. Both strains were maintained in 5 mL aliquots at -80° C

2.2 Cultivation Medium

The growth medium for culturing the Clostridium Thermocellum and Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum is an adaptation of the Low Carbon Medium (LC) developed by Holwerda et al. (2012). All chemicals were of reagent grade and obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) or Fisher Scientific (Pittsburgh, PA) otherwise noted. All the solutions were made with water purified using a milliQ system (Millipore, Billerica, MA), and were purged extensively with ultrahigh purity grade nitrogen gas (Airgas Northeast, White River Junction, VT) and autoclaved of filter sterilized (0.22 µm filter, Millipore, Billerica, MA). Cellulose (Avicel PH105) and Sugarcane bagasse were used as growth substrate at concentrations of 5 g/L glucan equivalent.

The medium used for inoculum, cultivation and cotreatment contained apart from the solid substrate 5.0 g/L MOPS (used only for culturing the inoculum), 2 g/L Monopotassium phosphate KH₂PO₄, 3 g/L Dipotassium phosphate K₂HPO₄0.1 g/L Sodium Sulfate Na₂SO₄, , 2 g/L NH₄Cl, 0.2 g/L Magnesium Chloride hexahydrate MgCl₂.6H₂O, 0.05 g/L Calcium chloride dihydrate, 0.0035 g/L Ferrous sulfate heptahydrate FeSO₄*7H₂O,0.025 g/L Ferrous Chloride tetrahydrate FeCl₂*4H₂O, 1 g/L L-Cysteine hydrochloride monohydrate C₃H₇NO₂S·HCl·H₂O. In addition, the modified LC-medium was supplemented with vitamins and trace minerals by the addition of the stock solutions described below at 20 ml and 1ml per liter.

The medium was prepared in separate solutions; Solution A contains the carbohydrate (Cellulose or Sugarcane Bagasse) and the bulk of the water. Solution A* contains MOPS and used only for the inoculum cultures prepared at 50-fold concentration. Solution B contains Monopotassium phosphate, Dipotassium phosphate and Sodium Sulfate, in a 25-fold concentration. Solution C; contains Ammonium Chloride, and is prepared as 50-fold concentrate. Solution D contains Magnesium Chloride hexahydrate, Calcium chloride dihydrate, Ferrous sulfate heptahydrate, Ferrous Chloride tetrahydrate, L-Cysteine hydrochloride monohydrate and is also prepared in a 50-fold concentration. Solution E, contains all vitamins, prepared as a 50-fold concentration. Solution TE, contains the trace minerals, and is prepared at a 1000-fold concentration.

Solution E, the vitamine solution, contains per liter of water: 1 gr/L of Pyrodoxamine dihydrochloride, 0.2 g/L P-aminobenzoic (PABA), 0.1 g/L D-biotin, 0.1 g/L vitamin B_{12} . 0.2 g/L Thiaminehydrochloride and 0.2 g/L Thiotic acid/alpha-lipoic acid. The last two vitamins are added to enable the growth of *T. thermosaccharolyticum*. This solution was filter sterilized and stored in the fridge in the absence of light

The Solution TE, trace mineral solution, contained per liter of water purified using a milliQ system: 0.00125 g/L MnCl₂.4H₂O, 0.000125 g/L CoCl₂.6H₂O, 0.000125 g/L ZnCl₂, 0.000125 g/L CuCl₂.2H₂O, 0.000125 g/L H₃BO₃, 0.000125 g/L Na₂MoO₄.2H₂O, 0.000125 g/L NiCl₂.6H₂O. This solution was stored in the absence of light.

2.3 The substrate Sugarcane Bagasse

Carbohydrates and lignin make up a mayor portion of biomass samples, Table 1. Compositional analysis of carbohydrate content was done using quantitative saccharification (QS) as described by (Sluiter et al. 2012) and (Paye et al. 2016). The sugarcane bagasse came from a cane processing facility in São Paulo - Brazil and was dried at the CTBE (Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory), then shipped to US. The material was milled at 0.5 mm cutoff on a Retsch Rotor mill (Haan, Germany) until all material could pass a 0.5 mm screen. The composition of the milled sugar cane was for glucose (0.49 gr per gr of sugarcane bagasse), for xylose (0.23 gr per gr of sugarcane bagasse) and for arabinose (0.019 gr per gr of sugarcane bagasse). The lignin content was not quantified but data provided by CTBE showed that is 22.06% of the composition of the sugarcane bagasse used.

Compound	% Percentage
Ashes	8.11±0.51
Extractives	13.61 ± 0.02
Lignin*	22.06 ± 0.56
Cellulose	35.88 ± 0.57
Hemicellulose	23.71±0.19

Table 1. Composition of the sugarcane bagasse used on the present study.

*supplied by the CTBE

2.4 Analytical Methods

Acetic acid, formic acid, lactic acid and ethanol were determined by HPLC (Waters, Milford, MA) with refractive index detection using an Aminex HPX-87H column (Bio-Rad, Hercules CA) with a 5-mMsulfuric acid solution eluent.

Residual solid material was collected after 7 days of fermentation and incubation by centrifuging at 7500 x g, for 15 minutes at 4 °C. All the lignocellulosic material at the end of the fermentation was dried in an oven at 60° C until constant weight before QS analysis.

The quantitative saccharification (QS) analysis is a procedure to determinate the amount of structural carbohydrates in a solid biomass sample by an acid hydrolysis to fractionate the sample to more simple forms that are measured. Hydrolyzed sugars were quantified by HPLC. The procedure is described by (Sluiter et al. 2012) and (Paye et al. 2016). The solubilization (%) was calculated based on:

% solubilization =
$$\frac{\text{Initial g (All sugars)} - \text{final g (All sugars)}}{\text{Initial g (All sugar)}} \times 100$$

The CO₂ and H₂ produced during fermentation were measured volumetrically on a Ritter Milli gas counter (Ritter US, Hawthorne NY) connected to the gas outlet port of each bioreactor and data was recorded by Rigamo software.

2.5 Cultivation Systems

Inoculum was grown in 125 and 250 mL Serum Bottleswith a 50 and 100 ml working volume. Inoculation bottles were incubated at 55° C and at 180 rpm for approximately 24 hours

using cellulose as substrate. An initial test to see if *C.thermocellum* is able to grow on sugar cane bagasse was done under similar conditions.

Batch fermentations without cotreatment were carried out in Sartorius Aplus 2.5-1 bioreactor (Sartorius Stedim, Bohemia, NY) (Fig.1) incubated at 55° C, stirred at 200 rpm and with the pH maintained at 7.0 by automatic addition of 4 N KOH. Base addition was recorded by the Sartorius Aplus tower and software. The head plate of the reactor was fitted with a pH probe, a thermocouple, a gas inlet and outlet port, an inoculation port, a medium and inoculum inlet port. The reactor was autoclaved at 121 °C for 60 min after which the headspace was purged overnight with a 20%CO₂/80%N₂ gas mix (Airgas). The fermentation is started with 2% v/v volume of inoculum of a culture grown on 5 g/L cellulose for *C. thermocellum* mono culture, or a combination of 2 g/L xylose and 3 g/L cellulose for co-cultures. Both base addition and volumetric off gas were used as an indicator of growth and fermentative activity(Holwerda & Lynd 2013).





Figure 1. Bioreactor Sartorius Aplus 2.5-Liter vessel units (Sartorius Stedim, Bohemia, NY)

2.6 Cotreatment Cultivation System

The cotreatment bioreactor (Fig 2 and 3).was designed and built by the Lynd Lab. The reactor is made of stainless steel and contains a bead bed made of stainless steel balls of ~4.8 mm diameter. The liquid working volume of the reactor is 600 mL and the bead bed is 80% of total height (see figure 2). The bead is agitated by a stirrer and the reactor has baffles that increase the agitation in the bead bed. The stirrer is outfitted with a strong motor to transfer energy to the beads and the biomass.

The head plate of the reactor was fitted with a pH probe, a temperature probe, an gas inlet and outlet port, a sample tube, a medium inlet port, It was autoclaved at 121 °C for 60 min after which the headspace was purged overnight with a 20%CO₂/80%N₂ gas mix (Airgas).

The experiments using cotreatment will be carried out in a reactor with a volume of 600mL volume, the biomass is loaded at 5 g/L of glucan equivalent, in practice this is around 13g/L solid, incubated at 55° C for 5-7 days, milling is done at 100 rpm continuously through the whole fermentation, the purge is stopped shortly before inoculation. The fermentation is started with 4% v/v volume of inoculum of a culture grown on 5 g/L cellulose for *C*. *thermocellum* mono culture, or a combination of 3 g/L xylose and 2 g/L cellulose for co-cultures.



Figure. 2. Schematic illustration of a Cotreatment Fermentation Reactor





Figure 3. Cotreatment Reactor, Lynd Lab (2016)

3. **RESULTS AND DISCUSSION**

Bagasse was fermentation with mono cultures of C. thermocellum or with cocultures of *C.thermocellum* (LL1004) and *T. thermosaccharolyticum* (LL1244) in presence or absence of cotreatment

Batch fermentations of bagasse without milling

Figure 4 shows the results of 13 g/L (5 gram of glucan equivalent/liter) fermented for 168 hours in 1.2 Liter working volume with *C. thermocellum* resulting in 50 % solubilization of the carbohydrates. Figure 5 shows the results of the same experiment but now using a coculture of *C. thermocellum* and *T. thermosaccharolyticum*, the solubilization is not affected by the presence of an organism able to ferment C_5 sugars. However, the results show that in the coculture fermentation the gas production is increased with approx. 82% under cocultures conditions which is the result of sugars that are solubilize but un utilized under mono culture conditions are actually utilized and fermented under co culture conditions.



Figure 4 Fermentation of sugarcane bagasse during 7 days with *C. thermocellum (LL1004)*: Fractional carbohydrate solubilization (0.500) and volumetric gas production



Figure 5 Fermentation of sugarcane bagasse during 7 days with *C.thermocellum (LL1004)* and *T. thermosaccharolyticum (LL1244)*: Fractional carbohydrate solubilization (0.490) and volumetric gas production

Batch fermentations of bagasse in presence of cotreatment

Using cotreatment reactors (0.6 L liquid working volume) the same experiment was conducted, figures 6 and 7 show the results the cotreatment experiments with mono and cocultures. Solubilization for mono cultures of *C.thermocellum* increases by 50 percent to 77 percent. The solubilization of the co-culture in combination with cotreatment increased from 49% to 97.8% more and seemed that is a very small amount of solid carbohydrate left after 5 days. (Note that the co culture run was ended at 120 hrs compared to all the other results).



Figure 6 Fermentation of sugarcane bagasse during 7 days with *C. thermocellum (LL1004) with cotreatment*: Fractional carbohydrate solubilization (0.770) and volumetric gas production



Figure 7. Fermentation of sugarcane bagasse during 7 days with *C.thermocellum (LL1004)* and *T. thermosaccharolyticum (LL1244) with cotreatment*: Fractional carbohydrate solubilization (0.978) and volumetric gas production

The information and results at the cotreatment fermentation essays obtained are showed in table 1. Comparing the results shown, the percentages of carbohydrate solubilization for the cotreatment fermentation are higher suggesting the this approach is increasing extent of solubilization, this results highlight the importance of the accessibility, it is observed that the cotreatment process in the reactor helps significantly the biological solubilization by the *C.thermocellum* and the co-culture of *C.thermocellum* and *T. thermosaccharolyticum*. The same pattern of enhanced in the fractional conversion was observed on the cotreatment fermentation of almost 20% more in the *C.thermocellum*culture and almost 2-fold and the coculture (*C.thermocellum* with *T. thermosaccharolyticum*) in comparison with the simple fermentation.

Biocatalyst	Cotreatment	%Solubilization	Figure
		(Average)	
<i>C. thermocellum</i> mono	No	50 ± 8.2	4
culture			
C. thermocellum T.	No	49 ± 1.9	5
thermosaccharolyticum			
co-culture			
C. thermocellummono	Yes	77 ± 0.083	6
culture			
C. thermocellum T.	Yes	97.8 ± 0.04	7
thermosaccharolyticum			
co-culture			

Table 1. Performance of the C. thermocellum and co-culture of C.thermocellum with T.thermosaccharolyticum in the batch reactors

In the work of Paye et al. 2016 showed that *Clostridium thermocellum* achieved about 65% solubilization of washed mid-season switchgrass and about 35% for senescent switchgrass. That is 10% and 30% less effective in comparison that the best solubilization of sugarcane bagasse cotreatment fermentation using *C.thermocellum* and Coculture (*C.thermocellum* with *T. thermosaccharolyticum*), respectively. In addition, Paye et. al shows results about a SSF (Simultaneous Saccharification and fermentation) using fungal cellulase with a solubilization of 30%, approximately. When it is compared with the results of cotreatment fermentation, our results are 2.5-fold higher and 3.2 higher with the *C.thermocellum* and Coculture (*C.thermocellum* with *T. thermosaccharolyticum*), respectively.

The results of HPLC characterization of supernatants after fermentation are present in table 2. The production of ethanol in the monoculture of *C. thermocellum* increases from 16.76 mM to 53.63 mM , a parallel increase in the co-culture with *C. thermocellum* and *T. thermosaccharolyticum* from 7.23 mM to 21.22 mM in the presence of the cotreatment. It is observed that for cotreatment –aided fermentations the production of ethanol, acetic acid and lactic acid increases and it decreases for formic acid. The monoculture of *C. thermocellum* is the most effective with more than 2-fold production of ethanol in comparison with the co-culture of *C. thermocellum* and *T. thermosaccharolyticum*.

Table 2. Characterization of supernatants of fermentations of *C. thermocellum* and co-cultures of *C. thermocellum* and *T. thermosaccharolyticum* in presence or absence of cotreatment.

Capítulo 8. Cotreatment

D's sets lesst	Cotreatm	Acetic acid	Ethyl alcohol	Formic acid	Lactic acid
Biocatalyst	ent	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)
<i>C. thermocellum</i> mono culture	No	20.78 ± 1.50	16.76 ± 1.53	1.48 ± 0.20	0.11 ± 0.07
C. thermocellumT. thermosaccharoly ticum co-culture	No	12.11 ± 0.56	7.53 ± 0.24	1.22 ± 0.15	0.05 ± 0.02
<i>C. thermocellum</i> mono culture	Yes	45.76 ± 0.25	53.63 ± 21.3	0.25 ± 0.06	0.52 ± 0.07
C. thermocellum T. thermosaccharoly ticum co-culture	Yes	35.91 ± 3.96	21.22 ± 3.64	0.27 ± 0.07	0.88 ± 0.73

4. Conclusion

In the present study, the use of the sugarcane bagasse in cotreatment-aided fermentation showed results that enable a process that is beyond the fungal cellulase and pretreatment paradigm. Some significant points are coming out those as follow:

The method of growing *C.thermocellum* developed by the Lynd lab was evaluated with Brazilian biomass (Sugarcane bagasse).

It was found that with the cotreatment-aided fermentation, *C. thermocellum* could solubilize almost the 77% and 98% of the lignocellulosic material content of sugar cane bagasse and produce ethanol in the range of 53.63 to 21.22 mM, in the two system that we analyzed (using *C. thermocellum* and co-culture of *C. thermocellum* with *T. thermosaccharolyticum*).

The solubilization by *C. thermocellum* was almost 20% higher compared the non cotreatment-aided fermentation. For the co-culture of *C. thermocellum* and *T. thermosaccharolyticum* the solubilization was almost complete (2-fold higher) when compared to non-cotreatement-aided fermentation

We found that the Cotreatment fermentation could be a solution in the bottleneck of the enzymatic process that is used in the current Brazilian ethanol production. However, cotreatment process is still in relative infancy and would benefit from further development and extensive testing under industrial conditions

Acknowledgment

The authors are grateful for the financial grant 2016-06417-9 from The São Paulo Research Foundation (FAPESP – Brazil). This study was supported by the partnership between Lynd Lab atDartmouth College, Brazilian Bioethanol Science and Technology Laboratory - CTBE/CNPEM (Brazil) and School of Chemical Engineering, State University of Campinas - UNICAMP (Brazil). A special thanks to Lee Lynd, Evert Holwerda, Robert Worthen, and all Lynd Lab team.

References

BLUMER-SCHUETTE, S. E., BROWN, S. D., SANDER, K. B., BAYER, E. A., KATAEVA, I. AND ZURAWSKI, J. V. Thermophilic lignocellulose deconstruction. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(3), 393–448, 2014.

CHATURVEDI, V., VERMA, P. An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products. *3 Biotech*, 3(5), pp.415–431, 2013.

DEMIRBAS, A. Biohydrogen, For Future Engine Fuel Demands. *Green Energy and Technology*, p.XII, 276, 2006.

DIAS, M. O. S., JUNQUEIRA, T. L., CAVALETT, O., CUNHA, M. P., JESUS, C. D. F., MANTELATTO, P. E., ROSSELL, C. E. V, MACIEL FILHO, R. AND BONOMI, A. Cogeneration in integrated first and second generation ethanol from sugarcane. *Chemical Engineering Research and Design*, 91, pp.1411–1417, 2013.

DIAS, M. O. S., JUNQUEIRA, T. L., CAVALETT, O., PAVANELLO, L. G., CUNHA, M. P., JESUS, C. D. F., MACIEL FILHO, R. AND BONOMI, A. Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane. *Applied Energy*, 109, pp.72–78, 2013.

DIAS, M. O. S., JUNQUEIRA, T. L., CAVALETT, O., CUNHA, M. P., JESUS, C. D. F., ROSSELL, C. E. V, MACIEL FILHO, R. AND BONOMI, A. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. *Bioresource Technology*, 103, pp.152–161, 2012.

FULTON, L. M., LYND, L. R., KÖRNER, A., GREENE, N. AND TONACHEL, L. R. The need for biofuels as part of a low carbon energy future. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 9(5), pp.476–483, 2015.

GROTEWOLD, E., JONES PRATHER, K.L. & PETERS, K.U.S. DOE. Lignocellulosic Biomass for Advanced Biofuels and Bioproducts: Workshop Report, Washington D.C. 2015. Available at: http://genomicscience.energy.gov/biofuels/lignocellulose/. [Accessed January 23, 2017].

HERRERA, W.E., CCOPA, E., MACIEL FILHO, R., 2014. On-Line Measurements and Modelling Study in Second Generation Ethanol Production from Sugarcane. *CHEMICAL*

ENGINEERING TRANSACTIONS, 37, pp.415-420, 2014.

HOGSETT, D. Cellulose Hydrolysis and Fermentation by Clostridium thermocellum. Dartmouth College. 1995.

HOLWERDA, E., HIRST, K., LYND, L. A defined growth medium with very low background carbon for culturing Clostridium thermocellum. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39(6), pp.943–947, 2012.

HOLWERDA, E.K., LYND, L.R. Testing alternative kinetic models for utilization of crystalline cellulose (Avicel) by batch cultures of Clostridium thermocellum. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(9), pp.2389–2394, 2013

KATAEVA, I., FOSTON, M. B., YANG, S.-J., PATTATHIL, S., BISWAL, A. K., POOLE II, F. L., BASEN, M., RHAESA, A. M., THOMAS, T. P., AZADI, P., OLMAN, V., SAFFOLD, T. D., MOHLER, K. E., LEWIS, D. L., DOEPPKE, C., ZENG, Y., TSCHAPLINSKI, T. J., YORK, W. S., DAVIS, M., MOHNEN, D., XU, Y., RAGAUSKAS, A. J., DING, S.-Y., KELLY, R. M., HAHN, M. G. AND ADAMS, M. W. W. Carbohydrate and lignin are simultaneously solubilized from unpretreated switchgrass by microbial action at high temperature Energy & amp; Environmental Science. *Energy & Environmental Science*. The Royal Society of Chemistry, 6(6), pp.2186–2195. 2013.

KELSEY, R.G. & SHAFIZADEH, F. Enhancement of cellulose accessibility and enzymatic hydrolysis by simultaneous wet milling. *Biotechnology and Bioengineering*, 22(5), pp.1025–1036, 1980.

KUMAR, M., KUMAR, D., MURTHY, G.S. Stochastic molecular model of enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production. *and Murthy Biotechnology for Biofuels*, 2013.

LAMED, R., SETTER, E., BAYER, E.A. Characterization of a cellulose-binding, cellulasecontaining complex in Clostridium thermocellum. *Journal of Bacteriology*, 156(2), pp.828– 836. 1983.

LYND, L. R., LASER, M. S., BRANSBY, D., DALE, B. E., DAVISON, B., HAMILTON, R., HIMMEL, M., KELLER, M., MCMILLAN, J. D., SHEEHAN, J. AND WYMAN, C. E. 2008. How biotech can transform biofuels. *NATURE BIOTECHNOLOGY*, 26(2).

LYND, L.R., GRETHLEIN, H.E. Hydrolysis of dilute acid pretreated mixed hardwood and purified microcrystalline cellulose by cell-free broth fromClostridium thermocellum. *Biotechnology and Bioengineering*, 29(1), pp.92–100. 1987.

MAIS, U., ESTEGHLALIAN, A. R., SADDLER, J. N. AND MANSFIELD, S. D. Enhancing the enzymatic hydrolysis of cellulosic materials using simultaneous ball milling. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98(1), pp.815–832. 2002.

NREL, 2006. From biomass to biofuels: NREL leads the way. *Nrel/Br-510-39436*, pp.1–6. Available at: http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/39436.pdf [Accessed January 23, 2017].

OLSON, D.G., SPARLING, R. LYND, L.R. Ethanol production by engineered thermophiles. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, pp.130–141, 2015.

PAYE, J. M. D., GUSEVA, A., HAMMER, S. K., GJERSING, E., DAVIS, M. F., DAVISON, B. H., OLSTAD, J., DONOHOE, B. S., NGUYEN, T. Y., WYMAN, C. E., PATTATHIL, S., HAHN, M. G. AND LYND, L. R. Biological lignocellulose solubilization: comparative evaluation of biocatalysts and enhancement via cotreatment. *Biotechnol Biofuels*, 9(1), 1–13, 2016.

SHAO, X., JIN, M., GUSEVA, A., LIU, C., BALAN, V., HOGSETT, D., DALE, B. E. AND LYND, L. Conversion for Avicel and AFEX pretreated corn stover by Clostridium thermocellum and simultaneous saccharification and fermentation: Insights into microbial conversion of pretreated cellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 102(17), pp.8040–8045. 2011.

SHAO, X., DIMARCO, K., RICHARD, T. L. AND LYND, L. R. 2015. Winter rye as a bioenergy feedstock: impact of crop maturity on composition, biological solubilization and potential revenue. *Biotechnol Biofuels*, 8(1), pp.1–10, 2015.

SLUITER, A. NREL/TP-510-42618 analytical procedure - Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*, (April 2008), p.17, 2012.

SOUZA, G. M., VICTORIA, R., JOLY, C. AND VERDADE, L. *Bioenergy & amp; sustainability: bridging the gaps*, Scientific Committee on Problems of the Environment (SCOPE), 2015.

YANG, B., DAI, Z., DING, S.-Y. AND WYMAN, C. E. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels*, 2(4), pp.421–450, 2011.

YANG, S.-. J., KATAEVA, I., HAMILTON-BREHM, S. D., ENGLE, N. L., TSCHAPLINSKI, T. J., DOEPPKE, C., DAVIS, M., WESTPHELING, J. AND ADAMS, M. W. W. Efficient degradation of lignocellulosic plant biomass, without pretreatment, by the thermophilic anaerobe "Anaerocellum thermophile": DSM 6725. *Appl Environ Microbiol*, 75. 2009.

YEE, K. L., RODRIGUEZ, M., TSCHAPLINSKI, T. J., ENGLE, N. L., MARTIN, M. Z. AND FU, C. X. Evaluation of the bioconversion of genetically modified switchgrass using simultaneous saccharification and fermentation and a consolidated bioprocessing approach. *Biotechnol Biofuels*, 5(1), pp.1–12, 2012.

ZHOU, J. X., CHEN, D., ZHU, Y. H., LIAO, H. D., YUAN, L. AND CHEN, Z. H. Simultaneous wet ball milling and mild acid hydrolysis of rice hull. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(1), pp.85–90, 2010.

CAPÍTULO 9 CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

9. CONCLUSÕES GERAIS E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

9.1. CONCLUSÕES GERAIS

As principais conclusões sobre o conteúdo dos temas abordados nessa tese foram apresentadas no final de cada capítulo. A seguir serão apresentadas as conclusões gerais do trabalho.

O principal objetivo dessa tese de Doutorado é o desenvolvimento de *softwares* e procedimentos de monitoração e controle que auxiliem e possibilitem uma operação mais estável independentemente de variações na matéria prima, que por sua vez contribui com a viabilidade econômica da produção do etanol combustível de 1G, 2G e 1G+2G. A justificativa desse trabalho é a falta de dispositivos para fazer um monitoramento e controle *online* do processo fermentativo, utilizando ferramentas com excelente desempenho e que possam diminuir o custo do processo de produção de etanol.

O trabalho apresentado pode ser dividido em duas fases: uma parte experimental e uma parte computacional. A parte experimental começa desde a origem do processo de segunda geração, utilizando o bagaço de cana-de-açúcar, passando por três pré-tratamentos e dos tipos de hidrólise enzimática, enriquecimento com melaço, fermentação e análise dos dados obtidos nos experimentos anteriores. A segunda grande parte dessa tese consiste na modelagem, simulação e controle do processo dos sistemas S1, S2, S3, S4 e S5, baseado nos dados experimentais, na qual os resultados foram bem-sucedidos e o objetivo principal da pesquisa foi atingido.

No estudo da modelagem do processo fermentativo para os 5 sistemas de produção de etanol foram determinados os parâmetros cinéticos consistentes matematicamente e capazes de realizar predições adequadas. Assim, foi estabelecido um modelo cinético para fermentação em baixa densidade celular, crescimento associado, apropriado para processos fermentativos de sistemas de hidrolisado enzimático e melaço para diversas situações operacionais de temperatura, concentração de substrato, produto e células. Para tal fim, um programa computacional foi desenvolvido com esses parâmetros para realizar estudos adicionais sobre esses processos de 1G+2G.

A modelagem do processo de fermentação usando RNAs, tendo como variáveis: temperatura, pH, vazão de CO2, capacitância ou turbidez, mostrou ser eficiente para a predição das concentrações de X, S e P. Em todos os sistemas, as predições realizadas pelas RNAs foram precisas, mesmo com ruídos apresentados nos sinais dos sensores. O *soft-sensor*, utilizando RNAs, é uma poderosa ferramenta de inferência de informação.

O controlador NNMPC, que usa como modelo interno uma RNA para a identificação do processo e treinada da forma "passo adiante", é um sistema promissor que consegue atenuar as perturbações geradas pelas variações da matéria-prima e dos processos decorrentes da desconstrução do material lignocelulósico, dando excelentes resultados no problema regulatório. Além disso, o controlador pode lidar com as mudanças do *set-point*, problema *servo*.

A parte central da tese é a modelagem e controle, utilizando as RNAs, de tipo MLP, na qual esta abordagem neural foi destacada na modelagem e identificação do processo fermentativo, apesar das não linearidades do sistema.

Na utilização das redes neurais artificiais como *soft-sensor* mostraram um grande potencial; e como modelo interno do NNMPC,foi constatado que as RNAs são uma poderosa ferramenta, que consegue realizar o monitoramento *online* e controle robusto do processo fermentativo.

Apesar da complexa matemática envolvida, juntamente com os algoritmos complexos para a determinação de parâmetros durante as fases de treinamento, avaliação e teste, na qual chamamos de aprendizagem, pode-se considerar que as RNAs são uma ferramenta de fácil acesso para solucionar outros problemas na indústria química e em outras áreas do conhecimento.

9.2. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Algumas sugestões para trabalhos futuros estão a seguir:

- Desenvolvimento de RNAs utilizadas como *soft-sensor* com múltiplas saídas, ao invés de ter uma para cada concentração de X, S e P, visando a diminuição do trabalho computacional e atingindo uma generalização total;
- Desenvolver uma estratégia de controle multi-variável, na qual contemple a temperatura como uma variável que possa ser perturbada;
- Instalar o *soft-sensor* e o controle NNMPC dentro de uma planta industrial;
- Comparar o controlador NNMPC com outros controladores e determinar como é o desempenho, tempo de reação do controlador e custo computacional.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADIAN-MOGHADAM, H., ELEGADO, F. B. AND NAYVE, R. Prediction of Ethanol Concentration in Biofuel Production Using Artificial Neural Networks. *American Journal of Modeling and Optimization*. Science and Education Publishing, 1(3), pp. 31–35, 2013.

AKIN, H., BRANDAM, C., MEYER, X.-M. AND STREHAIANO, P. A model for pH determination during alcoholic fermentation of a grape must by Saccharomyces cerevisiae. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. Elsevier, 47(11), 1986–1993, 2008.

ANDRADE, R. R. *Procedimento para o desenvolvimento de um modelo matemático robusto para o processo de fermentação alcoólica*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. Dissertação (Mestrado).

ANDRADE, R. R., MAUGERI FILHO, F., MACIEL FILHO, R., DA COSTA, A. C. Kinetics of ethanol production from sugarcane bagasse enzymatic hydrolysate concentrated with molasses under cell recycle. *Bioresource Technology*, 130, 351-359, 2013.

ANDRADE, R., CCOPA RIVERA, E., COSTA, A., ATALA, D. P., FILHO, F., FILHO, R. Estimation of temperature dependent parameters of a batch alcoholic fermentation process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 137-140(1-12), 753-763, 2007.

ANDRIETTA, S.R. Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua em escala industrial. In: Galindo, E., Ramírez, O. (Eds.), *Advances in Bioprocess Engineering*. Springer Netherlands, pp. 47–52, 1994.

ARAUJO, T. G. *Estudo Fenomenológico do Reator Batelada Utilizando Dois Processos Fermentativos*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2004. Dissertação (Mestrado).

ARAÚZO-BRAVO, M. J., CANO-IZQUIERDO, J. M., GÓMEZ-SÁNCHEZ, E., LÓPEZ-NIETO, M. J., DIMITRIADIS, Y. A. AND LÓPEZ-CORONADO, J. Automatization of a penicillin production process with soft sensors and an adaptive controller based on neuro fuzzy systems, *Control Engineering Practice*, 12(9), 1073–1090, 2004.

ARROYO-LÓPEZ, F. N., ORLIĆ, S., QUEROL, A. AND BARRIO, E. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of Saccharomyces cerevisiae, S. kudriavzevii and their interspecific hybrid. *International Journal of Food Microbiology*, 131(2–3), 120–127. 2009.

ASSUNÇÃO, F. L. Desenvolvimento de um Controle Preditivo Baseado em Modelo de Rede Neural Artificial em um Processo de Fermentação Contínua. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2017. Dissertação (Mestrado) ATALA, D. I. P., COSTA, A. C., MACIEL, R. AND MAUGERI, F. Kinetics of Ethanol Fermentation with High Biomass Concentration Considering the Effect of Temperature. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Springer-Verlag, 91–93(1–9), pp. 353–366, 2001.

ATALA, D. P., COSTA, A., MACIEL, R., MAUGERI, F. Kinetics of ethanol fermentation with high biomass concentration considering the effect of temperature. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 91-93, n. 1-9, p. 353-365, 2001.

BASSO, L. C., LIMA, U. A. Biotecnologia Industrial -Vol 3 :Processos Fermentativos e Enzimáticos. *Editora Edgar Bluger LTDA*.São Paulo 3: 82. 2001.

BASTIN, G., D. DOCHAIN. On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors. Elsevier Science. 1990.

BHAT, N., MC AVOY, T. Use of Neural Nets For Dynamic Modeling and Control of Chemical Process Systems. 1989 *Am. Control Conf.* 1342–1348, 1989.

BIROL, G. ÜNDEY, C. ÇINAR, A. A modular simulation package for fed-batch fermentation: penicillin production. *Computers & Chemical Engineering*, v. 26, n. 11, p. 1553-1565, 2002.

BLUMER-SCHUETTE, S. E., BROWN, S. D., SANDER, K. B., BAYER, E. A., KATAEVA, I. AND ZURAWSKI, J. V. Thermophilic lignocellulose deconstruction. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(3), 393–448, 2014.

CARVALHO, B. S. *Efeito da temperatura na cinética de morte celular e em fermentação alcoólica contínua com reciclo de células*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1996. Dissertação (Mestrado).

CARVALHO, J. C. M., S. SATO, et al.. Biotecnologia Industrial - Volume 2: Engenharia Química. *Editora Edgar Bluger LTDA*. São Paulo. 193-199. 2001.

CAVALERI, D., MCGOVERN, P. Evidence for S. cerevisiae inancient wine. *Journal of Molecular Evolution* 57: S226–S232, 2003.

CHANDEL, A. K., SINGH, O. V., CHANDRASEKHAR, G., RAO, L. V., NARASU, M. L. Key drivers influencing the commercialization of ethanol-based biorefineries. *J Commer Biotechnol*, v. 16, n. 3, p. 239-257, 2010.

CHATURVEDI, V., VERMA, P. An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value-added products. *3 Biotech*, 3(5), pp.415–431, 2013.

CHEN, Z.-B., NIE, S.-K., REN, N.-Q., CHEN, Z.-Q., WANG, H.-C. AND CUI, M.-H. Improving the efficiencies of simultaneous organic substance and nitrogen removal in a multi-stage loop membrane bioreactor-based PWWTP using an on-line Knowledge-Based Expert System. *Water Research* 45(16), 5266-5278. 2011

CLARKET, D.W., MOHTADIT, C., TUFFS~, P.S. Generalized Predictive Control Algorithm* Part I. The Basic Algorithm 23, 137–148, 1987.

DE BRITO, P. M. P. *Métodos numéricos adaptativos para resolução de modelos multidimensionais em engenharia química*. Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade de Coimbra, Coimbra. 2010. Tese (Doutorado).

DE SÁ, C. B. C. Caracterização de linhagens de Saccharomyces cerevisiae E Zymomonas mobilis para aplicação na produção de bioetanol. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco. 2012. Dissertação (Mestrado).

DEMIRBAS, A. Biohydrogen, For Future Engine Fuel Demands. *Green Energy and Technology*, p.XII, 276, 2006.

DIAS, M. O. S., JUNQUEIRA, T. L., CAVALETT, O., CUNHA, M. P., JESUS, C. D. F., MANTELATTO, P. E., ROSSELL, C. E. V, MACIEL FILHO, R. AND BONOMI, A. Cogeneration in integrated first and second-generation ethanol from sugarcane. *Chemical Engineering Research and Design*, 91, pp.1411–1417, 2013.

DIAS, M. O. S., JUNQUEIRA, T. L., CAVALETT, O., CUNHA, M. P., JESUS, C. D. F., ROSSELL, C. E. V, MACIEL FILHO, R. AND BONOMI, A. Integrated versus stand-alone second-generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. *Bioresource Technology*, 103, pp.152–161, 2012.

DIAS, M. O. S., JUNQUEIRA, T. L., CAVALETT, O., CUNHA, M. P., JESUS, C. D. F., ROSSELL, C. E. V., BONOMI, A. Integrated versus stand-alone second-generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. *Bioresource Technology*, 103(1), 152-161, 2012.

DIAS, M. O. S., JUNQUEIRA, T. L., CAVALETT, O., PAVANELLO, L. G., CUNHA, M. P., JESUS, C. D. F., MACIEL FILHO, R. AND BONOMI, A. Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane. *Applied Energy*, 109, pp.72–78, 2013.

DOURADO, A., GOMA, G., ALBUQUERQUE, U., SEVELY, Y. Modeling and static optimization of the ethanol production in a cascade reactor. I. *Modeling. Biotechnology and Bioengineering*, v. 29, n. 2, p. 187-194, 1987.

DRAGOI, E.-N., CURTEANU, S., GALACTION, A.-I. AND CASCAVAL, D. Optimization methodology based on neural networks and self-adaptive differential evolution algorithm applied to an aerobic fermentation process. *Applied Soft Computing* 13(1): 222-238. 2013.

ENDER, L. *Redes Neurais Aplicadas em Estratégias de Controle Não Linear*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002. Tese de Doutorado.

FEHLBERG, E. Low-order classical Runge-Kutta formulas with step size control and their application to some heat transfer problems. National Aeronautics and Space Administration, 1969. Disponível em: https://ntrs.nasa.gov/archive/nasa/casi.ntrs.nasa.gov/19690021375.pdf

FERNANDES, S., CAVALCANTE, C.B., DE SOUSA, B. V, BISPO, H., SILVA, J.N. Controle por Matriz Dinâmica em Malhas de Dual Composição em Colunas de Destilação. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Florianópolis, pp. 1–8, 2014.

FERREIRA, E. *Contribuição para o estudo da otimização da fermentação alcoólica operando em batelada-alimentada*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2005. Dissertação (Mestrado).

FOGLER, H. S. Elements of Chemical Reaction Engineering. Prentice Hall 4 edição. 2006.

FULTON, L. M., LYND, L. R., KÖRNER, A., GREENE, N. AND TONACHEL, L. R. The need for biofuels as part of a low carbon energy future. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 9(5), pp.476–483, 2015.

GEETHALAKSHMI, S., NARENDRAN, S., PAPPA, N. AND RAMALINGAM, S. Development of a hybrid neural network model to predict feeding method in fed-batch cultivation for enhanced recombinant streptokinase productivity in Escherichia coli. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 87(2): 280-285. 2012.

GHOSE, T. K., TYAGI, R. D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. I. Batch versus continuous systems. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 21, n. 8, p. 1387-1400, 1979.

GOMEZ, S. M. R. *Pre-Tratamento e Hidrolise Enzimática do Bagaço de Cana de Açúcar*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2010. Dissertação (Mestrado).

GONZAGA, J. C. B., MELEIRO, L. A., KIANG, C., MACIEL FILHO, R. ANN-based softsensor for real-time process monitoring and control of an industrial polymerization process. *Computers & Chemical Engineering* 33(1): 43-49. 2009.

GROTEWOLD, E., JONES PRATHER, K.L. & PETERS, K.U.S. DOE. *Lignocellulosic Biomass for Advanced Biofuels and Bioproducts: Workshop Report*, Washington D.C. 2015. Available at: http://genomicscience.energy.gov/biofuels/lignocellulose/. [Accessed January 23, 2017].

GUEGUIM KANA, E. B., OLOKE, J. K., LATEEF, A. AND ADESIYAN, M. O. Modeling and optimization of biogas production on saw dust and other co-substrates using Artificial Neural network and Genetic Algorithm. *Renewable Energy* 46(0): 276-281. 2012.

HAGHIGHI MOOD, S., HOSSEIN GOLFESHAN, A., TABATABAEI, M., SALEHI JOUZANI, G., NAJAFI, G. H., GHOLAMI, M. AND ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Pergamon, 27, pp. 77–93., 2013.

HAN, H.-G., QIAO, J.-F., CHEN, Q.-L. Model predictive control of dissolved oxygen concentration based on a self-organizing RBF neural network. *Control Engineering Practice*. 20(4): 465-476. 2012.

HAYKIN, S. Neural Networks and Learning Machines, Pearson Prentice Hall New Jersey USA 936 pLinks, 2008.

HENDLER, B. Construção de Um Software de Simulação e Ajuste de Curvas Cinéticas Para o Processo de Fermentação em Batelada Alimentada. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2011. Dissertação (Mestrado).

HERRERA, W. E., CCOPA, E., MACIEL FILHO, R. On-Line Measurements and Modelling Study in Second Generation Ethanol Production from Sugarcane. *Chemical Engineering Transactions*. 37: 415-419. 2014.

HERRERA, W.E. *Desenvolvimento e implementação de um software sensor para monitoração on-line de bioprocessos*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2012. Dissertação (Mestrado).

HERRERA, W.E., CCOPA, E., MACIEL FILHO, R., 2014. On-Line Measurements and Modelling Study in Second Generation Ethanol Production from Sugarcane. *Chem. Eng. Trans.* 37, 415–420, 2014.

HERRERA, W.E., RIVERA, E.C., ALVAREZ, L.A., TOVAR, L.P., TAMAYO, S.R., YAMAKAWA, C.K., BONOMI, A. Modeling And Control of a Continuous Ethanol Fermentation Using a Mixture of Enzymatic Hydrolysate and Molasses from Sugarcane. *Chem. Eng. Trans.* 50, 169–174, 2016.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. e BORZANI, W. R. (Ed.). Biotecnologia Industrial. São Paulo: Edgard 79 Blücher, v.2, 2001. p.93-122. IBGE. Indicadores IBGE Estatística da Produção Agrícola julho de 2015.

HOCALAR, A., TÜRKER, M., KARAKUZU, C. AND YÜZGEÇ, U. Comparison of different estimation techniques for biomass concentration in large scale yeast fermentation. *ISA Transactions* 50(2): 303-314. 2011.

HOGSETT, D. Cellulose Hydrolysis and Fermentation by Clostridium thermocellum. Dartmouth College. 1995.

HOLWERDA, E., HIRST, K., LYND, L. A defined growth medium with very low background carbon for culturing *Clostridium thermocellum*. *Journal of Industrial Microbiology* & *Biotechnology*, 39(6), pp.943–947, 2012.

HOLWERDA, E.K., LYND, L.R. Testing alternative kinetic models for utilization of crystalline cellulose (Avicel) by batch cultures of Clostridium thermocellum. *Biotechnology and Bioengineering*, 110(9), pp.2389–2394, 2013

HOSEN, M. A., HUSSAIN, M. A. AND MJALLI, F. S. Control of polystyrene batch reactors using neural network based model predictive control (NNMPC): An experimental investigation. *Control Engineering Practice* 19(5): 454-467. 2011.

HUANG, M., MA, Y., WAN, J., ZHANG, H., WANG, Y., CHEN, Y., YOO, C. AND GUO, W. A hybrid genetic – Neural algorithm for modeling the biodegradation process of DnBP in AAO system. *Bioresource Technology* 102(19): 8907-8913. 2011.

HUANG, Y., WANG, H., KHAJEPOUR, A., HE, H., JI, J. Model predictive control power management strategies for HEVs: *A review. J. Power Sources* 341, 91–106, 2017.

HUSSAIN, M.A. Adaptive inverse model control of a continuous fermentation process using neural network. *Application of Neural Networks and Other Learning Technologies in Process Engineering Imprevial College Press.* 2001.

JAIN, V. K., DIVOL, B., PRIOR, B. A., BAUER, F. F. Elimination of glycerol and replacement with alternative products in ethanol fermentation by Saccharomyces cerevisiae." *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38(9): 1427-1435. 2011.

JARZĘBSKI, A. Modelling of oscillatory behaviour in continuous ethanol fermentation. *Biotechnology Letters*, 14(2), 137-142. 1992.

KADLEC, P., GABRYS, B., STRANDT, S. Data-driven Soft Sensors in the process industry. Computers & Chemical Engineering. Pergamon, 33(4). 795–814. 2008

KANO, M., NAKAGAWA, Y. Data-based process monitoring, process control, and quality improvement: Recent developments and applications in steel industry. *Computers & Chemical Engineering* 32(1–2): 12-24. 2008.

KATAEVA, I., FOSTON, M. B., YANG, S.-J., PATTATHIL, S., BISWAL, A. K., POOLE II, F. L., BASEN, M., RHAESA, A. M., THOMAS, T. P., AZADI, P., OLMAN, V., SAFFOLD, T. D., MOHLER, K. E., LEWIS, D. L., DOEPPKE, C., ZENG, Y., TSCHAPLINSKI, T. J., YORK, W. S., DAVIS, M., MOHNEN, D., XU, Y., RAGAUSKAS, A. J., DING, S.-Y., KELLY, R. M., HAHN, M. G. AND ADAMS, M. W. W. Carbohydrate and lignin are simultaneously solubilized from unpretreated switchgrass by microbial action at high temperature Energy & amp; Environmental Science. *Energy & Environmental Science*. The Royal Society of Chemistry, 6(6), pp.2186–2195. 2013.

KELSEY, R.G. & SHAFIZADEH, F. Enhancement of cellulose accessibility and enzymatic hydrolysis by simultaneous wet milling. *Biotechnology and Bioengineering*, 22(5), pp.1025–1036, 1980.

KUMAR, M., KUMAR, D., MURTHY, G.S. Stochastic molecular model of enzymatic hydrolysis of cellulose for ethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, 2013.

LAMED, R., SETTER, E., BAYER, E.A. Characterization of a cellulose-binding, cellulasecontaining complex in Clostridium thermocellum. *Journal of Bacteriology*, 156(2), pp.828– 836. 1983.

ŁAWRYŃCZUK, M. Online set-point optimisation cooperating with predictive control of a yeast fermentation process: A neural network approach', *Engineering Applications of Artificial Intelligence*. Pergamon, 24(6), pp. 968–982, 2011.

LEDUY, A., ZAJIC, J. E. A geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point: Applied to growth and product formation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 15, n. 4, p. 805-810, 1973.

LEE, J. M.; POLLARD, J. F.; COULMAN, G. A. Ethanol fermentation with cell recycling: Computer simulation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 25, n. 2, p. 497-511, 1983.

LEE, J.H., NATARAJAN, S., LEE, K.S. A model-based predictive control approach to repetitive control of continuous processes with periodic operations. *J. Process Control* 11, 195–207, 2001.

LEE, M. W., HONG, S. H., CHOI, H., KIM, J.-H., LEE, D. S., PARK, J. M. Real-time remote monitoring of small-scalled biological wastewater treatment plants by a multivariate statistical process control and neural network-based software sensors. *Process Biochemistry* 43: 1107-1113. 2008.

LEVENSPIEL, O. Monod equation: a revised and a generalization to product inhibition situations. Biotechnology and Bioengineering, v. 22, n. 8, p. 1671-1687, 1980.

LI, N., XIA, L., SHIMING, D., XU, X. AND CHAN, M.-Y. Dynamic modeling and control of a direct expansion air conditioning system using artificial neural network. *Applied Energy*. *Elsevier*, 91(1): 290-300. 2012.

LUONG, J. H. T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 27, n. 3, p. 280-285, 1985.

LUTTMANN, R., Bracewell, D.G., Cornelissen, G., Gernaey, K. V., Glassey, J., Hass, V.C., Kaiser, C., Preusse, C., Striedner, G., Mandenius, C.-F. Soft sensors in bioprocessing: A status report and recommendations. Biotechnol. J. 7, 1040–1048, 2012.

LYND, L. R., LASER, M. S., BRANSBY, D., DALE, B. E., DAVISON, B., HAMILTON, R., HIMMEL, M., KELLER, M., MCMILLAN, J. D., SHEEHAN, J. AND WYMAN, C. E. 2008. How biotech can transform biofuels. *Nature biotechnology*, 26(2).

LYND, L.R., GRETHLEIN, H.E. Hydrolysis of dilute acid pretreated mixed hardwood and purified microcrystalline cellulose by cell-free broth from Clostridium thermocellum. *Biotechnology and Bioengineering*, 29(1), pp.92–100. 1987.

MACEDO, I. C. Estado da arte e tendências das tecnologias para Energia. Brasilia: Ministério da Ciência e da Tecnologia. CTEnerg-Secretaria Técnica do fundo Setorial de Energia. CGEE Centro de gestão e estudos estrategicos. 2003.

MAIS, U., ESTEGHLALIAN, A. R., SADDLER, J. N. AND MANSFIELD, S. D. Enhancing the enzymatic hydrolysis of cellulosic materials using simultaneous ball milling. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98(1), pp.815–832. 2002.

MANTOVANELLI, I. C.; RIVERA, E.; DA COSTA, A.; MACIEL FILHO, R. Hybrid neural network model of an industrial ethanol fermentation process considering the effect of temperature. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 137-140, n. 1-12, p. 817-833, 2007.

MAREŠ, J., DOLEŽEL, P., HRNČIŘÍK, P. Artificial Neural Network – Possible Approach to Nonlinear System Control. *Ind. Control Eng. Appl*, 2011.

MARTINS, L. H. D. S., RABELO, S. C., COSTA, A. C. D. Effects of the pretreatment method on high solids enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of the cellulosic fraction of sugarcane bagasse. Bioresource Technology, 191, 312-321, 2015.

MELEIRO, L.A. *Projeto e aplicação de controladores baseados em modelos lineares, neurais e nebulosos*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002. Tese (Doutorado).

MENEGOL D, FONTANA RC, DILLON AJ, CAMASSOLA M. Second-generation etanol production from elephant grass at high total solids. Bioresour Technol. 2016 Jul; 211: 280-90. doi: 10.1016/j.biortech.2016.03.098. Epub 2016 Mar 22. PubMed PMID: 27023383.

MÉSZÁROS, A., BAKOŠOVÁ, M. Inverse Model Based Neural Controllers with Adaptive Integral Part. *16th Mediterranean Conference on Control and Automation*. 303–308. 2008.

METCALFE, T. S. CHARBONNEAU, P. Stellar structure modeling using a parallel genetic algorithm for objective global optimization. *Journal of Computational Physics*, v. 185, n. 1, p. 176-193, 2003.

MJALLI, F.S., AL-ASHEH, S. Neural-Networks-Based Feedback Linearization versus Model Predictive Control of Continuous Alcoholic Fermentation Process. *Chem. Eng. Technol.* 28, 1191–1200, 2005.

MOHD, N., AZIZ, N. Performance and robustness evaluation of Nonlinear Autoregressive with Exogenous input Model Predictive Control in controlling industrial fermentation process. *J. Clean. Prod.* 136, 42–50, 2016.

MONOD, J. The growth of bacterial culture. *Annual Review of Microbiology*, v. 3, p. 371- 394, 1949.

NAGY, Z. K. Model based control of a yeast fermentation bioreactor using optimally designed artificial neural networks. *Chem. Eng. J.* 127, 95–109, 2007.

NELSON, D. L., COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry, Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch). 2005.

NEVOT, J. Diseño de un Controlador Avanzado Basado en Redes Neuronales para la Gestion de la Mezcla de Aire-Gasolina en un Motor Alternantivo. Cataluña: Universidad Politécnica de Cataluña. 1999. Tese Doutoral.

NIELSEN, M. K., ARNEBORG, N. The effect of citric acid and pH on growth and metabolism of anaerobic Saccharomyces cerevisiae and Zygosaccharomyces bailii cultures. *Food Microbiology*, 24 (1): 101-105. 2007.

NIKZAD, M. E. M., NAJAFPOUR, G., GHOREYSHI, A. L. I. A. Modeling And Optimization Of Ethanol Fermentation Using Saccharomyces Cerevisiae: Response Surface Methodology And Artificial Neural Network. Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly. Vol. 19 Issue 2, p241-252. 12p. 2013.

NREL, 2006. From biomass to biofuels: NREL leads the way. Nrel/Br-510-39436, pp.1–6. Available at: http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/39436.pdf [Accessed January 23, 2017].

OLSON, D.G., SPARLING, R. LYND, L.R. Ethanol production by engineered thermophiles. Current Opinion in Biotechnology, 33, pp.130–141, 2015.

OSORIO, D., RICARDO PÉREZ-CORREA, J., AGOSIN, E. CABRERA, M. Soft-sensor for on-line estimation of ethanol concentrations in wine stills. *Journal of Food Engineering* 87(4): 571-577. 2008.

PAENGJUNTUEK, W., THANASINTHANA, L. AND ARPORNWICHANOP, A. Neural network-based optimal control of a batch crystallizer. *Neurocomputing. Elsevier* 83(0): 158-164. 2012.

PAYE, J. M. D., GUSEVA, A., HAMMER, S. K., GJERSING, E., DAVIS, M. F., DAVISON, B. H., OLSTAD, J., DONOHOE, B. S., NGUYEN, T. Y., WYMAN, C. E., PATTATHIL, S., HAHN, M. G. AND LYND, L. R. Biological lignocellulose solubilization: comparative evaluation of biocatalysts and enhancement via cotreatment. *Biotechnol Biofuels*, 9(1), 1–13, 2016.

PAZ SUÁREZ, L. A., GEORGIEVA, P. AND FEYO DE AZEVEDO, S. Nonlinear MPC for fed-batch multiple stages sugar crystallization. *Chemical Engineering Research and Design* 89(6): 753-767. 2011.

PENG, J., Dubay, R. Nonlinear inversion-based control with adaptive neural network compensation for uncertain MIMO systems. *Expert Systems with Applications* 39(9): 8162-8171. 2012.

PENG, J., MENG, F. AND AI, Y. Time-dependent fermentation control strategies for enhancing synthesis of marine bacteriocin 1701 using artificial neural network and genetic algorithm. *Bioresource Technology* 138(0): 345-352. 2013.

PENIA KRESNOWATI, M. T. A., X. D. Chen. 2.39 - Continuous Operation. Comprehensive Biotechnology (Second Edition). M.-Y. Editor-in-Chief: Murray. Burlington, Academic Press: 527-535. 2011.

PEREIRA, L. G., CHAGAS, M. F., DIAS, M. O. S., CAVALETT, O., & BONOMI, A. Life cycle assessment of butanol production in sugarcane biorefineries in Brazil. *Journal of Cleaner Production*, 96, 557-568, 2015.

PEREIRA, L. H. *Modelagem Híbrido Neuronal Aplicada a Processos Fermentativos*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2001. Dissertação (Mestrado).

PESSOA, E. D. S. *Efeito da Temperatura na Cinetica da Fermentação álcoolica Continua com Alta Densidade Celular*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidad Estadual de Campinas, 1997. Dissertação (Mestrado).

PLAZAS, L. Modelagem e avaliação de diferentes cenários operacionais dos processos de pré-tratamento, hidrólise e fermentação para a produção de etanol 2G. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2015. Post-Doutorado.

RABELO, S. C. Avaliação e otimização de pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açucar para a produção de etanol de segunda geração. Doutora, Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2010. tese de Doutorado.

RABELO, S. C., AMEZQUITA FONSECA, N. A., ANDRADE, R. R., MACIEL FILHO, R. AND COSTA, A. C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. *Biomass and Bioenergy* 35(7): 2600-2607. 2011.

RADKE, E. Desenvolvimento de Modelos Híbridos-Neurais para Fermentação Alcoólica de Técnicas de Otimização do Processo. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002. Dissertação (Mestrado).

RAINBOW, C. Institute of brewing analysis committee measurement of yeast concentration. J. Inst. Brew. 74, 427–429, 1968.

REHM, H. J.; REED, G. Fundamentals of Biochemical Engineering. In: MOSER, R. A. (Ed.). Cap 14: Kinetics of Batch Fermentations: Wiley VCH, v.2, 1985. p.243-283. 1985.

RFA - Renewable Association. World Fuel Ethanol Production. Accesado em 20/02/2018, disponível em: http://www.ethanolrfa.org/resources/industry/statistics/#1454099103927-61e598f7-7643

RIVERA, E. C., ATALA, D. I. P., FILHO, F. M., CARVALHO DA COSTA, A., FILHO, R. M. Development of real-time state estimators for reaction–separation processes: A continuous

flash fermentation as a study case. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 49(4): 402-409. 2010.

RIVERA, E. C., COSTA, A. C., ANDRADE, R. R., ATALA, D. I. P., MAUGERI, F., MACIEL FILHO, R. Development of adaptive modeling techniques to describe the temperaturedependent kinetics of biotechnological processes. *Biochemical Engineering Journal* 36(2): 157-166. 2007.

RØNNEST, N.P., STOCKS, S.M., ELIASSON LANTZ, A., GERNAEY, K. V. Introducing process analytical technology (PAT) in filamentous cultivation process development: comparison of advanced online sensors for biomass measurement. J. *Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1679–1690, 2011.

SAVIOLI, E. (2015). *Cinética, estudo e avaliação do processo de deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com ácido sulfúrico diluído*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidad Estadual de Campinas, 2015. Dissertação (mestrado).

SAWIN, J. L., BHATTACHARYA, S. C., AMIN, A. Z., CLINI, C., ECKHART, M., GIREESH, S., PRADHAN, B., KAPPIAH, M., KOCH, H.-J., KUMAR, E., JUNFENG, L., LOHANI, B., GALÀN, E. M., MUBIRU, P., NASSIEP, K., OULD-DADA, Z., PACHAURI, R., PALZ, W., RADKA, M., SALVADORES, M. S., THOMPSON, G., TOGOLA, I. AND TULEJ, P. (2012). Renewables 2012 Global Status Report. Paris, France, REN21 Renewable pollicy Network for the 21st Century. Disponível Energy em http://www.ren21.net/Portals/0/documents/Resources/GSR2012 lowres FINAL.pdf. Acceso em Fevereiro 2018).

SCHMIDELL, W., LIMA, U. D. A., AQUARNE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial. São Pulo: *Edgar Blucher Ltda*, 2001.

SCHNEIDERMAN, S. J., JOHNSON, R. W., MENKHAUS, T. J., & GILCREASE, P. C. Quantifying second generation ethanol inhibition: Design of Experiments approach and kinetic model development. *Bioresource Technology*, 179, 219-226, 2015.

SEBORG, D.E., THOMAS, F.E., DUNCAN A, M. Process Dynamics and Control Seborg et al 2004.

SHAO, X., DIMARCO, K., RICHARD, T. L. AND LYND, L. R. 2015. Winter rye as a bioenergy feedstock: impact of crop maturity on composition, biological solubilization and potential revenue. *Biotechnol Biofuels*, 8(1), pp.1–10, 2015.

SHAO, X., JIN, M., GUSEVA, A., LIU, C., BALAN, V., HOGSETT, D., DALE, B. E. AND LYND, L. Conversion for Avicel and AFEX pretreated corn stover by Clostridium thermocellum and simultaneous saccharification and fermentation: Insights into microbial conversion of pretreated cellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 102(17), pp.8040–8045. 2011.

SILVERIO, F. Influencia conjunta do pH, temperatura e concntração de sulfito na fermentação alcoólica de mostos de sacarose. Faculdade de Engenharia Química, 2009. Universidade Federal de Uberlandia.

SIMS, R., TAYLOR, M., SADDLER, J., & MABEE, W. From 1st- to 2nd-generation bioful technologies: An overview of current industry and RD&D activities. In I. Bioenergy (Ed.), (pp. 124). France: International Energy Agency (IEA). 2008.

SLUITER, A. NREL/TP-510-42618 analytical procedure - Determination of structural carbohydrates and lignin in Biomass. *Laboratory Analytical Procedure* (LAP), (April 2008), p.17, 2012.

SOLOWAY, D., HALEY, P.J. Neural Generalized Predictive Control: A Newton-Raphson Implementation neural generalized predictive control. 1997.

SOONS, Z. I. T. A., STREEFLAND, M., VAN STRATEN, G. AND VAN BOXTEL, A. J. B. Assessment of near infrared and "software sensor" for biomass monitoring and control. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 94(2): 166-174. 2008.

SOUZA, G. M., VICTORIA, R., JOLY, C. AND VERDADE, L. *Bioenergy & amp; sustainability: bridging the gaps*, Scientific Committee on Problems of the Environment (SCOPE), 2015.

SRIVASTAVA, A. K., Gupta, S. 2.38 - Fed-Batch Fermentation – Design Strategies. Comprehensive Biotechnology (Second Edition). M.-Y. Editor-in-Chief: Murray. Burlington, Academic Press: 515-526. 2011.

TOSETTO, G. M. Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002. Dissertação (Mestrado).

VANZELLA, E., BARICCATTI, R.A., CAMARGO, C.E., NOGUEIRA, V.C., MICUANSKI, M.A. DA C. 2012. Processo Fermentativo na indústria sucroalcooleira 33–43.

VOGEL, H. C., TODARO, C. L. Fermentation and Biochemical Engineering Handbook. United States, Noyes Publications. 1997.

VON ZUBEM, F., ATTUX, R. Redes Neurais. Slides Disciplina de Redes Neurais. 2010.

WANG, F.-S., SU, T.-L., & JANG, H.-J. Hybrid Differential Evolution for Problems of Kinetic Parameter Estimation and Dynamic Optimization of an Ethanol Fermentation Process. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 40(13), 2876-2885, 2001.

XIONG, Z., HUANG, G., SHAO, H. On-line estimation of concentration parameters in fermentation processes. J. Zhejiang Univ. Sci. B 6, 530–4, 2005.

YANG, B., DAI, Z., DING, S.-Y. AND WYMAN, C. E. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels*, 2(4), pp.421–450, 2011.
YANG, S.-. J., KATAEVA, I., HAMILTON-BREHM, S. D., ENGLE, N. L., TSCHAPLINSKI, T. J., DOEPPKE, C., DAVIS, M., WESTPHELING, J. AND ADAMS, M. W. W. Efficient degradation of lignocellulosic plant biomass, without pretreatment, by the thermophilic anaerobe "Anaerocellum thermophile": DSM 6725. *Appl Environ Microbiol*, 75. 2009.

YAMAKAWA, C. Avaliação da fermentação alcoólica com reciclo de células de hidrolisado celulósico de bagaço de cana-de-açúcar em unidade integrada e autônoma. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas. 2010.

YEE, K. L., RODRIGUEZ, M., TSCHAPLINSKI, T. J., ENGLE, N. L., MARTIN, M. Z. AND FU, C. X. Evaluation of the bioconversion of genetically modified switchgrass using simultaneous saccharification and fermentation and a consolidated bioprocessing approach. *Biotechnol Biofuels*, 5(1), pp.1–12, 2012.

YU, R.-F., CHEN, H.-W., CHENG, W.-P. AND SHEN, Y.-C. Dinamyc control of disinfection for wastewater reuse applying ORP/pH monitoring and artificial neural networks. *Resources, Conservation and Recycling* 52: 1015-1021. 2008.

ZHOU, J. X., CHEN, D., ZHU, Y. H., LIAO, H. D., YUAN, L. AND CHEN, Z. H. Simultaneous wet ball milling and mild acid hydrolysis of rice hull. Journal of Chemical *Technology & Biotechnology*, 85(1), pp.85–90, 2010.

ZHU, G.-Y., ZAMAMIRI, A., HENSON, M.A., HJORTS, M.A. Model predictive control of continuous yeast bioreactors using cell population balance models. *Chem. Eng. Sci.* 55, 6155–6167. 2000.

APÊNDICE A



Figura A1. Perfis de concentração de substrato, células e produtos da planta de produção de etanol do sistema S2



Figura A2. Perfis de concentração de substrato, células e produtos da planta de produção de etanol do sistema S3



Figura A3. Perfis de concentração de substrato, células e produtos da planta de produção de etanol do sistema S4



Figura A4. Perfis de concentração de substrato, células e produtos da planta de produção de etanol do sistema S5

APÊNDICE B



Figura B1. Dados das variáveis de temperatura, pH, Vazão de CO2 e capacitância para S1



Figura B2. Dados das variáveis de temperatura, pH, Vazão de CO2 e capacitância para S2



Figura B3. Dados das variáveis de temperatura, pH, Vazão de CO2 e capacitância para S3



Figura B4. Dados das variáveis de temperatura, pH, Vazão de CO2 e capacitância para S4



Figura B5. Dados das variáveis de temperatura, pH, Vazão de CO2 e capacitância para S5





Figura C1. Concentração de substrato na saída dos reatores para os sistemas S2, S3, S4 e S5 em malha aberta com perturbação de ± 20 % no Fa.