

**MODELAGEM DE PROCESSO INDUSTRIAL DE  
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA CONTÍNUA COM REATORES  
DE MISTURA LIGADOS EM SÉRIE**

Universidade Estadual de Campinas  
Faculdade de Engenharia Química  
Departamento de Processos Biotecnológicos

**MODELAGEM DE PROCESSO INDUSTRIAL DE  
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA CONTÍNUA COM REATORES  
DE MISTURA LIGADOS EM SÉRIE**

**Autora: Lia de Mendonça Porto  
Orientador: Sílvio Roberto Andrietta**

Tese apresentada á Faculdade de  
Engenharia Química da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção  
do título de Doutor em Engenharia  
Química.

**Campinas – SP  
Dezembro de 2005**

ADA \_\_\_\_\_  
EX \_\_\_\_\_  
10/ 690-33  
6.135-06  
D x  
1,00  
33/06/06

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

P383m	Porto, Lia de Mendonça Modelagem de processo industrial de fermentação alcoólica contínua com reatores de mistura ligados em série / Lia de Mendonça Porto.--Campinas, SP: [s.n.], 2005.  Orientador: Sílvio Roberto Andrietta Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.  1. Fermentação. 2. Álcool – Combustível - Industria. 3. Usinas – Simulação por computador. 4. Modelos matemáticos. 5. Processos químicos. 6. Biotecnologia – Industria. I. Andrietta, Sílvio Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.
-------	--

2006/12/60

Titulo em Inglês: Industrial process modeling of continuos alcoholic fermentation in  
cascade bioreactors

Palavras-chave em Inglês: Fermentation, Alcohol, Simulation, Process, Fuel,  
Continuos

Área de concentração: Processos Biotecnológicos

Titulação: Doutora em Engenharia Química

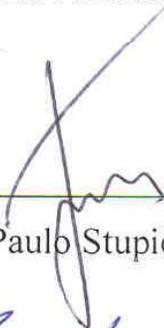
Banca examinadora: José Paulo Stupiello, Eloisio Julio Ribeiro, Rubens Maciel Filho,  
Daniel Ibrain Pires Atala

Data da defesa: 12/12/2005

Tese de doutorado defendida por Lia de Mendonça Porto e aprovada em 12 de dezembro de 2005 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta - Orientador



Dr. José Paulo Stupiello



Prof. Dr. Eloizio Julio Ribeiro



Prof. Dr. Rubens Maciel Filho



Prof. Dr. Daniel Ibraim Pires Atala

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química.



---

Prof. Dr. Sílvio Roberto Andrietta

Dedico, com muito carinho, este trabalho às irmãs  
Regina, pela ajuda financeira e sua alegria que sempre me encorajou,  
Fabiana, que nunca me deixou passar dificuldades e pelo seu carinho, e  
Liliana, pelo exemplo profissional e toda a ajuda tanto monetária quanto  
intelectual que me deu durante o doutorado.  
À Mamãe, Líria, que se eu fosse escrever os motivos ficariam maiores que minha  
tese, ela está nesta lista só por existir.  
Ao papai, Fábio, por me ajudar a ser quem eu sou.

## **Agradecimentos**

Este doutorado me mostrou o quanto eu posso contar com as pessoas, o que faz com que seja difícil expressar todos os agradecimentos necessários. Resolvi, então, fazê-lo em texto contínuo, de acordo com a cronologia.

Ao final do meu mestrado na UFMG, conversei com o Prof. Dr. Eloízio Ribeiro, da UFU, sobre o doutorado. Ele me indicou a Unicamp e entrei em contato com o Departamento de Processos Biotecnológicos daqui. Fui aceita como orientada pelo Prof. Dr. Sílvio Andrietta, mudando-me para Campinas no início de 2002, quando preparamos o projeto para pleitear bolsa. O momento de crise na época enfrentado pela FAPESP levou a que não conseguíssemos ajuda financeira desta instituição. Com o auxílio de minha família, a quem devo tanto, fiquei aqui até fevereiro de 2003. Durante este tempo, fiz grandes amigos no laboratório do CPQBA, onde desenvolvi a parte prática do trabalho – cito aqui as pesquisadoras Dra. Maria da Graça Stupiello e Dra. Cláudia Stroppa e, em especial, Milene, que me auxiliou em muitas etapas, Érica Ferreira, que me ajudou na realização de várias análises, e as colegas de pós Érika Durão, Gisele Tosetto e o casal Nayara Zago e José Antônio Bassetto Júnior, de quem fui madrinha de casamento. No início de 2003, a fim de enfrentar a falta de verbas, consegui um emprego na Fundação Educacional do Vale do Jequitinhonha (FEVALE) por intermédio do Prof. Aécio Miranda, tornando-me professora do curso superior de Matemática da Faculdade de Filosofia e Letras de Diamantina (FAFIDIA). Mudei-me para esta cidade e morei com Liliana, minha irmã, na casa de Seu José, Dona Carmem, Silmá, Madalena e Raquel, com quem tive momentos especiais de convivência. Nesta mesma época Conceição Maria do Socorro Ávila, diretora executiva da FEVALE, me ofereceu o cargo de coordenadora do processo seletivo das duas faculdades onde esta instituição é a fundação mantenedora – FAFIDIA e FCJ. As atividades em Diamantina me proporcionaram a possibilidade de vir regularmente a Campinas para dar continuidade ao doutorado. Em fevereiro de 2004, percebi a necessidade de um contato mais contínuo com o CPQBA na fase final do doutorado, e resolvi retornar para cá no segundo semestre. Planejei me sustentar aqui durante o tempo que restava com as economias que fiz em Diamantina. De volta aluguei um kitnet, quando, em outubro, tive todas as minhas coisas roubadas, inclusive o computador no qual desenvolvia o programa deste trabalho. Para minha sorte já tinha bons amigos aqui: me mudei para a República

Malditos, onde os rapazes me receberam sem nenhuma ressalva mesmo se tratando de uma república masculina. Fiquei por lá uns quinze dias até que conversei com uma amiga, Lucia Mattiello, que me convidou para morar com ela numa república feminina. Já nesta casa fui me reestruturando e voltei a trabalhar com o programa. Percebi algumas dificuldades, pois não tinha muito domínio do Delphi. Foi quando procurei o Prof. Dr. Rubens Maciel, que me indicou um orientado dele para me dar aulas, Agremis Guinho Barbosa. Não consegui um professor e sim um grande amigo, que me ajudou muito com a programação. Hoje estou terminando este doutorado graças a todas estas pessoas e muitas outras. Agradeço a todos que de forma direta ou indireta me ajudaram a me tornar doutora.

## Resumo

Este trabalho consiste em determinar o modelo que melhor descreve a fermentação alcoólica industrial, em sistemas contínuos de reatores de mistura em série. Para determinação dos parâmetros cinéticos foi desenvolvido um programa utilizando os dados de análises feitas em amostras retiradas de usinas em operação. Dos modelos testados, o Tosseto (2002), Lee; Pagan; Rogers (1983) e Levenspiel (1980), não apresentaram incoerência física nem problema de convergência sendo estes indicados para descrever a cinética da fermentação alcoólica. Os parâmetros cinéticos comuns aos modelos apresentaram valores semelhantes, onde o parâmetro  $K_s$ , limitação pelo substrato, foi de  $3,0 \pm 0,4$ , o valor da concentração limite pelo produto inibidor,  $P_{máx}$ , foi  $92 \pm 9$  e o fator exponencial de inibição pelo produto,  $Y_N$ , foi  $5,3 \pm 0,9$ . O fator de inibição pelo substrato do modelo Tosseto (2002),  $K_i$ , foi  $27 \pm 5$ . O parâmetro  $X_{máx}$ , inibição pela massa celular, e  $Y_M$ , fator exponencial desta inibição, para o modelo Lee; Pagan; Rogers (1983) foram  $100 \pm 1$  e  $0,9 \pm 0,1$ , respectivamente. A escolha pelo modelo Tosseto (2002) para implementação do programa de simulação do processo foi devido à tentativa de uma maior abrangência na obtenção das constantes cinéticas devido à possibilidade de inibição pelo substrato. A simulação em regime permanente trata-se da resolução equações algébricas dos balanços de massa do sistema e é capaz de dimensionar a etapa de fermentação de novas plantas a serem implantadas, enquanto que a simulação em regime transiente, tem o intuito de avaliar modificações durante a operação da usina e as equações diferenciais obtidas a partir dos balanços de massa devem ser resolvidas por método numérico, que neste caso foi utilizado o Runge-Kutta de quarta ordem.

## Abstract

This work aimed to determine a model that best describes the industrial scale alcoholic fermentation in continuous serial mixing reactors. Software was developed in order to establish the kinetics parameters, using analysis data performed on samples from operating plants. The models described by Tosseto (2002), Lee; Pagan; Rogers (1983) and Levenspiel (1980), did not display physical incoherence or even convergence problems that described alcoholic fermentation kinetics. The kinetics parameters shown in all models presented similar values, like  $K_s$  (substrate limitation) was  $3,0 \pm 0,4$ ,  $P_{max}$  (limited product concentration) was  $92 \pm 9$  and  $Y_N$  (product inhibition power factor) was  $5,3 \pm 0,9$ . The  $K_i$  (substrate inhibition) studied by Tosseto (2002) was  $27 \pm 5$ .  $X_{max}$  (cell mass inhibition) and  $Y_M$  (cell mass inhibition factor power) were respectively  $100 \pm 1$  and  $0,9 \pm 0,1$  to Lee; Pagan; Rogers (1983). The kinetics parameters abrange due the substrate inhibition obtained by Tosseto (2002) this model was chosen in order to implement the simulating software. The steady state simulation is about system's mass balance algebraic equations resolution and is capable to dimension the fermentation step in new plants to be implanted while the unsteady state simulation have the intention to evaluate modifications during the plant operation and the differential equations obtained from mass balance must be resolved by numerical methods, in this case, was used the fourth order Runge-Kutta.

# Sumário

1-	Revisão Bibliográfica .....	3
1.1.	Questões Ambientais da Agroindústria Canavieira.....	3
1.2.	Etanol.....	5
1.3.	Processos Fermentativos .....	10
1.3.1.	Batelada.....	11
1.3.2.	Batelada Alimentada .....	12
1.3.3.	Processo Contínuo.....	12
1.4.	Bioquímica da Fermentação Alcoólica .....	15
1.5.	Cinética da Fermentação .....	17
1.5.1.	Constantes Cinéticas.....	22
1.6.	Simulação .....	22
1.7.	Dinâmica da População de Cepas em Processos Industriais .....	24
1.7.1.	Método de Identificação de Leveduras .....	24
2-	Material e Métodos.....	27
2.1.	Usina de Açúcar e Álcool.....	27
2.2.	Ensaio Industriais.....	29
2.3.	Análises Laboratoriais .....	31
2.3.1.	Massa Seca .....	31
2.3.2.	Açúcares Redutores Totais.....	31
2.3.3.	Etanol.....	32
2.4.	Desenvolvimento do Programa .....	32
2.4.1.	Ajuste dos Modelos Cinéticos.....	33
2.4.2.	Simulação .....	34
-	Estado Estacionário (Permanente).....	34

- Estado Transiente .....	36
2.5. Utilização do Programa .....	38
2.5.1. Ajuste dos Modelos Cinéticos .....	39
2.5.2. Simulação .....	41
- Estado Estacionário .....	41
- Estado Transiente .....	43
2.6. Classificação das Cepas Dominantes .....	45
2.6.1. Plaqueamento .....	45
2.6.2. Cariotipagem .....	45
2.7. Capacidade Fermentativa das Cepas Dominantes .....	46
3- Resultados e Discussão .....	49
3.1. Análises Laboratoriais .....	49
3.1.1. Massa Seca .....	49
3.1.2. Açúcares Redutores Totais .....	51
3.1.3. Etanol .....	53
3.2. Classificação das Cepas Dominantes .....	56
3.2.1. Plaqueamento .....	56
3.2.2. Cariotipagem .....	59
3.2.3. Capacidade Fermentativa das Cepas Dominantes .....	60
3.3. Ajuste dos Modelos Cinéticos .....	62
3.4. Modelagem Matemática .....	72
3.4.1. Estado Estacionário .....	72
3.4.2. Estado Transiente .....	77
4- Conclusões .....	83
5- Referências .....	87
6- Apêndices .....	93

## Lista de Figuras

Figura 1: Seqüência de reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose), conduzida por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). .....	16
Figura 2: Esquema da etapa de fermentação de uma usina de álcool.....	27
Figura 3: Biorreatores da usina Clealco. ....	28
Figura 4: Foto da Usina Alvorada. ....	28
Figura 5: Biorreatores da usina Alvorada.....	29
Figura 6: Foto do ponto de coleta do mosto na Usina Alvorada. ....	30
Figura 7: Tanque de inóculo (fermento) para o processo de produção de álcool.....	30
Figura 8: Válvula lateral para retirada de amostra do biorreator.....	30
Figura 9: Fluxograma da implementação do programa para o ajuste das constantes cinéticas dos modelos não-estruturados e não segregados. ....	33
Figura 10: Fluxograma da implementação do programa para a simulação do modelo Tosetto(2002) para 4 reatores de mistura em série com reciclo de células. ....	34
Figura 11: Tela de entrada dos dados para simulação em regime permanente. ....	36
Figura 12: Tela de inicialização do programa. ....	38
Figura 13: Tela de entrada dos dados experimentais para cada um dos biorreatores.....	38
Figura 14: Tela de escolha do modelo para estudo do ajuste cinético. ....	39
Figura 15: Tela de entrada dos intervalos das constantes cinéticas dos modelos e dos dados de operação da usina.....	40
Figura 16: Tela de valores das constantes cinéticas, desvio de ajuste associado ao modelo e representação gráfica deste resultado. ....	41
Figura 17: Tela de entrada das constantes cinéticas e dados de produção para simulação do processo em regime permanente.....	42
Figura 18: Tela de saída das concentrações obtidas na simulação do estado estacionário. .	42
Figura 19: Tela de entrada das constantes cinéticas do modelo Tosetto (2002). ....	43

Figura 20: Tela de entrada das condições do sistema em regime permanente, antes da perturbação do sistema. ....	44
Figura 21: Tela de entrada dos valores que podem ser perturbados no processo de produção de álcool.....	44
Figura 22: Gráfico da concentração de massa seca nos reatores do ensaio na usina Alvorada em agosto de 2002. ....	50
Figura 23: Gráfico do perfil de concentração de massa seca nos reatores do ensaio na usina Clealco em agosto de 2002.....	50
Figura 24: Gráfico da concentração de massa seca no fermento dos ensaios experimentais das usinas Alvorada e Clealco. ....	51
Figura 25: Gráfico da concentração de ART no mosto durante os ensaios nas usinas. ....	52
Figura 26: Gráfico da concentração de ART nos biorreatores durante o ensaio na usina Alvorada em agosto de 2002. ....	52
Figura 27: Perfil de concentração de etanol em cada um dos biorreatores durante as oito horas de ensaio na usina Alvorada em outubro de 2002. ....	53
Figura 28: Perfil de concentração de ART na entrada do primeiro biorreator e etanol na saída do quinto biorreator, Alvorada, agosto de 2002.....	53
Figura 29: Perfis de concentração de etanol durante o ensaio da usina Alvorada onde (a) ensaio de agosto e (b) ensaio de outubro.....	54
Figura 30: Perfis de concentração de etanol durante o ensaio da usina Clealco, onde (a) ensaio de julho e (b) ensaio de agosto. ....	55
Figura 31: Perfis cromossômicos de isolados dominantes da safra 2002 da usina Alvorada. ....	60
Figura 32: Perfis cromossômicos de isolados dominantes da safra 2002 da usina Clealco. ....	60
Figura 33: Ajuste do modelo Levenspiel (1980) para dados da usina Clealco, agosto de 2002, com alto desvio de ajuste ocasionado por intervalo de ajuste inadequado.....	63

Figura 34: Tela de saída dos parâmetros cinéticos ajustados para: (a) Levenspiel, (b) Tosetto, (c) Ghose, (d) Jin, (e) Lee e (f) Sevely, com dados da Usina Alvorada, coleta de julho de 2002, e do desvio associado ao ajuste.....	64
Figura 35: Tela de saída dos parâmetros cinéticos ajustados para: (a) Levenspiel, (b) Tosetto, (c) Ghose, (d) Jin, (e) Lee e (f) Sevely, com dados da Usina Alvorada, coleta de agosto de 2002, e do desvio associado ao ajuste. ....	65
Figura 36: Tela de saída dos parâmetros cinéticos ajustados para : (a) Levenspiel, (b) Tosetto, (c) Ghose, (d) Jin, (e) Lee e (f) Sevely, com dados da Usina Alvorada, coleta de setembro de 2002, e do desvio associado ao ajuste. ....	66
Figura 37: Tela de saída dos parâmetros cinéticos ajustados para: (a) Levenspiel, (b) Tosetto, (c) Ghose, (d) Jin, (e) Lee e (f) Sevely, com dados da Usina Alvorada, coleta de outubro de 2002, e do desvio associado ao ajuste. ....	67
Figura 38: Tela de saída dos parâmetros cinéticos ajustados para: (a) Levenspiel, (b) Tosetto, (c) Ghose, (d) Jin, (e) Lee e (f) Sevely, com dados da Usina Clealco, coleta de julho de 2002, e do desvio associado ao ajuste. ....	68
Figura 39: Tela de saída dos parâmetros cinéticos ajustados para: (a) Levenspiel, (b) Tosetto, (c) Ghose, (d) Jin, (e) Lee e (f) Sevely, com dados da Usina Clealco, coleta de agosto de 2002, e do desvio associado ao ajuste. ....	69
Figura 40: Problema de ajuste dos parâmetros cinéticos do modelo Sevely para os dados da Usina Alvorada no ensaio de agosto de 2002.....	70
Figura 41: Tela de entrada dos dados para a simulação em regime permanente da usina Clealco com os dados do ensaio de julho de 2002 em regime permanente.....	73
Figura 42: Tela de saída da simulação em regime permanente, com dados do ensaio de julho de 2002 da usina Clealco.....	73
Figura 43: Tela de entrada dos dados para a simulação, em regime permanente, da usina Alvorada, com os dados do ensaio de setembro de 2002 porém com diminuição do volume dos biorreatores.....	74

Figura 44: Tela de saída da simulação em regime permanente, com dados do ensaio de setembro de 2002 da usina Alvorada, porém com diminuição do volume dos biorreatores. ....	75
Figura 45: Tela de entrada dos dados para a simulação, em regime permanente, da usina Alvorada, com os dados do ensaio de setembro de 2002 e vazões de mosto e fermento duplicadas. ....	75
Figura 46: Tela de saída da simulação em regime permanente, com dados do ensaio de setembro de 2002 da usina Alvorada e vazões de mosto e fermento duplicadas. ....	76
Figura 47: Curvas dos componentes presentes nos biorreatores de dados experimentais e simulados: (a) Usina Alvorada, setembro de 2002, (b) Usina Clealco, julho de 2002. ....	76
Figura 48: Tela de entrada das constantes cinéticas para simulação em regime transiente. ....	78
Figura 49: Tela de entrada das condições do processo em regime permanente anterior à modificação do sistema, da usina Clealco em julho de 2002. ....	78
Figura 50: Tela de entrada de novos valores para condições operacionais do processo de fermentação alcoólica para uma usina em operação. ....	79
Figura 51: Tela de saída de dados da simulação do regime transiente. ....	79
Figura 52: Tela de entrada de dados do regime permanente anterior à modificação do sistema, com dados do ensaio da usina Alvorada de julho de 2002. ....	80
Figura 53: Tela de entrada de novos valores para condições operacionais do processo de fermentação alcoólica para uma usina em operação. ....	81
Figura 54: Tela de saída dos resultados da simulação. ....	81

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Emissão de carbono pelo setor sucroalcooleiro (MACEDO(1996) citado por MACEDO; CORTEZ, 2005).....	4
Tabela 2: Quantidade de etanol adicionado á gasolina entre 1979 e 2005 para cada litro comercializado.....	7
Tabela 3: Produção de cana de açúcar no Brasil, de 1998 à 2004, em milhões de toneladas	8
Tabela 4: Produção de álcool, de 1998 à 2004, em milhões de m <sup>3</sup> .....	9
Tabela 5: Modelos matemáticos não-estruturados e não-segregados propostos para a fermentação alcoólica, suas condições e autores.....	20
Tabela 6: Autores e parâmetros cinéticos de modelos baseados na cinética convencional de Michaelis-Menten.....	22
Tabela 7: Condições da cariotipagem das cepas .....	46
Tabela 8: Composição do meio de fermentação utilizado nos testes das cepas presentes nos biorreatores das usinas Alvorada e Clealco na safra de 2002.....	47
Tabela 9: Pontuação e limites das faixas de variação dos parâmetros utilizados na classificação das leveduras( ANDRIETTA; MIGLIARI; ANDRIETTA, 1999).....	47
Tabela 10: Contagem e aparência das cepas dominantes do processo da usina Clealco nas datas de amostras coletadas, na safra de 2002.....	57
Tabela 11: Contagem e aparência das cepas dominantes do processo da usina Alvorada nas datas de amostras coletadas, na safra de 2002.....	58
Tabela 12: Valores de rendimento em células ( $Y_{x/s}$ – g massa seca/g ART consumido), velocidade de consumo de substrato (VCS – g de ART/L.h), nível de conversão de substrato (NCO - %), produtividade (PROD – g de etanol/L.h) e rendimento em etanol ( $Y_{p/s}$ – g de etanol/g de ART consumido) das leveduras isoladas das usinas Alvorada (A) e Clealco (CL).....	61
Tabela 13: Média das concentrações de ART, etanol e massa celular das três primeiras horas de ensaio da usina Alvorada em agosto de 2002 .....	62

Tabela 14: Análises laboratoriais das amostras coletadas na Usina Alvorada em julho de 2002 .....	106
Tabela 15: Análises laboratoriais das amostras coletadas na Usina Alvorada em agosto de 2002 .....	107
Tabela 16: Análises laboratoriais das amostras coletadas na Usina Alvorada em setembro de 2002 .....	109
Tabela 17: Análises laboratoriais das amostras coletadas na Usina Alvorada em outubro de 2002 .....	111
Tabela 18: Análises laboratoriais das amostras coletadas na Usina Clealco em julho de 2002 .....	113
Tabela 19: Análises laboratoriais das amostras coletadas na Usina Clealco em agosto de 2002 .....	115
Tabela 20: Concentrações dos componentes ART, etanol e células nos biorreatores e volume dos biorreatores durante o ensaio de julho de 2002 na usina Alvorada .....	117
Tabela 21: Concentrações dos componentes ART, etanol e células nos biorreatores e volume dos biorreatores durante o ensaio de agosto de 2002 na usina Alvorada .....	118
Tabela 22: Concentrações dos componentes ART, etanol e células nos biorreatores e volume dos biorreatores durante o ensaio de setembro de 2002 na usina Alvorada ..	119
Tabela 23: Concentrações dos componentes ART, etanol e células nos biorreatores e volume dos biorreatores durante o ensaio de outubro de 2002 na usina Alvorada ....	120
Tabela 24: Concentrações dos componentes ART, etanol e células nos biorreatores e volume dos biorreatores durante o ensaio de julho de 2002 na usina Clealco .....	121
Tabela 25: Concentrações dos componentes ART, etanol e células nos biorreatores e volume dos biorreatores durante o ensaio de agosto de 2002 na usina Clealco .....	122

## Nomenclatura

A	usina Alvorada
CL	usina Clealco
$F_{i-1}$	vazão de entrada no biorreator $i$ ( $\text{m}^3/\text{h}$ )
$F_i$	vazão de saída do biorreator $i$ ( $\text{m}^3/\text{h}$ )
$h$	passo de integração do método Runge-Kutta
$k$	constante da taxa de reação
$k_1, k_2, k_3, k_4$	parâmetros do método Runge-Kutta
$K_i$	constante de inibição pelo substrato ( $\text{g/L}$ )
$K_M$	fator de limitação pelo substrato (constante de Monod) ( $\text{g/L}$ )
$K_p$	constante de inibição pelo produto ( $\text{g/L}$ )
$K_1$	fator exponencial de inibição pelo produto ( $\text{L/g}$ )
$K_2$	fator exponencial de inibição pelo substrato ( $\text{L/g}$ )
NCO	nível de conversão de substrato
$P_i$	concentração de produto no biorreator $i$ ( $\text{g/L}$ )
$P_{\max}$	concentração máxima de produto ( $\text{g/L}$ )
PROD	produtividade
$S_i$	concentração de substrato no biorreator $i$ ( $\text{g/L}$ )
T	tempo de residência hidráulico (h)
$X_i$	concentração de células no biorreator $i$ ( $\text{g/L}$ )
$V_i$	volume do biorreator $i$ ( $\text{m}^3$ )
VCS	velocidade de consumo de substrato
$Y_{p/s}$	rendimento em etanol

$Y_{x/s}$	rendimento em células
$Y_N$	fator potência de inibição pelo produto
$Y_M$	fator potência de inibição pela massa celular
$\mu$	velocidade específica de reação ( $h^{-1}$ )
$\mu_{max}$	velocidade específica máxima de reação ( $h^{-1}$ )
$\mu_c$	velocidade específica de reação com atraso linear ( $h^{-1}$ )
$\tau$	tempo de residência (h)

## Introdução

O Brasil é, mundialmente, o país com a maior tecnologia de processo da fermentação alcoólica para produção de álcool e possui mercado garantido, devido ao álcool anidro adicionado à gasolina, obrigatório por lei nacional em substituição ao chumbo, ou hidratado como combustível. O desenvolvimento do motor multicomcombustível, iniciado em 1994, aumenta ainda mais o mercado nacional. A indústria sucroalcooleira é ecologicamente interessante, pois reduz os gases do efeito estufa provenientes da queima de combustíveis fósseis no país numa taxa próxima de 20%.

O processo contínuo de produção começou a ser utilizado a partir da década de 80. Reatores do tipo tubular foram testados laboratorialmente, porém o desprendimento de dióxido de carbono provoca uma mistura imperfeita no sistema, o que abaixa velocidade da reação, assim como em reator de mistura perfeita, devido à inibição provocada pelo etanol. Contudo, reatores de mistura podem ser arrançados em série possibilitando uma fermentação mais eficiente, diminuindo este efeito de inibição.

Usinas de álcool implantadas com o processo contínuo não passaram por um planejamento rigoroso de cinética, otimização e controle.

O estudo cinético de processos biotecnológicos foi ênfase de trabalhos de vários autores que desenvolveram modelos para condições específicas e microrganismos distintos. Este trabalho tem como um dos objetivos avaliar, dentro dos modelos já desenvolvidos, aquele que melhor descreve a cinética de uma usina em operação.

As coletas de amostras foram feitas em usinas durante o período de safra de 2002 em condições específicas de operação previamente ajustadas. As usinas estudadas possuem processo contínuo com reatores em série e reciclo de células. As amostras foram retiradas de cada um dos biorreatores, do mosto e do fermento e foram analisadas quanto à concentração de açúcares redutores totais, etanol e células. Ainda foram retiradas as cepas do fermento e estas analisadas quanto à quantidade, capacidade fermentativa e cariotipagem.

Os resultados das análises, juntamente com os dados de operação no momento das coletas, foram utilizados como dados de entrada para verificação do ajuste dos modelos e o cálculo dos parâmetros cinéticos associados a eles.

A obtenção do modelo cinético mais adequado viabiliza, então, a execução do outro objetivo deste trabalho que é o desenvolvimento de um programa que seja capaz de simular uma usina de álcool em operação.

A caracterização das cepas foi importante para uma melhor compreensão do processo devido à variedade de microrganismos no processo industrial. É importante perceber que o modelo que melhor descreveu o processo como um todo poderia ser diferente se estivesse presente somente um tipo de levedura.

Este trabalho possui uma revisão bibliográfica, onde são apresentadas algumas considerações relevantes para o desenvolvimento do mesmo, além de teoria sobre fermentação alcoólica, cinética de fermentação, metabolismo de levedura, simulação e dinâmica de população no processo. Em seguida estão os procedimentos utilizados nas usinas, no laboratório e no desenvolvimento do programa. Sendo então feita a apresentação e discussão dos resultados experimentais e da simulação possibilitando a conclusão geral do trabalho. Seguem-se as referências bibliográficas e nos apêndices estão todos os dados obtidos no laboratório e a síntese da programação desenvolvida.

# 1- Revisão Bibliográfica

Inicialmente serão apresentados os pontos relevantes ao desenvolvimento deste trabalho e conhecimentos teóricos da cinética e do processo de produção de álcool por via fermentativa, a partir de bibliografia disponível.

## *1.1. Questões Ambientais da Agroindústria Canavieira*

O Protocolo de Quioto, assinado em dezembro de 1997 em Quioto, no Japão, estabeleceu obrigações de redução de emissões de gases de efeito estufa a serem cumpridas pelos países desenvolvidos. Estados Unidos, Europa e Japão assumiram o compromisso de reduzir as emissões desses gases em 5,2% (em média) relativamente aos níveis emitidos em 1990. A efetiva contabilização dessas reduções, entretanto, deverá ocorrer no período de 2008 a 2012 (OMETTO, 2001).

Para que o projeto de determinado país em desenvolvimento possa dar origem a um certificado de redução de emissões, é necessário, em primeiro lugar, estabelecer uma linha de base correspondente à situação que ocorreria se o projeto não fosse realizado. Dessa forma, seriam contabilizadas as emissões do projeto da linha de base, relativamente à mesma produção. A diferença obtida, conceituada como adicionalidade, é que determina o volume de redução de emissões a ser atribuído ao projeto (OMETTO, 2001).

Neste contexto, a substituição de combustíveis fósseis por álcool se mostrou uma estratégia importante na citada redução. Com efeito, o álcool é reconhecido mundialmente por suas vantagens ambientais, na medida que contribui para reduzir a poluição atmosférica nos grandes centros (COBRA, 2001).

Submetido aos países na reunião de Julho de 2001, em Bonn, na Alemanha, o Protocolo de Quioto não foi ratificado pelos Estados Unidos. Por outro lado, importantes países confirmaram o seu apoio, como as nações da União Européia, Japão, Canadá, Austrália, Nova Zelândia e países em desenvolvimento, como o Brasil (OMETTO, 2001).

As plantas acumulam anualmente, através da fotossíntese, cerca de 17 vezes mais energia do que a humanidade consome hoje, além disso, a fonte vegetal, por ser renovável, possibilita uma alternativa de combustível cuja produção contínua não é ameaçada. A

produção do álcool a partir da cana oferece uma grande alternativa para os países tropicais e semitropicais (LIMA; MARCONDES, 2002).

A indústria do açúcar e do álcool controla satisfatoriamente os impactos ambientais. Seus principais efluentes, a vinhaça, a torta de filtro e as cinzas das caldeiras, são usados como fertilizantes nas plantações de cana. Os processos empregados geralmente são fáceis de serem mantidos limpos: as temperaturas não são muito altas, as emissões não são tóxicas, não há emissões de produtos químicos e os exaustores das caldeiras não liberam enxofre (MACEDO; CORTEZ, 2005).

As principais vantagens da adição de etanol à gasolina (em substituição ao chumbo) são notórias sendo uma delas a redução dos níveis de emissão de CO<sub>2</sub>. A agroindústria canavieira no Brasil, por meio do álcool combustível e do bagaço da cana-de-açúcar, tem proporcionado, pela substituição de derivados de combustíveis fósseis, a redução de emissões para a atmosfera de 12,7 milhões de toneladas ao ano. Isso equivale a aproximadamente 20% de todas as emissões de carbono provenientes da queima de combustíveis fósseis no país (OMETTO, 2001). A Tabela 1 apresenta o detalhamento da redução de emissões de carbono pelo setor sucroalcooleiro, para o ano de 1996 (MACEDO; CORTEZ, 2005).

Tabela 1: Emissão de carbono pelo setor sucroalcooleiro (MACEDO(1996) citado por MACEDO; CORTEZ, 2005)

	10 <sup>6</sup> tC (equiv.)/ano
Uso de combustíveis fósseis na agroindústria	+1,28
Emissões de metano na queima da cana	+0,06
Emissões de N <sub>2</sub> O	+0,24
Substituição de gasolina por etanol	-9,13
Substituição de óleo combustível por bagaço	-5,20
<b>Contribuição líquida (redução na emissão de carbono)</b>	<b>-12,74</b>

Para se ter uma noção da magnitude relativa envolvida, basta lembrar que os países desenvolvidos assumiram em Quioto o compromisso de reduzir suas emissões em 5,2%. Ou seja, o setor sucroalcooleiro permitiu ao Brasil reduzir suas emissões de gases de

efeito estufa, no setor energético, em uma proporção quatro vezes maior do que as obrigações assumidas pelos países desenvolvidos (OMETTO, 2001).

O setor automobilístico vem investindo no desenvolvimento de tecnologia para uso do bicomcombustível (álcool/gasolina), absorvendo, assim, o aumento da oferta de álcool no mercado. Estudos para utilização do bicomcombustível, no Brasil, deram início na empresa Bosch, em 1994, que vislumbrou a possibilidade de os veículos *flex-fuel* substituírem os veículos exclusivamente a álcool, que, na ocasião, apresentavam declínio de vendas (DEIMLING; BORILLI, 2005).

Poucos setores da atividade econômica apresentam potencial comparável ao da agroindústria canavieira – através das fontes geradoras de energia renováveis álcool e bagaço – para redução de emissão de gases de efeito estufa. Nesse sentido, os incentivos à redução de emissões deverão constituir um estímulo adicional ao crescimento do setor (OMETTO, 2001).

Com a nova legislação, criada em 1997, algumas áreas terão que eliminar as queimadas que antecedem à colheita, proporcionando uma grande quantidade excedente de biomassa. Se as queimadas forem eliminadas em 55% da área total usada para a plantação de cana-de-açúcar, em um período de 8 a 12 anos, a quantidade adicional de biomassa disponível seria de 20 bilhões de toneladas por ano (matéria seca). Um programa abrangente para a avaliação e desenvolvimento de sistemas de coleta e preparo da palha da cana, bem como processos de utilização de palha, têm sido conduzidos e indicam excelentes oportunidades para os próximos anos (MACEDO; CORTEZ, 2005).

## ***1.2. Etanol***

A indústria de álcool industrial desenvolveu-se na Europa, em meados do século 19; no último quarto desse século iniciou-se a produção de etanol no Brasil, com as sobras de melaço da indústria de açúcar, que ampliava sua capacidade produtiva (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Os brasileiros conheciam a possibilidade de utilização do álcool como combustível desde 1925. Nesta época, porém, a gasolina era abundante, barata e consumida em pequena escala, não havendo interesse no aperfeiçoamento das pesquisas que conduzissem a uma melhor utilização e exploração do álcool como combustível. No entanto, já na década de

vinte, existiam veículos movidos à combustível composto, 75% de álcool e 25% de éter (SILVA; SILVA, 1997).

Em 1929 a grande crise internacional colocou em xeque as economias de todos os países e, no Brasil, a indústria açucareira não ficou a salvo. Sobrava açúcar e faltavam divisas para a aquisição de combustível líquido. A primeira destilaria de álcool anidro foi instalada e o Governo Federal, em 1931, estabeleceu a obrigatoriedade da mistura de 5% de etanol à gasolina – Decreto 19.717 –, como medida de economia na importação de combustível e para amparar a lavoura canavieira. Por muitos anos não houve álcool suficiente para misturar a todo o combustível consumido (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). A fim de enfrentar esta situação, foi criado o Instituto do Açúcar e Álcool – IAA –, em 1933, fazendo com que a produção brasileira fosse crescente desde então.

Na segunda guerra, para conviver com a escassez de gasolina, o Brasil utilizava o álcool adicionado a ela ou mesmo isoladamente em motores convertidos para esta finalidade (SILVA; SILVA, 1997).

No início da década de 1970, o Brasil já se preocupava com o fornecimento de petróleo mundial e várias crises estavam apontando (LIMA; MARCONDES, 2002).

Os ministros da Organização dos Países Exportadores de Petróleo – OPEP –, em 1970 e 1973, assumiram, ao mesmo tempo, o controle dos preços e da produção. Com isso, o preço do petróleo chegou a ter um aumento de 100% em poucas semanas. Frente a esta situação, o programa nacional do álcool foi inicialmente apresentado pelo II Plano Nacional de Desenvolvimento – II PND, em 1974, apontando este combustível como opção energética a ser implantado no país (LIMA; MARCONDES, 2002).

Em outubro de 1975, foi anunciado o Programa Nacional do Álcool, Proálcool, quando foram definidos os mecanismos legais do plano, visando a produção de álcool para fins carburantes. Em novembro de 1975, o Decreto de número 76.593, datado de 14 de novembro de 1975, define o elenco de medidas, as metas do programa e os objetivos da política econômica (LIMA; MARCONDES, 2002).

O Proálcool passou por duas fases distintas, sendo que a primeira visava produzir álcool anidro com o objetivo de adicioná-lo à gasolina propiciando economia do petróleo importado, como pode ser visto na Tabela 2. A segunda fase visava produzir álcool suficiente para abastecer os veículos movidos à álcool hidratado (SILVA; SILVA, 1997).

Tabela 2: Quantidade de etanol adicionado á gasolina entre 1979 e 2005 para cada litro comercializado

Ano	Volume de álcool (L)	Volume de gasolina (L)	Porcentagem de etanol na gasolina (%)
1979	0,14	0,86	14
1980	0,17	0,83	17
1981	0,12	0,88	12
1982-1986	0,20	0,80	20
1987-2002	0,22	0,78	22
2002-2005	0,24	0,76	24

Fonte: UNICA (2005)

O ideal para o país é que a mistura seja de 24%, para evitar a alta taxa de contaminação atmosférica, pela presença do chumbo tetraetila ou do MTBE, notadamente nas grandes cidades. Porém, esta mistura só atende à grande São Paulo, sendo que, no restante do país, a mistura média é de 15 a 18% (LIMA; MARCONDES, 2002).

O Brasil foi o país que mais investiu no desenvolvimento das técnicas de produção de álcool nas últimas décadas e é o maior produtor de álcool por via fermentativa. Apesar disso, uma grande parte de suas unidades produtoras, ainda, apresenta possibilidade de melhoras tanto de projeto quanto operacionais (ANDRIETTA, 1994).

O Brasil é, hoje, o único país a oferecer um leque de opções ecologicamente corretas: prevê a adição de álcool anidro à gasolina, desenvolveu o carro a álcool puro e, desde 2003, domina com extrema competência a tecnologia multicomcombustível. Segundo dados da Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores (Anfavea), em 2004 foram vendidas 379.328 unidades de carro a álcool. Desse total, 328.774 eram equipadas com sistema bicombustível (gasolina-álcool) ou tricombustível (gasolina-álcool-gás natural veicular), genericamente chamado de *Flex Fuel*. O tricombustível pode funcionar de quatro formas: alimentado só por gás natural, só por álcool, só por gasolina ou mistura de álcool/gasolina (O SUCESSO, 2005).

A produção nacional de álcool etílico entre 1987 e 1995 oscilou entre 11,4 e 12,9 bilhões de litros. Nos dois anos seguintes a produção cresceu até atingir um máximo de 15,5 bilhões de litros em 1997 (BAJAY; FERREIRA, 2005).

Na safra de 1997-1998, foram produzidos aproximadamente 15 bilhões de litros de etanol (equivalente a 220 mil barris de petróleo por dia) para serem usados como combustível de carros e mais de 1,6 bilhão de litros destinados a usos não energéticos. A produção de etanol anidro como combustível foi de 5,3 bilhões de litros e da forma hidratada foi de 9,6 bilhões de litros (HALL; HOUSE; SCRASE, 2005).

A evolução da produção de cana no Brasil a partir da safra 1998/1999 até 2004/2005 está apresentada na Tabela 3 e a produção de álcool neste mesmo período está apresentado na Tabela 4. E com base em dados analisados em conjunto com o Inpe (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais) e CTC (Centro de Tecnologia Canavieira), a Única – União da Agroindústria Canavieira de São Paulo estima que a safra de cana-de-açúcar 2005/2006 da Região Centro-Sul do País irá atingir as 345 milhões de toneladas, número que se situa num patamar inferior ao de todas as previsões disponíveis no mercado (CARVALHO, 2005).

Tabela 3: Produção de cana de açúcar no Brasil, de 1998 à 2004, em milhões de toneladas

Local de produção	Safras					
	98/99	99/00	00/01	01/02	02/03	03/04
Centro/Sul	269,52	263,97	207,10	244,22	268,55	298,60
- São Paulo	199,31	194,23	148,26	176,57	190,63	207,57
-Demais cidades do Centro/Sul	70,21	69,74	58,84	67,65	77,92	91,03
Norte/Nordeste	45,14	36,44	49,29	47,70	50,46	60,194
BRASIL	314,66	300,41	256,39	291,92	319,01	358,79

Fonte: UNICA (2005)

Tabela 4: Produção de álcool, de 1998 à 2004, em milhões de m<sup>3</sup>

Local de produção	Safras					
	98/99	99/00	00/01	01/02	02/03	03/04
Álcool	13,912	12,780	10,572	11,493	12,595	14,764
Centro/Sul	12,281	11,634	9,076	10,157	11,154	13,024
Norte/Nordeste	1,631	1,146	1,496	1,336	1,441	1,740

Fonte: UNICA (Centro/Sul) e DATAGRO (Norte/Nordeste) - 2005

As vantagens da utilização de etanol com relação a outros combustíveis são (HALL; HOUSE; SCRASE, 2005):

- combustível líquido conhecido;
- emissões orgânicas com menos reatividade que as emissões da gasolina (mas mais reativas que as do metanol);
- menor emissão de poluentes tóxicos;
- maior eficiência do motor;
- produzido a partir de fontes domésticas;
- veículo de transição multicomcombustível disponível;
- produção baseada em enzima a partir de madeira está sendo desenvolvida.

Em contrapartida, as desvantagens são (HALL; HOUSE; SCRASE, 2005):

- custo mais alto do que o da gasolina;
- competição com combustível/alimentos em níveis de produção mais altos;
- fornecimento limitado;
- faixa de rendimento 20% menor;
- tanques de combustíveis maiores.

Inúmeras razões de cunho ambiental, social, tecnológico e estratégico justificaram a criação do Proálcool. Em uma eventual retomada do programa, como tem sido advogado por alguns, deveria haver um esforço conjunto do governo, produtores de álcool, fabricantes de carros e institutos de pesquisa ligados ao setor sucroalcooleiro para fomentar

ainda mais a competição entre os produtores e preparar o terreno para um novo ciclo de crescimento. Essa “terceira fase” do programa seria caracterizada por altos níveis de produtividade e baixos custos de produção, bem como por ganhos adicionais no que concerne às questões ambientais e sociais. Os preços do petróleo relativamente elevados nos últimos anos e leis de proteção ambiental mais rigorosas devem favorecer a retomada do Proálcool (BAJAY; FERREIRA, 2005).

A agroindústria canavieira do Brasil foi pioneira na utilização, em larga escala, do álcool combustível, oferecendo um exemplo prático de desenvolvimento sustentável ao combinar contribuição à melhoria do meio ambiente, exploração de vocações econômicas locais e geração descentralizada de emprego e renda (SZWARC, 2004 citado por DEIMLING;BORILLI, 2005). Esta indústria ostenta um dos maiores índices de empregabilidade nacional, o setor absorve um contingente de mão-de-obra que se aproxima de 1,5 milhão de pessoas e movimenta R\$12,7 bilhões por ano, entre faturamentos diretos e indiretos, o que corresponde a 2,3% do PIB brasileiro (COBRA, 2001).

O panorama internacional ressalta os ganhos de competitividade da produção brasileira no mercado mundial, pois nos USA o gasto de produção de um galão de álcool vai de US\$1,05 a US\$1,20, na Europa é de US\$2,00 a US\$2,20 enquanto no Brasil fica entre US\$0,57 a US\$0,64 (SZWARC, 2004 citado por DEIMLING;BORILLI, 2005).

### ***1.3. Processos Fermentativos***

Denominam-se “biorreatores”, “reatores bioquímicos”, ou ainda, “reatores biológicos”, os reatores químicos nos quais ocorrem uma série de reações químicas catalisadas por “biocatalisadores”, os quais podem ser enzimas ou células vivas (SCHIMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

A partir do ano de 1950, ocorreu um maior desenvolvimento da área de reatores, encontrando a mesma, desde então, um formidável avanço, sendo responsável pelo sucesso de muitos processos fermentativos, obviamente ao lado dos demais desenvolvimentos das áreas mais básicas, por exemplo, a microbiologia destes processos (SCHIMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

Um reator biológico pode ser operado de forma descontínua, com um inóculo por tanque ou por sistema de cortes, semicontínua, descontínua alimentada ou contínua, todos podendo trabalhar com ou sem recirculação celular (SCHIMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

Quando o Programa Nacional do Alcool foi estabelecido no Brasil todas as novas destilarias foram montadas baseadas no processo convencional de fermentação em batelada alimentada (ZARPELON; ANDRIETTA, 1992), conhecido como “Melle-Boinot”.

Segundo o Centro de Tecnologia Canavieira (2005), 75 a 85% das usinas de produção de álcool no Brasil utilizam o processo batelada alimentada, enquanto 15 a 25% o processo contínuo.

### **1.3.1. Batelada**

O processo descontínuo simples pode ter uma descrição típica do tipo: prepara-se um certo meio de cultura que seja adequada à nutrição e desenvolvimento do microrganismo, bem como o acúmulo do produto desejado; coloca-se este meio de cultura em um biorreator (fermentador); adiciona-se o microrganismo responsável pelo processo biológico (inóculo) e se aguarda que o processo ocorra. Após um determinado tempo de fermentação, retira-se o caldo fermentado do reator e executam-se as operações unitárias necessárias para a recuperação do produto (SCHIMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

Este processo é o mais seguro quando se tem problema de manutenção e condições de assepsia, pois ao final de cada batelada imagina-se que o reator deva ser esterilizado juntamente com o novo meio de cultura, recebendo um novo inóculo, o qual poderá sofrer todos os controles necessários, a fim de assegurar a presença única do microrganismo responsável pelo processo (SCHIMIDELL; FACCIOTTI, 2001). Além de menores riscos de contaminação, este processo apresenta grande flexibilidade de operação, devido ao fato de poder utilizar os fermentadores para a fabricação de diferentes produtos, a possibilidade de realizar fases sucessivas no mesmo recipiente, condição de controle mais estreito da estabilidade genética do microrganismo, assim como a capacidade de identificar todos os materiais relacionados quando se está desenvolvendo um determinado lote de produto (CARVALHO; SATO, 2001a).

A fermentação descontínua pode levar a baixos rendimentos e/ou produtividades, quando o substrato adicionado de uma só vez no início da fermentação exerce efeitos de

inibição, repressão, ou desvia o metabolismo celular a produtos que não interessam (CARVALHO; SATO, 2001a).

O biorreator batelada será sempre usado como base para as comparações de eficiências atingidas com relação aos outros processos, mas a sua baixa eficiência estimula o surgimento de formas alternativas (SCHIMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

### **1.3.2. Batelada Alimentada**

O processo batelada alimentada, também conhecido como Melle-Boinot, é um processo onde o substrato é alimentado sob condições controladas até atingir o volume do biorreator. É importante enfatizar que a despeito de ser um processo antigo, o sistema Melle-Boinot é muito conveniente e satisfatório quanto a operação e eficiência de conversão dos açúcares a álcool, que muitos dos processos contínuos desenvolvidos eram tão inferiores que foram abandonados (ZARPELON; ANDRIETTA, 1992).

Basicamente, o processo descontínuo alimentado é definido como uma técnica em processos microbianos, onde um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo e em que os produtos aí permanecem até o final da fermentação. A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo, e a adição de mosto pode ser de forma contínua ou intermitente (CARVALHO; SATO, 2001b).

Devido à flexibilidade de utilização de diferentes vazões de enchimento dos reatores com meio nutriente, é possível controlar a concentração de substrato no fermentador, de modo que, por exemplo, o metabolismo microbiano seja deslocado para uma determinada via metabólica, levando ao acúmulo de um produto específico (CARVALHO; SATO, 2001b).

### **1.3.3. Processo Contínuo**

O processo de fermentação contínuo caracteriza-se por possuir uma alimentação contínua de meio de cultura a uma determinada vazão constante, sendo o volume de reação mantido constante através da retirada contínua de caldo fermentado (FACCIOTTI, 2001).

As principais vantagens do processo contínuo sobre os descontínuos são (EDUARDO, 1991 & FACCIOTTI, 2001):

- menores equipamentos;

- tempo de uso otimizado ou maior capacidade de fermentação com os mesmos equipamentos;
- rendimento médio alto;
- tempo de fermentação e paradas minimizadas;
- obtenção de caldo fermentado uniforme;
- menores gastos com mão de obra;
- maior facilidade no emprego de controles avançados.

Porém, também há desvantagens como (FACCIOTTI, 2001):

- possibilidade presente de infecção;
- possibilidade de ocorrência de mutações genéticas espontâneas;
- possibilidade de seleção de mutantes menos produtivos;
- dificuldades de operação em estado estacionário.

A manutenção de volume constante de líquido no reator é de primordial importância, a fim de que o sistema atinja a condição de estado estacionário ou regime permanente, condição na qual as variáveis de estado (concentração de células, de substrato limitante e de produto) permanecem constantes ao longo do tempo de operação do sistema. Entretanto, a manutenção de volume constante no reator significa teoricamente a necessidade de se contar com vazões idênticas de alimentação e de retirada de meio, o que é praticamente impossível na prática (FACCIOTTI, 2001).

Apesar dos problemas acima mencionados, a utilização do processo contínuo de fermentação encontra grande aplicação prática (FACCIOTTI, 2001).

A utilização de reatores do tipo tubular para fermentação alcoólica é afetada pela mistura causada pelo desprendimento de dióxido de carbono e, então, um fluxo tubular é difícil de ser realizado na prática e, assim, o efeito de mistura abaixa velocidade da reação, devido à inibição provocada pelos produtos finais. Contudo, reatores de mistura completa podem ser arranjados em série e, assim, fermentação mais rápida pode ser obtida (ZARPELON; ANDRIETTA, 1992).

O processo contínuo com reatores ligados em série pode ser descrito de duas formas: quando a velocidade de desenvolvimento do microrganismo é praticamente independente da concentração de substrato, onde não há vantagem trabalhar com mais de um biorreator, ou quando a velocidade de desenvolvimento no primeiro fermentador é maior que no segundo e esta que na terceira e assim por diante, sendo vantagem trabalhar com reatores ligados em série, pois a redução do tempo de permanência do material no sistema acarretará, para uma dada produção, menor capacidade total dos fermentadores. Tal condição de trabalho pode existir no caso particular da fermentação alcoólica contínua com diversos biorreatores ligados em série, uma vez que o teor alcoólico nos últimos biorreatores acarreta uma redução na velocidade de reprodução do microrganismo (BORZANI, 1960), permitindo a obtenção de elevados rendimentos, bem como elevadas produtividades do processo (FACCIOTTI, 2001).

As fermentações de múltiplos estágios têm facilidades operacionais – esgotamento total do mosto, possibilidade de trabalhos com altos teores alcoólicos, não intoxicação da levedura – e também complicações como controles de muitos estágios, que podem ser solucionadas com 3 a 5 estágios (EDUARDO, 1991). Além disso, é mais estável, uma vez que somente nos últimos estágios os efeitos dos produtos de inibição são relevantes. Por esta razão, a produtividade (etanol produzido/h) é muito mais alta (ZARPELON; ANDRIETTA, 1992).

Industrialmente, sistemas com grande número de estágios não são considerados viáveis. Além da produtividade, os aspectos econômico e operacional devem ser levados em conta em um projeto (ANDRIETTA, 1994).

O uso de técnicas de otimização determinou que quatro fermentadores em série são razoavelmente equivalentes a um fermentador tubular, no que concerne a aplicação industrial em si (ZARPELON; ANDRIETTA, 1992). O sistema constituído de 4 reatores de mistura perfeita, ligados em série, possui o menor número de reatores possível e o sistema subsequente, com cinco reatores, não apresenta ganhos apreciáveis na produtividade (ANDRIETTA, 1994).

A operação do sistema contínuo, ainda, pode ser feita com recirculação de células que tem como objetivo a obtenção de alta densidade celular no reator, aumentando-se assim

consideravelmente as velocidades e, portanto, em última análise, a produtividade do processo (FACCIOTTI, 2001).

A utilização de fermentação contínua implica numa redução de 57% no investimento de capital fixo nas destilarias quando comparado ao daquelas que usam batelada. Reduções ainda maiores, da ordem de 68 a 71%, são obtidas para os processos com reciclo de células e operação a vácuo, respectivamente (CYSEWSKI; WILKE, 1978).

#### **1.4. Bioquímica da Fermentação Alcoólica**

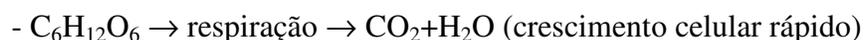
As leveduras são organismos eucarióticos e formam uma das classes mais importantes dos fungos. As do tipo *Saccharomyces* são as mais utilizadas na produção de etanol e apresentam-se normalmente na forma unicelular e com 2 a 8 micrômetros de diâmetro. Estas se reproduzem basicamente por gemação (brotamento), onde a célula mãe, após um período de união entre os citoplasmas, dá origem a uma nova célula (STECKELBERG, 2001).

A fermentação alcoólica é a ação de leveduras sobre açúcares fermentáveis contidos em uma solução/suspensão. É um processo biológico no qual a energia formada por reações de oxidação parcial pode ser utilizada para o crescimento de leveduras e a oxidação parcial anaeróbia da hexose na produção de álcool e CO<sub>2</sub> (LIMA; MARCONDES, 2002).

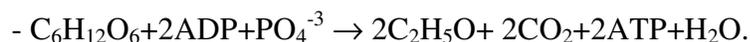
A transformação do açúcar em etanol e CO<sub>2</sub>, envolve 12 reações em seqüência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica, conforme apresentado na Figura 1. Tal aparato enzimático está confinado no citoplasma celular, sendo, portanto, nessa região da célula que a fermentação alcoólica se processa (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

A simplificação se dá em três etapas (LIMA; MARCONDES, 2002):

1- Via aeróbia



2- Via anaeróbia





realiza naturalmente por ação da invertase, enzima produzida pelo agente de fermentação. A sacarose é a representante mais importante dos componentes da cana-de-açúcar e dos melaços (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

As hexoses são reagentes primários no metabolismo da fermentação alcoólica. Estequiometricamente, o rendimento do processo fermentativo é 0,511g/g de hexose, porém ocorrem, juntamente com a fermentação alcoólica, reações secundárias, resultando na redução de rendimento teórico. Quando se trabalha com substratos (mosto) complexos, em processos industriais, notadamente na presença de corpos estranhos ao meio (fibras, gomas, leveduras selvagens, etc) observa-se a geração de novos subprodutos e o rendimento industrial é reduzido para até 90% (LIMA; MARCONDES, 2002 & LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

O objetivo primordial da levedura, ao metabolizar anaerobicamente o açúcar, é gerar uma forma de energia (ATP, adenosina trifosfato) que será empregada na realização dos diversos trabalhos fisiológicos (absorção, excreção e outros) e biossínteses, necessárias à manutenção da vida, crescimento e multiplicação, para perpetuar a espécie. O etanol e o CO<sub>2</sub> resultantes se constituem, tão somente, de produtos de excreção, sem utilidade metabólica para a célula em anaerobiose. Entretanto, o etanol, bem como outros produtos de excreção (como o glicerol e ácidos orgânicos) podem ser oxidados metabolicamente, gerando mais ATP e biomassa, mas apenas em condições de aerobiose (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

### ***1.5. Cinética da Fermentação***

A cinética de fermentação alcoólica é um assunto altamente estudado e pesquisado nos centros de pesquisa especializados, tendo em vista seu potencial industrial e econômico (LIMA; MARCONDES, 2002).

O objetivo básico do estudo da cinética de processos microbianos é quantificar a taxa de crescimento celular, consumo de substrato, formação de produtos e demais parâmetros relacionados (VIEGAS, 2003).

Os modelos cinéticos normalmente usados em fermentações podem ser divididos em:

- Não-estruturados e não segregados, nos quais as células de microrganismos são consideradas como soluto;
- Estruturados e não segregados, onde as células são tratadas como seres individuais de múltiplos componentes, porém com composição média semelhante;
- Não-estruturados e segregados, onde as células são tratadas como seres individuais distintos porém descritos por um único componente; e
- Estruturados e segregados, onde as células de microrganismos são consideradas como indivíduos distintos e formados por múltiplos componentes (BAILEY;OLLIS, 1986).

A complexidade da descrição cinética que é requerida e apropriada depende das situações físicas e da aplicação pretendida. Não é possível ou praticável a formulação de um modelo que inclua todas as características e detalhes celulares. O modelo deve ser formulado a partir de algumas aproximações (STREMEL, 2001).

O tipo de modelo mais encontrado na literatura para descrever a fermentação alcoólica é do tipo não-estruturado e não-segregado. A equação mais simples e popular para descrever o crescimento microbiano é a equação de Monod, que assume a presença de substrato como limitante para o crescimento. A cinética de Monod está apresentada na Equação 1 (HAN;LEVENSPIEL, 1988).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{S + K_s} \quad (1)$$

É sabido que a equação de Monod só é aplicável onde a presença de produtos metabólicos tóxicos não acontece (LUONG, 1985). Porém, constatou-se que além da limitação pelo substrato, há também efeitos inibidores na cinética da fermentação (HAN;LEVENSPIEL, 1988).

Na fermentação alcoólica o rendimento de biomassa com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* diminui, de 0,156 para 0,026, com o aumento da concentração de etanol, de 0 à 107 g/L, indicando uma relação entre o rendimento da biomassa e a inibição pelo produto (THATIPALAMA; ROHANI; HILL, 1992).

O efeito inibidor do etanol deve apresentar um termo de descrição cinética não competitiva à atividade de fermentação das células (AIBA; SHODA; NAGATANI, 1968).

O etanol começa a ter efeito inibitório na taxa de crescimento celular acima de 15 g/L. A concentração máxima de etanol permitida, acima da qual as células não crescem, foi predita em 112 g/L. A capacidade de produção de etanol onde as células são completamente inibidas foi de 115 g/L de etanol (LUONG, 1985).

A cinética da fermentação alcoólica foi estudada por vários autores que formularam modelos que estão apresentados na Tabela 5, levando em conta a limitação pelo substrato e a possível inibição pelo produto, substrato e concentração celular.

Apesar dos vários trabalhos que tratam da cinética de fermentação, pouca influência estes tiveram sobre o arranjo das plantas industriais instaladas no Brasil. No entanto, o projeto rigoroso de uma planta de fermentação tem que passar, obrigatoriamente, por uma modelagem detalhada do processo, utilizando modelos cinéticos precisos, possibilitando a obtenção de condições ótimas de operação. Por outro lado, a manutenção destas condições vai depender da escolha de uma estratégia de controle adequada que só é possível conhecendo-se o comportamento do processo. Isto pode ser adequadamente realizado pelo estudo prévio de modelagem da planta e simulação em computador (ANDRIETTA, 1994).

A utilização de modelos matemáticos na otimização de um processo é de grande importância, pois minimiza o custo e o tempo aplicado de estudo (ANDRIETTA, 1991).

Outro fator a ser avaliado é a limitação relacionada ao crescimento microbiano e ao substrato, além da inibição provocada pela presença de etanol. Ainda pode haver a inibição provocada pelas altas concentrações de substrato, ou células ou mesmo outras substâncias presentes no meio (HAN; LEVENSPIEL, 1987).

A inibição pelo substrato é mais tóxica quando comparada à inibição pelo produto e desativa importantes enzimas além de modificar o caminho metabólico que é vital à sobrevivência da levedura. O efeito inibidor provocado pelo substrato na fermentação alcoólica ocorre quando a concentração supera 150 g/L (THATIPALAMA; ROHANI; HILL, 1992).

Tabela 5: Modelos matemáticos não-estruturados e não-segregados propostos para a fermentação alcoólica, suas condições e autores

Modelo	Condição	Autores
$\mu_i = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{S_i}{\left(S_i + K_s + \frac{S_i^2}{K_i}\right)} \cdot \left(1 - \frac{P_i}{P_{m\acute{a}x}}\right)$	-Substrato limitante -Inibição pelo substrato -Inibição linear pelo produto	GHOSE E TYAGI (1979)
$\mu_i = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \left(1 - \frac{P_i}{P_{m\acute{a}x}}\right)^{Y_N} \cdot \left(\frac{S_i}{K_s + S_i}\right)$	-Substrato limitante -Sem inibição pelo substrato -Inibição de potência pelo produto	LEVENSPIEL (1980)
$\mu_i = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \left(\frac{S_i}{K_s + S_i}\right) \cdot \left(\frac{K_p}{P_i + K_p}\right) \cdot \left(1 - \frac{P_i}{P_{m\acute{a}x}}\right)$	-Substrato limitante -Sem inibição pelo substrato -Inibição parabólica pelo produto	SEVELY ET AL. (1980) citado por DOURADO (1987)
$\mu_i = \mu_{m\acute{a}x} \cdot e^{-K_1 P_i - K_2 S_i} \cdot \left(\frac{S_i}{K_s + S_i}\right)$	-Substrato limitante -Inibição exponencial pelo substrato -Inibição exponencial pelo produto	JIN ET AL. (1981) citado por DOURADO (1987)
$\mu_i = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \left(\frac{S_i}{K_s + S_i}\right) \cdot \left(1 - \frac{P_i}{P_{m\acute{a}x}}\right)^{Y_N} \cdot \left(1 - \frac{X_i}{X_{m\acute{a}x}}\right)^{Y_M}$	-Substrato limitante -Sem inibição pelo substrato -Inibição de potência pelo produto -Inibição por altas concentrações de biomassa	LEE; PAGAN; ROGERS (1983)
$\mu_i = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{S_i}{\left(S_i + K_s + \frac{S_i^2}{K_i}\right)} \cdot \left(1 - \frac{P_i}{P_{m\acute{a}x}}\right)^{Y_N}$	-Substrato limitante -Inibição pelo substrato -Inibição de potência pelo produto	TOSETTO (2002)

A fermentação alcoólica produz etanol mesmo após a parada do crescimento das leveduras a níveis superiores a  $10^8$  células/mL. O fato é que o etanol, a concentrações

relativamente baixas (20%), é inibidor da atividade metabólica da levedura (AIBA; SHODA; NAGATANI, 1968).

A fermentação alcoólica, além de efeitos inibidores, é também afetada pela temperatura do biorreator, onde o rendimento alcoólico é maior em temperaturas mais baixas, 15°C e 20°C, porém apresentam uma demora para obtenção da população máxima. Quando a temperatura no biorreator é 25°C e 30°C a taxa inicial de fermentação é maior e a temperaturas superiores a 35°C decresce a viabilidade celular (TORIJA et al., 2003).

O modelo não-estruturado e não-segregado não é indicado para descrever o comportamento dinâmico do processo, devido a fase lag resultante de uma mudança do meio (DUNN; MOR, 1975), tornando-se mais vantajosa a utilização de um modelo mais complexo para descrever o sistema biológico transiente. O modelo estruturado pode ser utilizado diretamente na representação da cinética das rotas bioquímicas da célula. Similarmente, características do ciclo celular podem ser incorporadas e usadas para validar a faixa do modelo cinético para uma população celular pelo uso de uma aproximação segregada. Todavia uma função de atraso para a velocidade de crescimento específico do microrganismo pode adequar este modelo não-estruturado e não-segregado para o estudo dinâmico (O'NEIL; LYBERATOS, 1990). A equação de atraso linear para a velocidade específica pode ser baseada na concentração de ART em cada reator devido a maior sensibilidade desta variável em alterações nas variáveis de entrada do processo, como pode ser visto na Equação 2 (ANDRIETTA, 1994):

$$\mu_c = \mu \cdot \left( \frac{ART_{antes}}{ART_{depois}} \right) \quad (2)$$

Esta equação tem por objetivo considerar o tempo que o microrganismo leva para se adaptar às novas condições do meio, ou seja, acredita-se que quando as condições do meio se alteram bruscamente, a resposta do microrganismo a estas não é imediata. Entretanto, simulações realizadas utilizando os modelos com e sem correção, não mostram diferenças significativas para alguns processos. Mas, mesmo não encontrando diferenças significativas, a correção do modelo deve ser mantida, pois pode ser uma ferramenta importante para ajustes posteriores do modelo (ANDRIETTA, 1994).

### 1.5.1. Constantes Cinéticas

A multiplicidade de modelos cinéticos que descrevem o crescimento microbiano é devido ao fato destes serem construídos para uma levedura específica, em condições experimentais pré-definidas (DOURADO et al., 1987).

Alguns modelos cinéticos com aproximação convencional baseada na cinética de Michaelis-Menten, apresentados na Tabela 5, possuem constantes cinéticas com valores específicos apresentados pelos seus autores, de acordo com os experimentos feitos por eles, apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6: Autores e parâmetros cinéticos de modelos baseados na cinética convencional de Michaelis-Menten

Autores	$K_s$	$\mu_{max}$	$P_{max}$	$X_{max}$	$Y_N$	$Y_M$	$K_i$	$K_p$	$K_1$	$K_2$
GHOSE E TYAGI (1979)	0,48	0,40	87	-	1	-	203,49	-	-	-
LEVENSPIEL (1980)	0,222	0,42	87,5	-	0,41	-	-	-	-	-
SEVELY ET AL. (1980) citado por DOURADO (1987)	5	0,3	85	-	1	-	-	4,5	-	-
JIN ET AL. (1981) citado por DOURADO (1987)	0,22	0,453	-	-	-	-	-	-	0,06035	0,0055
LEE; PAGAN; ROGERS (1983)	1,6	0,24	90	100	1	1	-	-	-	-
TOSETTO (2002)	21	0,5	88	-	0,7	-	15,5	-	-	-

### 1.6. Simulação

Modelagem matemática é a área do conhecimento que estuda maneiras de desenvolver e implementar modelos matemáticos de sistemas reais (AGUIRRE, 2004).

A modelagem matemática de processos fermentativos pode ser definida como a tentativa de representar, por equações matemáticas, os balanços de massa para cada componente nos biorreatores, associados às complexas transformações bioquímicas que ocorrem no processo e às velocidades com que essas transformações se processam (BONOMI; SCHMIDELL, 2001).

Uma vez obtido um modelo matemático, é necessário verificar se o comportamento de tal modelo equivale ao do sistema real e quais são os limites de validade. A fim de avaliar o desempenho de um modelo, é necessário simulá-lo, ou seja, é necessário resolver as equações que compõem o modelo. Portanto, a forma de simular vai depender da representação utilizada (AGUIRRE, 2004).

A simulação de modelos contínuos normalmente envolve a resolução de equações diferenciais do tipo  $\dot{x} = f(x, t)$ . Na maioria dos casos, obter uma solução analiticamente é impossível e, portanto, resolve-se a equação diferencial, de forma aproximada, por métodos numéricos (AGUIRRE, 2004).

Os métodos de Runge-Kutta são muito utilizados para a integração de sistemas de equações diferenciais ordinárias devido sua simplicidade, alta precisão e versatilidade de aplicações (CUNHA, 2003).

O Runge-Kutta de quarta ordem mais utilizado tem a forma das Equações de 3 a 7 (CUNHA, 2003):

$$y_{j+1} = y_j + \frac{h}{6}(K_1 + 2K_2 + 2K_3 + K_4) \quad (3)$$

$$K_1 = f(x_j, y_j) \quad (4)$$

$$K_2 = f\left(x_j + \frac{h}{2}, y_j + \frac{h}{2}K_1\right) \quad (5)$$

$$K_3 = f\left(x_j + \frac{h}{2}, y_j + \frac{h}{2}K_2\right) \quad (6)$$

$$K_4 = f(x_j + h, y_j + hK_3) \quad (7)$$

O erro de truncamento deste método é  $\epsilon_j = \frac{h^5}{5!} \cdot y^{(v)}(\xi)$ ,  $x_{j-1} < \xi < x_j$ .

Em problemas de validação, a questão chave é tentar determinar se um dado modelo é válido ou não e se ele incorpora as características requeridas. Comparar a simulação do modelo obtido com dados medidos é provavelmente a forma mais usual de se validar um modelo. Neste caso, deseja-se saber se o modelo reproduz ao longo do tempo os dados observados. Sem dúvida, esse procedimento é importante e, em muitas aplicações,

não é trivial obter um modelo cuja simulação se aproxime das observações. Por ser relativamente simples, tal procedimento é muito comum (AGUIRRE, 2004).

### ***1.7. Dinâmica da População de Cepas em Processos Industriais***

Os microrganismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa são as leveduras, especialmente a *Saccharomyces cerevisiae*, da qual foram selecionadas várias linhagens, tidas por muito tempo como espécies: *Saccharomyces ellipsoideus*, *S.carlsbergensis* e *S.uvarum*. O desempenho do processo fermentativo é enormemente afetado pelo tipo de levedura que o executa (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

As fermentações se iniciam com uma determinada levedura, com culturas puras fornecidas por instituições especializadas. As culturas puras são apenas isoladas ou obtidas através de melhoramento genético. Com o tempo, as linhagens que dão início ao processo, que têm duração efêmera, são substituídas por leveduras comuns à região das destilarias, comumente denominadas de leveduras selvagens (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

A identificação da levedura é importante ao processo fermentativo devido a uma modificação da população nos biorreatores. Sob condições inadequadas, algumas leveduras com baixa produtividade em etanol podem dominar o processo de fermentação, causando sérios prejuízos à indústria (ANDRIETTA et al., 1997).

A realização de um controle da dinâmica de populações, que associa técnicas de identificação com a avaliação do desempenho fermentativo de cada uma das cepas de levedura dominantes, pode fornecer informações valiosas para o aumento da produtividade dos processos de fermentação alcoólica. As informações obtidas podem ser utilizadas na seleção de leveduras nativas com alto potencial fermentativo e na adequação dos processos às suas necessidades através da elaboração e melhoramento de projetos e também da correção de condutas operacionais inadequadas (STROPPIA, 2002).

#### **1.7.1. Método de Identificação de Leveduras**

Sistemas clássicos de identificação de leveduras baseiam-se em características morfológicas e fisiológicas e são incapazes de distinguir facilmente algumas espécies e, sobretudo, cepas de uma mesma espécie (STROPPIA, 2002).

Meios seletivos têm sido desenvolvidos com o objetivo de selecionar e diferenciar espécies de leveduras em processos fermentativos. O meio WLN ágar contém um indicador de pH, o verde bromocresol, que colore diferencialmente as colônias como resultado dos graus variáveis de afinidade entre os microrganismos e o corante (LEWIS; YOUNG, 1998). Entre os métodos utilizando meios de cultivos diferenciais para diferenciar cepas de leveduras pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, o meio WLN é o mais utilizado por ser um método simples e eficiente para reconhecer similaridades ou diferenças entre os isolados de levedura, apesar de não fornecer a sua identidade (CAMPBELL (1999), citado por (STROPPA, 2002)).

O meio WLN ágar possibilita a discriminação e/ou recuperação de linhagens do gênero *Saccharomyces* (CASTRO, 1995).

Métodos moleculares têm sido desenvolvidos recentemente com o propósito de apresentar um único padrão de DNA fingerprinting, sendo eles: PCR – Reação em cadeia da polimerase, PFGE – Eletroforese em gel de campo pulsado, RAPD – DNA polimórfico amplificado ao acaso e RFLP – Polimorfismo de tamanho de fragmento restrito. Entre estas técnicas, as mais utilizadas para identificação de cepas de levedura estão: PCR e RFLP de DNA mitocondrial e nuclear (Freizer & Dubourdieu, 1992; Ness et al., 1993).

Estudos comparativos de alguns métodos de caracterização de cepas de levedura demonstram que a análise eletroforética de cromossomos é capaz de diferenciar cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (DEGRÉ et al. (1989), CASEY; PRINGLE; ERDMANN (1990), QUEROL; BARRIO; RAMÓN (1992) e MANI; DLAUCHI; DÉAK (1998)).

Em uma eletroforese em gel de agarose convencional, o DNA move-se através de um campo elétrico uniforme e moléculas de DNA maiores que 50KDalton, como cromossomos, migram independente do seu tamanho e, portanto, não são separadas. Com a aplicação de duas orientações de campos elétricos alternados (pulsos), os cromossomos menores respondem mais rapidamente às mudanças de carga elétrica e movem-se mais rapidamente através do gel produzindo a separação dos cromossomos por tamanho. Depois de corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV, o gel exhibe bandas que correspondem aos cromossomos inteiros (MEADEN, 1990).

## 2- Material e Métodos

Este trabalho passou por fases distintas, na primeira foram realizadas as coletas em usinas de produção de álcool em operação, por isto há uma descrição das usinas e dos ensaios industriais. A partir das amostras coletadas foram feitas as análises laboratoriais, que juntamente com os dados de operação das usinas, foram utilizados para determinação dos valores das constantes cinéticas para os modelos do processo de fermentação alcoólica, citados na Tabela 5. Obtidos estes valores, passou-se para a fase de implementação computacional, para simulações de dimensionamento e de alterações na etapa de fermentação do processo, que tem o seu fluxograma apresentado na Figura 2.

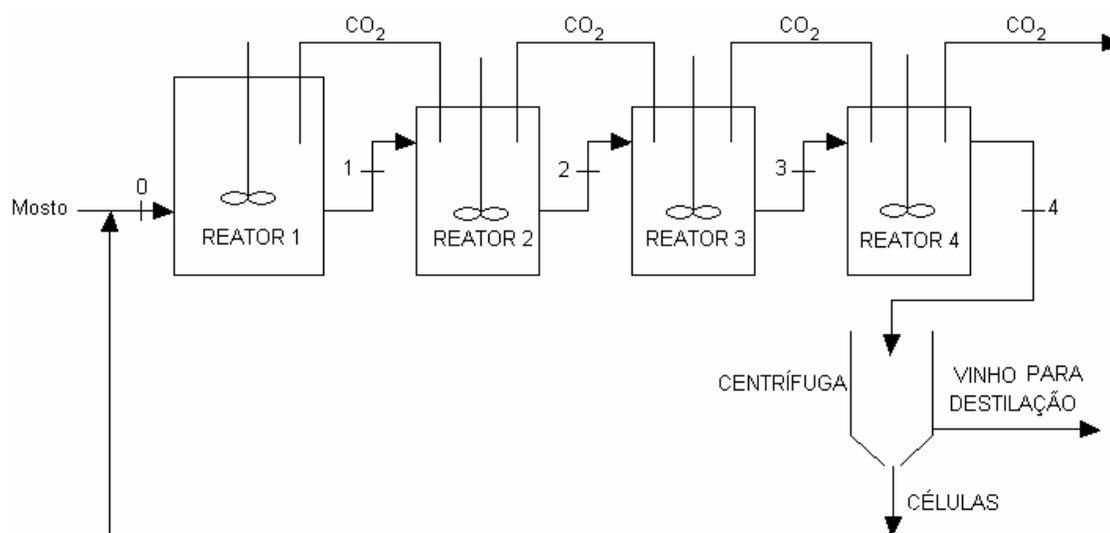


Figura 2: Esquema da etapa de fermentação de uma usina de álcool.

### 2.1. Usina de Açúcar e Álcool

As usinas Clealco, localizada em Clementina – SP, e a Alvorada, em Araporã – MG, foram implantadas segundo esquema proposto por ANDRIETTA (1994), diferindo somente no número de reatores e no tamanho dos mesmos.

A usina Clealco possui quatro biorreatores em série, que podem ser vistos na Figura 3, sendo o volume deles  $601,8 \text{ m}^3$ ,  $413,8 \text{ m}^3$ ,  $331,8 \text{ m}^3$  e  $262,1 \text{ m}^3$ , consecutivamente.



Figura 3: Biorreatores da usina Clealco.

A usina Alvorada, Figura 4, possui cinco biorreatores, sendo o primeiro de  $353,95\text{m}^3$  e os quatro seguintes de  $304,18\text{m}^3$ . Na foto dos reatores, Figura 5, pode-se ver a diferença de tamanho entre o primeiro biorreator e os seguintes. Note que o gás produzido na fermentação segue pela tubulação superior de um biorreator para o seguinte. O quinto biorreator apesar do mesmo tamanho dos três anteriores, possui a particularidade de na saída do gás produzido durante a fermentação possuir o tratamento para descarte na atmosfera.



Figura 4: Foto da Usina Alvorada.



Figura 5: Biorreatores da usina Alvorada.

O volume útil dos biorreatores depende da produção, não sendo utilizada sempre 100% de sua capacidade.

## **2.2. *Ensaio Industriais***

As coletas foram feitas nas unidades fermentativas da Usina Alvorada Açúcar e Álcool, localizada em Araporã, MG, no período de julho a outubro do ano de 2002 e Usina Clealco – Usina Clementina de Açúcar e Álcool, localizada em Clementina, SP, nos meses de julho e agosto de 2002. Cada ensaio teve a duração de dois dias e consistiu em estabilizar o processo nas condições desejadas, utilizando a malha de controle já implantada, e coletar amostras dos reatores, em intervalos de uma hora. O tempo de ensaio foi de dezoito horas, sendo que as dez primeiras foram para a estabilização do sistema, nas três horas seguintes foram retiradas amostras no regime permanente, quando então era aumentada a vazão de mosto em 10%, na entrada do primeiro reator e amostras continuaram sendo coletadas durante as cinco horas finais do ensaio. No ensaio de julho da usina Alvorada houve coleta somente em regime permanente.

Nas oito horas de coleta foram retiradas amostras de mosto, fermento e meio de fermentação em cada um dos biorreatores e imediatamente congeladas em gelo seco e transportadas para o CPQBA, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e

Agrícolas, onde seriam feitas as análises. A Figura 6 mostra o ponto de coleta de mosto na Usina Alvorada.



Figura 6: Foto do ponto de coleta do mosto na Usina Alvorada.

A amostra de fermento foi retirada diretamente do tanque de inóculo, Figura 7, e os conteúdos dos biorreatores retirados por uma abertura de válvula que está representada pela Figura 8.



Figura 7: Tanque de inóculo (fermento) para o processo de produção de álcool.



Figura 8: Válvula lateral para retirada de amostra do biorreator.

### **2.3. Análises Laboratoriais**

As análises laboratoriais tiveram duas aplicações, uma primeira no processo industrial, feita nas amostras coletadas nas usinas, e outra para determinação da capacidade fermentativa das leveduras.

No estudo do processo industrial a análise de massa seca foi feita para cálculo das concentrações de massa celular em cada um dos biorreatores e no reciclo do processo. As concentrações de açúcares redutores totais e etanol tiveram como objetivo avaliar a quantidade de substrato e produto nos biorreatores, no mosto e no reciclo para a produção de álcool. O plaqueamento de amostras do reciclo, também denominado fermento, possibilitou o isolamento de cepas dominantes do processo industrial.

As cepas dominantes foram estudadas quanto à capacidade fermentativa, onde foram feitas análises de concentrações de açúcares redutores totais e etanol antes e depois do processo fermentativo e de massa seca. As cepas ainda passaram por um método de cariotipagem para identificação das leveduras dominantes do processo fermentativo industrial em operação.

#### **2.3.1. Massa Seca**

As amostras foram descongeladas e 25 mL centrifugados durante 5 minutos à 3000 rpm. O sobrenadante foi reservado para a determinação de açúcares redutores totais e etanol enquanto a massa depositada no tubo da centrífuga submetida a duas lavagens com água destilada e nova centrifugação, só então transferida para placas de petri e colocadas em estufa a 45°C até adquirir peso constante (ALTERTHUM, 2001).

#### **2.3.2. Açúcares Redutores Totais**

O mosto de alimentação do biorreator para produção do álcool possui sacarose, glicose e frutose. A sacarose é constituída por uma molécula de glicose e outra de frutose, devendo passar por hidrólise ácida sendo convertida em açúcares redutores. A metodologia utilizada para determinação dos açúcares redutores totais (ART) foi o método químico DNS (MILLER, 1959), modificado. Devido a toxicidade do fenol utilizado, foi feita uma modificação na metodologia retirando esta substância e o sulfito de sódio e adicionando tartarato de sódio e potássio tetrahidratado para a composição da solução de cor a ser

utilizada, sendo assim, para produção de 100 mL do reagente de cor foi utilizado 1 g de ácido dinitrossalicílico, 40 mL de hidróxido de sódio 1,0 N, 30 g de tartarato de sódio e potássio tetrahidratado.

O método DNS é 'indireto', sendo feita a leitura da absorbância no espectrofotômetro com comprimento de onda de 546 nm. Para determinação dos açúcares redutores totais é necessário a construção de uma curva padrão para correlacionar a absorbância da amostra com o sua concentração de açúcar. Esta curva é feita para concentrações de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 g/L de glicose. Para a utilização desta curva padrão as amostras coletadas nas usinas foram diluídas: do mosto de 1:100, do primeiro biorreator de 1:25 e dos outros reatores 1:10.

Esta mesma análise foi utilizada em amostras das fermentações em batelada utilizadas para determinação da capacidade fermentativa das cepas dominantes dos processos nas usinas, com diluição de 1:100 para o mosto e 1:10 para o meio após a fermentação.

### **2.3.3. Etanol**

A determinação da concentração de etanol nas amostras foi feita pelo método químico do Dicromato de Potássio (SALIK; POVH, 1993).

O preparo das amostras para essa análise foi feito com alíquotas de 25 mL que foram destiladas, por arraste de vapor, sendo coletados 50 mL na saída do destilador, para garantir que todo o etanol fosse retirado nesta etapa. O método do dicromato correlaciona a absorbância da amostra a um comprimento de onda de 600nm no espectrofotômetro à concentração de etanol presente. A curva padrão desta análise é feita com soluções de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0° GL.

## **2.4. *Desenvolvimento do Programa***

O ambiente desenvolvido em Delphi se baseia em uma extensão orientada a objetos da linguagem de programação Pascal, também conhecida como Object Pascal. As linguagens de programação mais modernas fornecem suporte para a programação orientada a objetos que se baseiam em três conceitos fundamentais: o encapsulamento, em geral implementado com as classes, a herança, e o polimorfismo ou ligação tardia (CANTÙ, 2003). O programa foi desenvolvido em linguagem Delphi na versão 7.0.

A vantagem do desenvolvimento deste programa nesta linguagem é a interface bastante simples e a facilidade de utilização, não precisando ser especialista no processo, pois suas características estão embutidas na programação.

O programa pode funcionar para qualquer processo microbiológico devendo passar pelas etapas de escolha do modelo que melhor descreve a cinética naquelas condições específicas e de simulação, que neste trabalho foi feita para produção contínua de quatro reatores de mistura em série.

Há uma grande variedade de modelos cinéticos. Apesar de somente seis terem sido implementados neste trabalho, a escolha de outro modelo pode ser feita e implementada da mesma forma, assim como o design do processo.

### 2.4.1. Ajuste dos Modelos Cinéticos

Os modelos cinéticos citados na Tabela 5 foram implementados no programa e o fluxograma do ajuste das constantes cinéticas está apresentado na Figura 9. Os resultados das análises laboratoriais das amostras e as condições de operação da usina durante os ensaios industriais foram utilizados como dados de entrada. Para o ajuste de parâmetros deve-se fazer a escolha do modelo a ser testado e determinar os intervalos a serem estudados para cada uma das constantes cinéticas. Os intervalos foram definidos, inicialmente, para cada uma das constantes do modelo de acordo com valores citados em literatura – Tosetto (2002), Dourado (1987) – e foram sendo alterados com o intuito de se obter os menores erros de ajuste sem causar inconsistência física.

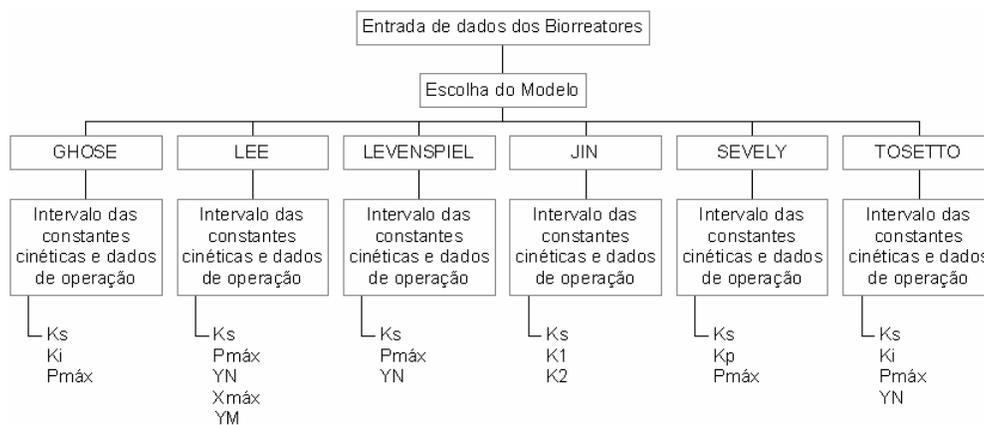


Figura 9: Fluxograma da implementação do programa para o ajuste das constantes cinéticas dos modelos não-estruturados e não segregados.

A implementação do programa para o modelo Tosetto (2002) está apresentada e comentada no Apêndice 1, sendo semelhante para os outros modelos.

### 2.4.2. Simulação

A simulação do processo de produção de álcool em biorreatores de mistura em série foi desenvolvida segundo Andrietta(1994), com quatro reatores em série e reciclo celular. O programa foi implementado segundo o fluxograma apresentado na Figura 10.

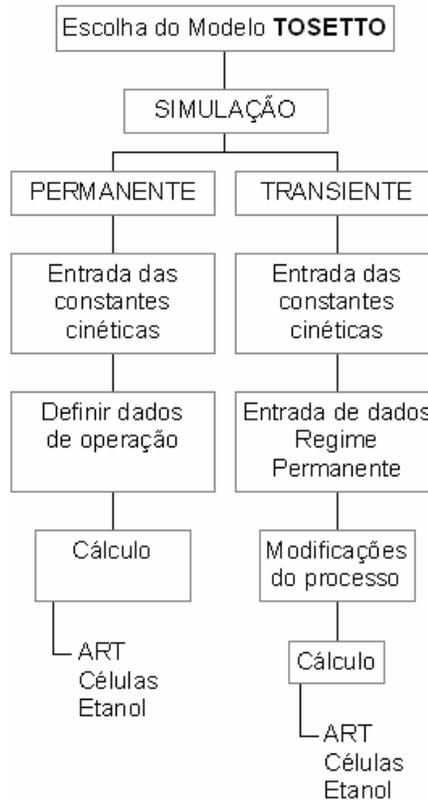


Figura 10: Fluxograma da implementação do programa para a simulação do modelo Tosetto(2002) para 4 reatores de mistura em série com reciclo de células.

#### - Estado Estacionário (Permanente)

A solução da modelagem matemática em estado estacionário possui solução algébrica que foi implementada diretamente no ambiente Delphi 7.0.

Em estado estacionário a vazão de entrada e saída no sistema é constante, logo os volumes dos reatores não são alterados. O balanço de massa para cada biorreator é

semelhante e resulta em equações algébricas que ao serem solucionadas geram valores para cada uma das variáveis existentes.

Os biorreatores estão em série, sendo assim, a concentração que entra em um reator é a que saiu do anterior, como pode ser visto na Figura 2. No primeiro reator deve-se fazer os cálculos lembrando que a vazão do processo é a soma da vazão de mosto e da vazão de reciclo. A composição do mosto não apresenta etanol (produto), e no reciclo não há ART (substrato).

Balanço de massa dos componentes de interesse para simulação do processo em regime permanente, sendo a Equação (8) o balanço global de massa e as Equações (9), (10) e (11) os balanços de substrato, produto e células, respectivamente.

$$F_{i-1} - F_i = 0 \quad (8)$$

$$S_{i-1}F_{i-1} - S_iF_i - \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot X_i\mu_iV_i = 0 \quad (9)$$

$$P_{i-1}F_{i-1} - P_iF_i + \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \cdot X_i\mu_iV_i = 0 \quad (10)$$

$$X_{i-1}F_{i-1} - X_iF_i + X_i\mu_iV_i = 0 \quad (11)$$

No programa o passo de avaliação de resultado foi de  $10^{-3}$  horas e o método utilizado foi a comparação entre o tempo de residência hidráulico ( $T$ ), apresentado na Equação (12), e tempo de residência ( $\tau$ ) do reator, Equação (13), onde  $i$  é o tempo de integração.

$$T_i = \frac{X_i - X_{i-1}}{X_i \cdot \mu_i} \quad (12)$$

$$\tau_i = \frac{V_i}{F} \quad (13)$$

O procedimento mais detalhado de cálculos desta etapa do programa está descrita no Apêndice 2.

A tela de entrada dos dados para o programa está apresentada na Figura 11.

Figura 11: Tela de entrada dos dados para simulação em regime permanente.

## - Estado Transiente

O desenvolvimento do programa em estado transiente foi feito, assim como no estado estacionário, para quatro reatores de mistura em série, com reciclo celular.

A modelagem do estado dinâmico trata-se de uma solução numérica de equações diferenciais. O método iterativo de cálculo utilizado foi o Runge-Kutta de quarta ordem. O modelo cinético implementado foi o Tosetto (2002).

O balanço de massa dos componentes de interesse para simulação do processo em regime transiente, apresentadas na Equação (14) o balanço global de massa e nas equações (15), (16) e (17) os balanços de substrato, produto e células, respectivamente.

$$\frac{dV}{dt} = F_{i-1} - F_i \quad (14)$$

$$\frac{dSV}{dt} = S_{i-1}F_{i-1} - S_iF_i - \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot X_i \mu_i V_i \quad (15)$$

$$\frac{dPV}{dt} = P_{i-1}F_{i-1} - P_iF_i + \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \cdot X_i\mu_iV_i \quad (16)$$

$$\frac{dXV}{dt} = X_{i-1}F_{i-1} - X_iF_i + X_i\mu_iV_i \quad (17)$$

A consideração de que o sistema tem um controle de vazão eficiente, o valor da vazão de entrada no sistema é também o de saída, logo a diferencial da Equação (14) é zero, significando que o volume é constante. E substituindo o  $\mu$  pelo modelo Tosetto (2002) os balanços de massa ficam da forma apresentada nas equações de (18) à (21).

$$\frac{dV}{dt} = 0 \quad (18)$$

$$\frac{dSV}{dt} = F_0(S_{j-1} - S_j) - \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot X \cdot \mu_{máx} \cdot \frac{S_j}{\left(S_j + K_s + \frac{S_j^2}{K_i}\right)} \cdot \left(1 - \frac{P_j}{P_{máx}}\right)^{Y_N} V \quad (19)$$

$$\frac{dPV}{\partial t} = F_0(P_{j-1} - P_j) + \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \cdot X \cdot \mu_{máx} \cdot \frac{S_j}{\left(S_j + K_s + \frac{S_j^2}{K_i}\right)} \cdot \left(1 - \frac{P_j}{P_{máx}}\right)^{Y_N} \cdot V \quad (20)$$

$$\frac{dXV}{dt} = F_0(X_{j-1} - X_j) + X\mu_{máx} \cdot \frac{S_j}{\left(S_j + K_s + \frac{S_j^2}{K_i}\right)} \cdot \left(1 - \frac{P_j}{P_{máx}}\right)^{Y_N} V \quad (21)$$

O método de resolução das equações diferenciais foi o Runge-Kutta de quarta ordem, descrito no item 1.6 deste trabalho.

A avaliação do resultado foi a comparação entre o tempo de residência hidráulico ( $T$ ), apresentado na Equação (12), e tempo de residência ( $\tau$ ) do reator, Equação (13), assim como no regime permanente.

O procedimento mais detalhado de cálculos desta etapa do programa está descrita no Apêndice 3.

## 2.5. Utilização do Programa

O primeiro passo para utilização do programa é a digitação dos dados experimentais obtidos pelas análises das amostras coletadas nas usinas para cada um dos biorreatores e para a digitação destes dados é necessário clicar no ícone escrito dados experimentais, que pode ser visto na Figura 12, que automaticamente abre a tela apresentada na Figura 13. Os dados necessários são: qual o biorreator que está sendo descrito, as concentrações de ART, etanol e celular em g/L, o volume do biorreator em m<sup>3</sup> e a temperatura de operação em °C.



Figura 12: Tela de inicialização do programa.

Figura 13: Tela de entrada dos dados experimentais para cada um dos biorreatores.

O programa é constituído de duas fases distintas. A primeira de ajuste dos parâmetros cinéticos, que será descrita no item 2.5.1, que é acionada com um clique duplo no ícone de ajuste de parâmetros da tela, apresentada na Figura 12. A outra é a de simulação do processo, que será exposta no item 2.5.2, quando os parâmetros cinéticos já devem ser conhecidos. Esta etapa é acionada com um clique no botão simulação da tela de entrada do programa.

### 2.5.1. Ajuste dos Modelos Cinéticos

O ajuste de parâmetros tem o intuito de avaliar, dentre os modelos cinéticos implementados no programa, aquele que se adequa aos dados coletados nas usinas em operação. O programa possui uma tela onde é feita a escolha do modelo a ser testado, que está apresentada na Figura 14, a partir daí uma outra tela, Figura 15, é aberta quando os intervalos das constantes cinéticas devem ser definidos para o cálculo do ajuste. Para evitar trabalho desnecessário, somente as constantes cinéticas existentes no modelo escolhido aparecem ativas para manipulação. Na tela apresentada na Figura 15 devem ser colocadas as condições de operação da usina no momento do ensaio, que foi estabilizado pela malha de controle além da velocidade específica de crescimento celular, fixada em  $0,5h^{-1}$ , o rendimento em etanol,  $Y_{p/s}$ , calculado a partir dos dados das análises laboratoriais e o rendimento em células,  $Y_{x/s}$ , fixado em 0,026 e as concentrações de etanol e células no reciclo e de ART no mosto, obtidas das análises laboratoriais.



Figura 14: Tela de escolha do modelo para estudo do ajuste cinético.

7 Modelo para processo contínuo

Parâmetros a serem ajustados

	Valor Inicial		Valor Final		Incremento
Constante de afinidade (Ks)	DB_Ksi (g/L)		DB_Ksf (g/L)		DB_Ksin
Conc. Máxima Produto (Pmáx)	DB_Pmaxi (g/L)		DB_Pmaxf (g/L)		DB_Pmaxi
Expoente termo inibição (YN)	DB_YNi		DB_YNf		DB_YNin
Constante Inibição Substrato (Ki)	DB_Kii (g/L)		DB_Kif (g/L)		DB_Kiin
Kp	DB_Kpi (g/L)		DB_KPf (g/L)		DB_Kpin
K1	DB_K1i (L/g)		DB_K1f (L/g)		DB_K1in
K2	DB_K2i (L/g)		DB_K2f (L/g)		DB_K2in
Xmáx	DB_Xmaxi (g/L)		DB_Xmaxf (g/L)		DB_Xmaxi
YM	DB_YMi		DB_YMf		DB_YMin

---

Dados de operação

Número de reatores	DB_NR <sub>ea</sub>			
Vazão Mosto	DB_Vol <sub>Mo</sub> (m <sup>3</sup> /h)		Vazão Reciclo	DB_Vol <sub>Re</sub> (m <sup>3</sup> /h)
Conc Etanol Reciclo	DB_Conc (g/L)		Conc Cél Reciclo	DB_Conc (g/L)
Velc. Esp. Cresc. Max.	DB_Vel <sub>Ma</sub> (1/h)		ART Mosto	DB_ART (g/L)
Y <sub>xs</sub>	DB_Y <sub>xs</sub>		Y <sub>ps</sub>	DB_Y <sub>ps</sub>

Figura 15: Tela de entrada dos intervalos das constantes cinéticas dos modelos e dos dados de operação da usina.

Os cálculos são feitos de acordo com os intervalos das constantes cinéticas e uma nova tela é gerada apresentado os valores estimados para cada uma das constantes e o desvio de ajuste do modelo, como pode ser visto na Figura 16. Esta tela pode ser diretamente impressa ou pode-se pedir para que um relatório de terminação .txt seja gerado para que estes dados possam ser manipulados em outros programas gráficos.

O desvio ocasionado pelo ajuste dos parâmetros pode calculado como a minimização da somatória do quadrado da diferença entre os valores calculados ( $\tilde{y}_i$ ) e experimentais ( $y_i$ ), normalizados pela média entre o valor calculado e o experimental em cada ponto (TAVARES, 2005). A fórmula do desvio que descreve este procedimento está apresentada na Equação (22). O desvio foi calculado a partir das concentrações de substrato, por se tratar do componente mais variável no processo fermentativo.

$$desvio = \sum_i (\tilde{y}_i - y_i)^2 \quad (22)$$

Os intervalos das constantes cinéticas devem ser modificados até que o menor desvio associado ao modelo seja obtido, sem causar inconsistência física.

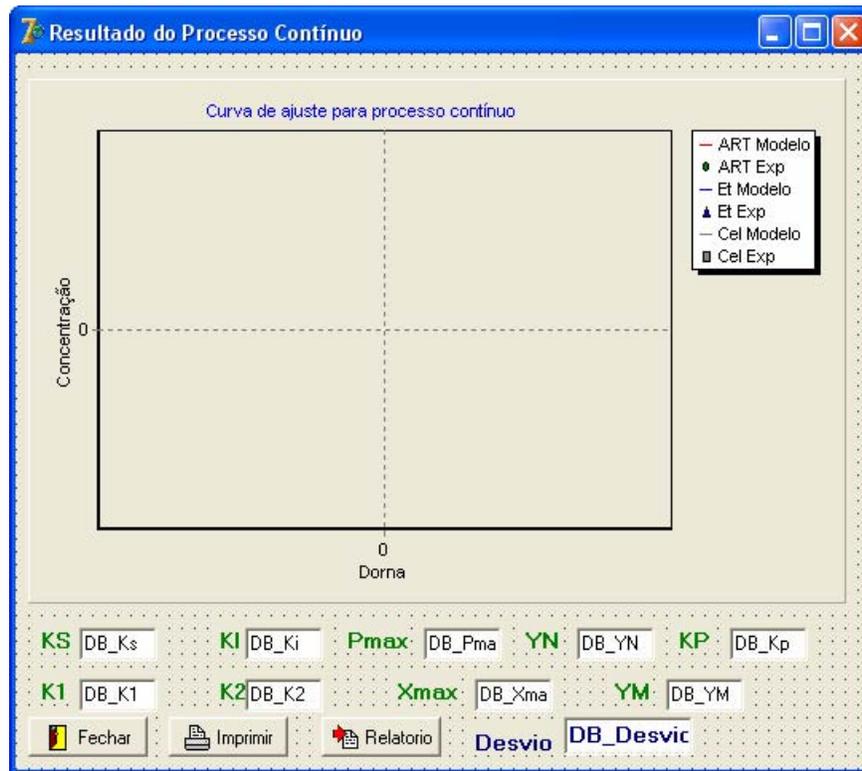


Figura 16: Tela de valores das constantes cinéticas, desvio de ajuste associado ao modelo e representação gráfica deste resultado.

### 2.5.2. Simulação

As constantes cinéticas obtidas no ajuste dos modelos passam a ser dados de entrada para a simulação juntamente com dados de operação que se deseja no processo. A simulação tem como objetivo calcular as concentrações etanol, açúcares redutores e células em cada um dos biorreatores a partir dos dados de operação desejados.

#### - Estado Estacionário

Os dados operacionais para simulação do processo, em regime permanente, devem ser colocados no programa pela tela apresentada na Figura 17.

**Simulação de processo contínuos em estado estacionário**

### Entrada de dados para simulação

**Parâmetros do modelo**

**Ks**  g/L    **Pmax**  g/L    **Mimax**  1/h  
**Ki**  g/L    **YN**

**Dados operacionais**

Vazão de mosto  m<sup>3</sup>/h    Vol Reator 1  m<sup>3</sup>  
Conc ART Mosto  g/L    Vol Reator 2  m<sup>3</sup>  
Vazão de reciclo  m<sup>3</sup>/h    Vol Reator 3  m<sup>3</sup>  
Conc Alcool Reciclo  g/L    Vol Reator 4  m<sup>3</sup>  
Conc Cel Reciclo  g/L  
Y<sub>x/s</sub>     Rend Destil.  %  
Y<sub>p/s</sub>

Figura 17: Tela de entrada das constantes cinéticas e dados de produção para simulação do processo em regime permanente.

Ao clicar no ícone Calcular que pode ser visto na Figura 17, o programa calcula as concentrações obtidas em cada um dos reatores e apresenta uma tela de saída de resultados que pode ser visualizada na Figura 18. Estes dados podem também ser armazenados em forma .txt ao se optar pela obtenção do relatório.

**Resultado da simulação de processo contínuo em est...**

### Resultado da simulação

*Concentrações (g/L)*

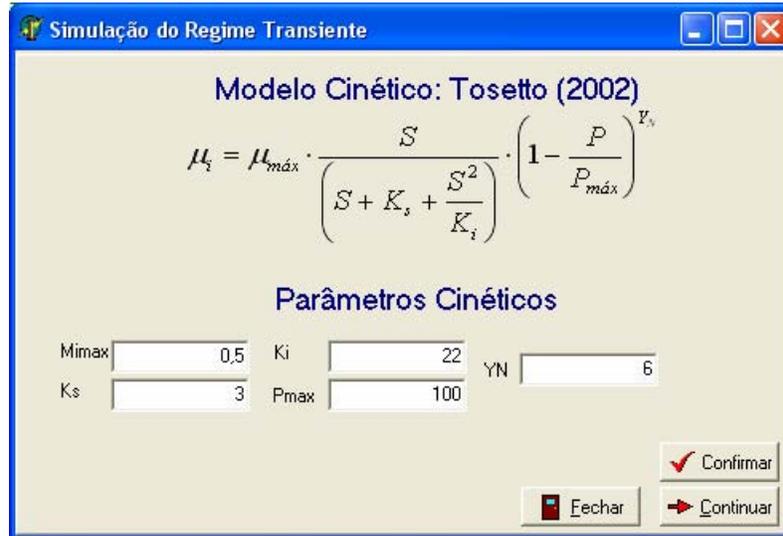
	ART	Etanol	Celulas
0	<input type="text" value="103,81"/>	<input type="text" value="6,5867"/>	<input type="text" value="50,223"/>
1	<input type="text" value="43,713"/>	<input type="text" value="32,19"/>	<input type="text" value="51,786"/>
2	<input type="text" value="15,8"/>	<input type="text" value="44,08"/>	<input type="text" value="52,512"/>
3	<input type="text" value="2,9"/>	<input type="text" value="49,576"/>	<input type="text" value="52,847"/>
4	<input type="text" value="0,3"/>	<input type="text" value="50,683"/>	<input type="text" value="52,915"/>
<b>Produção</b>	<input type="text" value="1,4293E6"/>	<b>GL Vinho</b>	<input type="text" value="6,4156"/>
	<b>R</b>	<input type="text" value="0,43333"/>	

Figura 18: Tela de saída das concentrações obtidas na simulação do estado estacionário.

## - Estado Transiente

Os valores das constantes cinéticas do modelo Tosetto(2002), definidas no item 3.3, são colocadas na tela apresentada na Figura 19. A entrada de dados para simulação em regime transiente começa com os dados do regime permanente anterior à modificação do processo, Figura 20, onde as condições do regime permanente anterior às alterações do sistema são registradas e a modificação do sistema é definido, Figura 21, onde as possíveis a vazão de mosto, vazão de fermento e concentração de ART podem ser modificadas provocando alteração no processo. O resultado da simulação é o novo regime permanente a ser atingido com essa modificação, onde estão os valores dos componentes na entrada do processo e em cada um dos biorreatores, além do tempo necessário para atingir esse novo equilíbrio do processo fermentativo.



Simulação do Regime Transiente

Modelo Cinético: Tosetto (2002)

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

Parâmetros Cinéticos

Mimax	0,5	Ki	22	YN	6
Ks	3	Pmax	100		

Confirmar Fechar Continuar

Figura 19: Tela de entrada das constantes cinéticas do modelo Tosetto (2002).

As condições de operação do sistema em regime permanente, anterior à perturbação que desvia o processo para um regime transiente, devem ser registradas, o programa armazena os dados digitados pelo usuário na tela apresentada na Figura 20.

**Condições Iniciais do Sistema**

Vazão de Mosto	85 m <sup>3</sup> /h	Yps	0,426
ART no mosto	183,2 g/L	Volume do Reator1	262,1 m <sup>3</sup>
Vazão de Reciclo	65 m <sup>3</sup> /h	Volume do Reator2	236,3 m <sup>3</sup>
Etanol no Reciclo	15,2 g/L	Volume do Reator3	230,2 m <sup>3</sup>
Células no Reciclo	115,9 g/L	Volume do Reator4	283,4 m <sup>3</sup>
Yxs	0,026		

Buttons: Voltar, Fechar, Continuar, Confirmar

Figura 20: Tela de entrada das condições do sistema em regime permanente, antes da perturbação do sistema.

A última tela antes dos cálculos, Figura 21, é onde a perturbação do sistema deve ser colocada para verificação das novas condições em que o processo passa a trabalhar em regime transiente até atingir o novo regime permanente.

**Dê os valores para o regime transiente**

ART no Mosto	183,2 g/L
Vazão de Mosto	95 m <sup>3</sup> /h
Vazão de Reciclo	82 m <sup>3</sup> /h

Buttons: Voltar, Fechar, Calcular, Confirmar

Figura 21: Tela de entrada dos valores que podem ser perturbados no processo de produção de álcool.

## **2.6. Classificação das Cepas Dominantes**

### **2.6.1. Plaqueamento**

Amostras de vinho delevedurado retirado dos ensaios industriais nas usinas foram diluídas e plaqueadas pelo método de espalhamento em superfície em WLN (Difco 0424), adicionado de antibiótico (100 ppm) para inibição das bactérias, e incubadas em estufa a 32°C por 7 dias para a seleção das cepas que apresentaram contagem populacional acima de  $10^5$  UFC/mL. As cepas foram diferenciadas segundo os seguintes atributos: tamanho, padrão de cores, aspecto de superfície e contorno.

As cepas foram isoladas e purificadas em placas de PDA (potato dextrose agar) utilizando a técnica de estrias e então transferidas para tubos de ensaio com PDA inclinado (slants) e conservadas em óleo mineral. Posteriormente, as cepas foram identificadas pelo método de cariotipagem e testadas quanto às suas capacidades fermentativas.

### **2.6.2. Cariotipagem**

As cepas isoladas das amostras provenientes dos fermentadores das usinas Clealco e Alvorada em operação foram plaqueadas em meio PDA (potato dextrose agar) pela técnica de espalhamento em superfície e incubadas em estufa por 24 h a 32°C. Com uma alçada das colônias crescidas e 40 µL de agarose low melt (1,5% dissolvido em CPE) foram confeccionados “plugs”, amostras solidificadas em agarose com molde específico, utilizados na cariotipagem e adicionados a eles e 40 µL de solução de lise (0,020 g de enzima de lise, sigma L-1412, em 3 mL de tampão CPES, composto por ácido cítrico 0,84%; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,7%; EDTA.Na<sub>2</sub> 0,745%; sorbitol 22,52%; dithiothreitol 0,08%). Esta mistura foi homogeneizada e deixada em repouso por 30 minutos em geladeira. Em seguida os “plugs” foram removidos dos moldes e mantidos em tubos tipo ependorf imersos em solução CPE (ácido cítrico 0,84%; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,7%; EDTA.Na<sub>2</sub> 0,745%) por 4 horas a temperatura ambiente. Em seguida, retirou-se a solução CPE e adicionou-se a solução de proteinase K (Sigma P-6556) em quantidade suficiente para cobrir os “plugs”, para digestão das proteínas e lipoproteínas. Estes tubos foram mantidos em banho a 50°C por 16 horas. Após este tempo a solução de proteinase foi retirada e adicionada uma solução de EDTA (EDTA.Na<sub>2</sub> 18,62% e pH 8,0) sendo conservados em geladeira até sua utilização nas corridas. As amostras que seriam submetidas à eletroforese foram lavadas 3 vezes por 20

min e 5 vezes por 15 min, com 1 mL de tampão TE (tris 0,12%; EDTA ácido 0,029%; pH 8,0). Os “plugs” foram cortados e colocados nos poços existentes no gel de agarose a 1,0%. Estes foram cobertos com gel de agarose fundido. O gel contendo os “plugs” foi colocado na cuba de eletroforese (CHEF III® da Bio-Rad) contendo 2,2 litros de tampão TBE 0,5x a uma temperatura de 13,5°C. A corrida foi realizada nas condições apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7: Condições da cariotipagem das cepas

Condição	Valor
Ângulo	120°
Gradiente de voltagem	6 V/m
Temperatura	13,5°C
Tampão	TBE 0,5x
Tempo de pulso	5 s/h

Após o término da corrida, o gel é lavado e corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL de tampão TAFE por 30 minutos e em água deionizada para retirada do brometo e então fotografado sob luz UV. As imagens foram analisadas pelo programa UVP BioImagem System.

### ***2.7. Capacidade Fermentativa das Cepas Dominantes***

A avaliação da capacidade fermentativa das cepas dominantes presentes nos processos das usinas Alvorada e Clealco, no período de safra de 2002, foi feita por fermentação em batelada, em triplicada de cada cepa, com biorreatores que ficaram durante 24 hs em mesa agitadora à 150 rpm e 32°C.

As cepas foram crescidas em PDA (potate dextrose agar) na forma de “slant” por 24 horas. Este material foi suspenso em água estéril e 10 mL foram transferidos como inóculo para os biorreatores, erlenmeyers de 250 mL, contendo 90 mL de meio estéril com composição descrita na Tabela 8.

Tabela 8: Composição do meio de fermentação utilizado nos testes das cepas presentes nos biorreatores das usinas Alvorada e Clealco na safra de 2002

Componente	Concentração (g/L)
Sacarose	150
Extrato de levedura	6,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,0
NH <sub>4</sub> Cl	1,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,0
KCl	1,0

As cepas foram avaliadas quanto à característica do tipo de floculação. Amostras dos biorreatores foram analisadas quanto à concentração de açúcares redutores totais, concentração de etanol e massa seca. Com os dados das análises foi calculada a capacidade fermentativa de cada uma das cepas dos processos.

Os índices de desempenho apurados a partir das fermentações realizadas para determinação do Potencial Fermentativo e valores de  $\mu_{\text{máx}}$  são utilizados na classificação dos isolados pelo sistema de Capacidade Fermentativa (ANDRIETTA; MIGLIARI; ANDRIETTA, 1999).

Cada um dos seis valores de desempenho obtidos recebe uma pontuação (1, 2 ou 3), de acordo com os níveis pré-estabelecidos que estão apresentados na Tabela 9. Ao final, obtém-se um código de classificação composto de seis dígitos que identifica o isolado de acordo com o seu grupo de desempenho.

Tabela 9: Pontuação e limites das faixas de variação dos parâmetros utilizados na classificação das leveduras( ANDRIETTA; MIGLIARI; ANDRIETTA, 1999)

Dígito	Parâmetro	1 (Alto)	2 (Médio)	3 (Baixo)
Primeiro	$Y_{x/s}$ (gMS/gART)	>0,044	0,041 a 0,044	<0,041
Segundo	VCS (gART/L.h)	>5,7	5,2 a 5,7	<5,7
Terceiro	NCO (%)	>98,5	90 a 98,5	<90
Quarto	$\mu_{\text{máx}}$ (1/h)	>0,55	0,45 a 0,55	<0,45
Quinto	PROD (gEt/L.h)	>2,4	2,2 a 2,4	<2,2
Sexto	$Y_{p/s}$ (gEt/gART)	>0,45	0,45 a 0,42	<0,42

Uma cepa controle é avaliada em conjunto com cada grupo de leveduras testado. Os parâmetros de desempenho obtidos em cada fermentação para a cepa controle e para as cepas testadas são corrigidos para uma mesma base de cálculo.

### **3- Resultados e Discussão**

Os resultados estão subdivididos em:

- Análises laboratoriais das amostras coletadas nas usinas;
- Caracterização das cepas dominantes do processo;
- Avaliação dos modelos cinéticos não-estruturados e não segregados para descrição do processo fermentativo para produção de álcool;
- Simulados a partir do programa desenvolvido.

As análises laboratoriais foram essenciais para se conhecer as características do processo industrial em operação. Estes resultados descrevem o comportamento do processo fermentativo para cada biorreator em operação, sendo utilizados para a avaliação do modelo cinético que descreve este sistema.

No processo fermentativo real, as leveduras presentes na partida do processo podem ser substituídas por outras comuns à destilaria, para verificar esta modificação de população e a sua conseqüência, durante a safra, foi feita a caracterização das leveduras em cada um dos ensaios industriais.

A escolha de um modelo cinético que descreve a fermentação alcoólica em operação é essencial para simular o processo. A avaliação dos modelos, implementados no programa e apresentados na Tabela 5, serviu como ferramenta para determinar as características de limitação e inibição do processo real.

#### ***3.1. Análises Laboratoriais***

Os resultados das análises são apresentados, numa primeira etapa, separadamente para cada tipo de procedimento e depois são apresentados de forma associada. As tabelas completas com os dados das análises laboratoriais estão apresentadas no Apêndice 4.

##### **3.1.1. Massa Seca**

Devido à maior disponibilidade de nutrientes para crescimento celular e o acúmulo de produtos do metabolismo com o decorrer da fermentação, esperava-se que as quantidades de massa celular nos biorreatores fossem diferentes: no primeiro biorreator as

concentrações deveriam ser maiores, diminuindo em relação ao segundo, nos reatores subsequentes a concentração celular teria uma pequena diminuição, consequência da redução da taxa de reação. Isto, como pode ser visto nas Figura 22 e Figura 23, não acontece, provavelmente devido a uma oscilação na entrada do primeiro reator e um controle não tão eficiente durante a fermentação, sendo também cogitado o arraste de células de um reator para o outro.

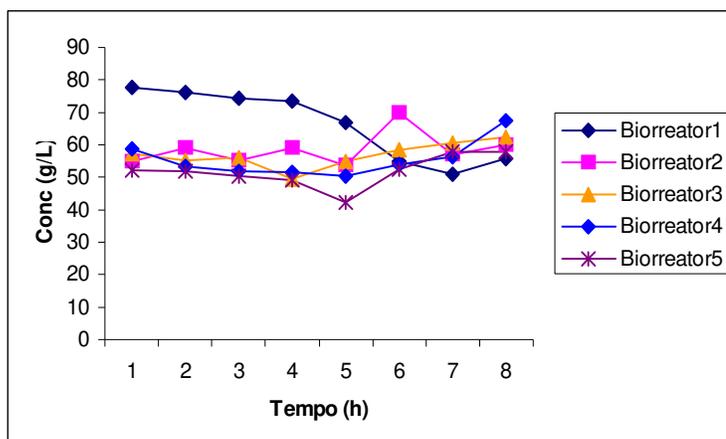


Figura 22: Gráfico da concentração de massa seca nos reatores do ensaio na usina Alvorada em agosto de 2002.

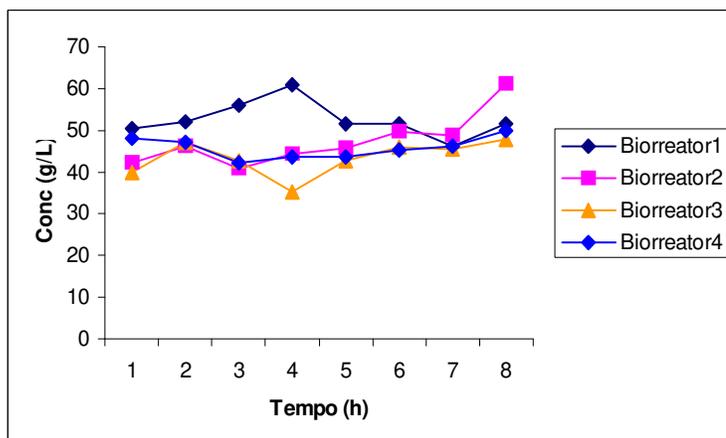


Figura 23: Gráfico do perfil de concentração de massa seca nos reatores do ensaio na usina Clealco em agosto de 2002.

Após as primeiras análises das amostras coletadas nas usinas houve uma desconfiança de que não houvesse padronização no preparo do fermento e do mosto. Na análise do fermento notou-se que houve oscilação na concentração celular durante cada ensaio industrial, que pode ser visualizado na Figura 24, porém, não comprometendo o

teste, pois a quantidade de fermento colocada nos biorreatores é superior à necessária para fermentação, mas não o suficiente para influenciar a cinética do processo.

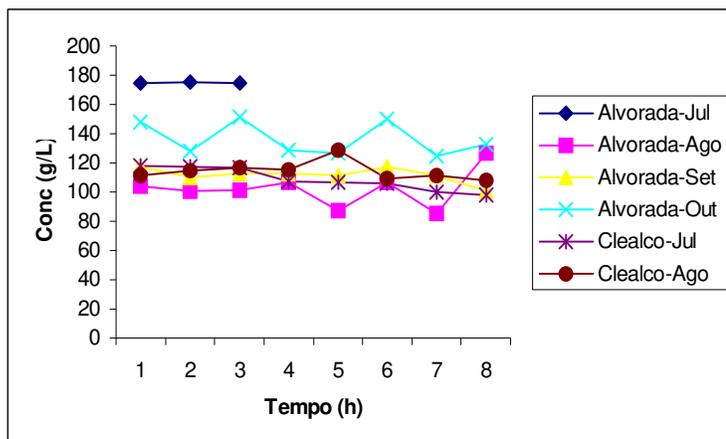


Figura 24: Gráfico da concentração de massa seca no fermento dos ensaios experimentais das usinas Alvorada e Clealco.

Devido à fermentação alcoólica ser uma das etapas do metabolismo da levedura, o conhecimento da quantidade de massa celular em cada biorreator é essencial para descrever a velocidade em que esta reação ocorre.

### 3.1.2. Açúcares Redutores Totais

Nos ensaios industriais, a concentração de açúcares redutores totais (ART) no mosto deveria ser constante, porém isso não foi constatado nas análises laboratoriais, o que nos faz perceber que apesar de se tratar de um processo contínuo não é um processo que atinge o regime permanente. Isto, provavelmente, porque a produção de álcool está associada ao consumo de açúcar – tanto a Clealco como a Alvorada trabalham com mel residuário que deve ser diluído para entrar no primeiro biorreator – isto pode ocasionar diminuição no nível do reservatório de mel, sendo então feita a adição de água, levando à redução de ART no mosto. As concentrações de ART do mosto, durante as oito horas de coletas nas usinas, estão apresentadas na Figura 25.

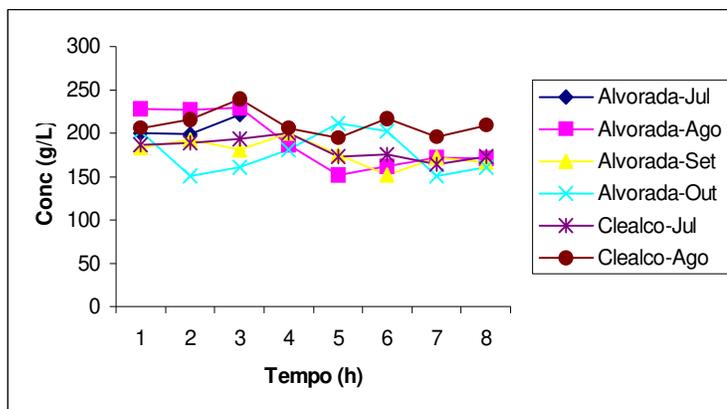


Figura 25: Gráfico da concentração de ART no mosto durante os ensaios nas usinas.

A variação de concentração de ART no mosto implica oscilação também no primeiro biorreator. Este efeito quase não pode ser identificado no segundo biorreator e nos seguintes, a concentração de ART é praticamente a mesma durante todo o ensaio, como pode ser visto na Figura 26, o que mostra que a conversão de ART chega a um limite, não havendo alteração com a modificação da entrada. Ainda é possível visualizar a fermentação ocorrendo nos três primeiros biorreatores, logo o sistema não está sendo utilizado em toda a sua capacidade, isto é, o potencial de produção é de quantidades maiores de álcool, porém a usina não optou por utilizar todo o equipamento disponível.

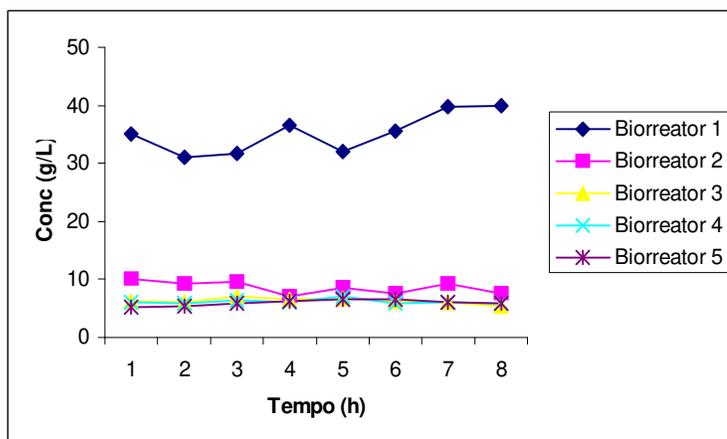


Figura 26: Gráfico da concentração de ART nos biorreatores durante o ensaio na usina Alvorada em agosto de 2002.

### 3.1.3. Etanol

As concentrações de etanol nos biorreatores também oscilaram durante os ensaios, como pode ser visto na Figura 27. Esta variação da concentração de etanol já era esperada devido à não padronização do mosto, pois a quantidade de ART na entrada do processo é variável e a produção de álcool está diretamente associada à quantidade de substrato disponível e isto pode ser visualizado Figura 28.

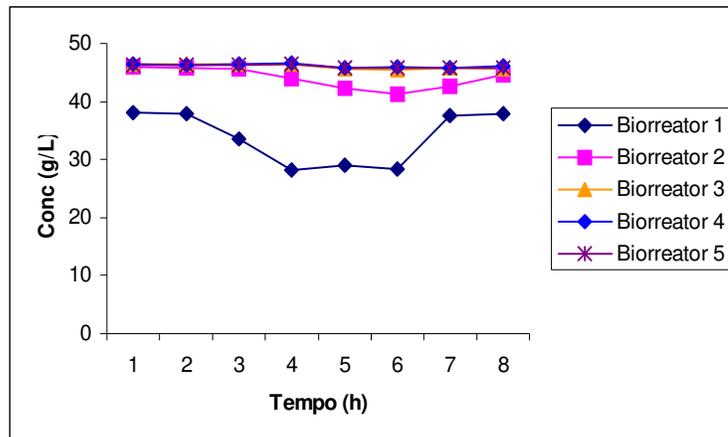


Figura 27: Perfil de concentração de etanol em cada um dos biorreatores durante as oito horas de ensaio na usina Alvorada em outubro de 2002.

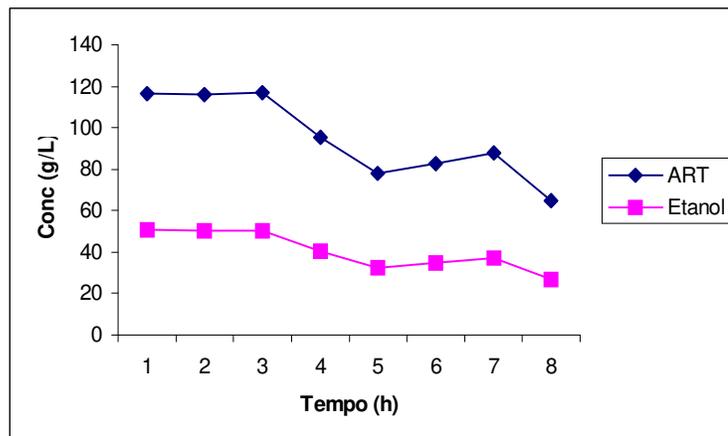
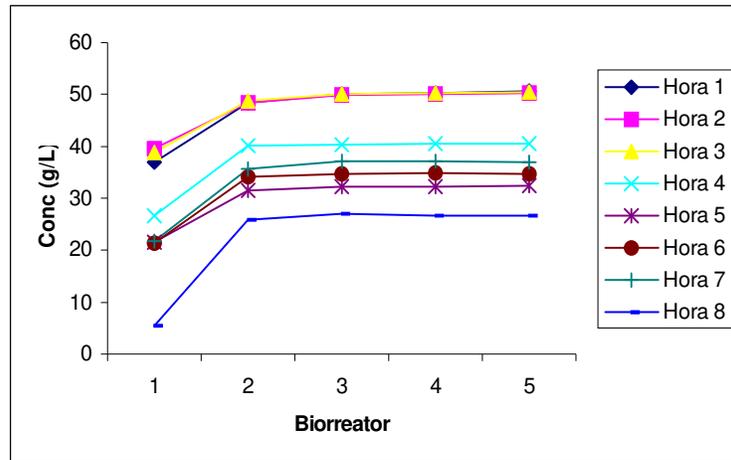


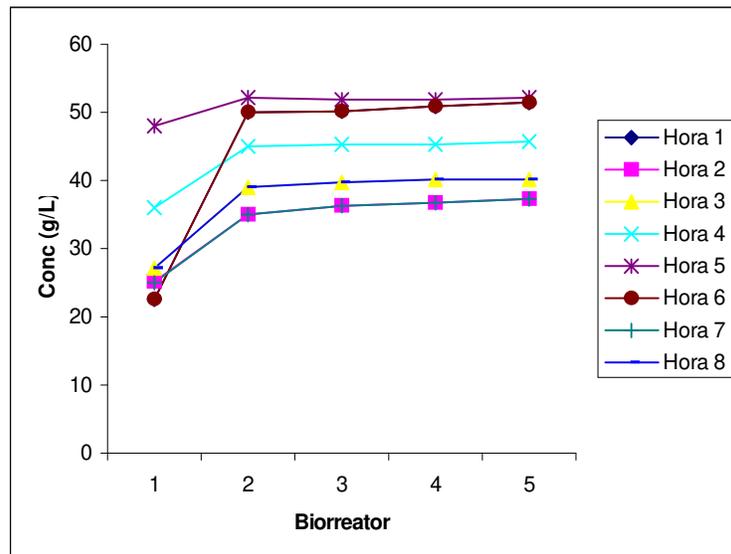
Figura 28: Perfil de concentração de ART na entrada do primeiro biorreator e etanol na saída do quinto biorreator, Alvorada, agosto de 2002.

Pelos perfis de concentração de etanol durante as oito horas do ensaio feito nas usinas Alvorada, Figura 29, e Clealco, Figura 30, pode-se observar que a usina Clealco possui um processo mais controlado e próximo de um regime permanente, pois a

concentração de etanol da última dorna é praticamente o mesmo, não sofrendo tantas oscilações e com perfis mais homogêneos.

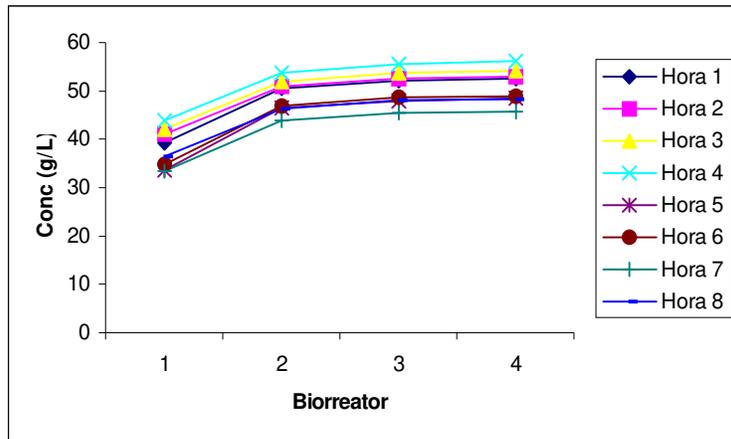


(a)

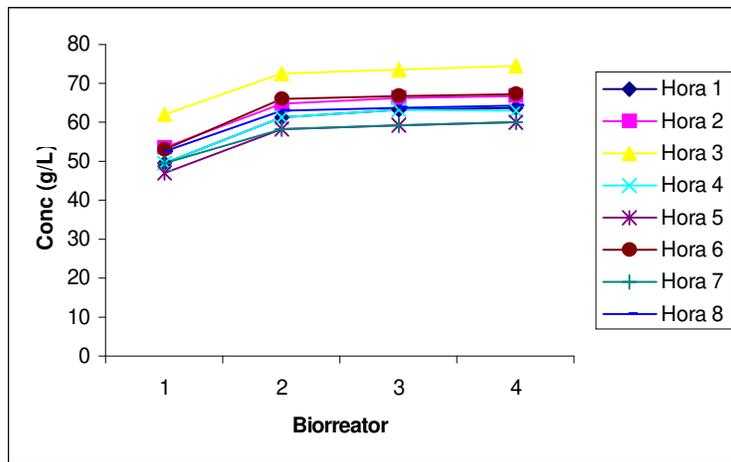


(b)

Figura 29: Perfis de concentração de etanol durante o ensaio da usina Alvorada onde (a) ensaio de agosto e (b) ensaio de outubro.



(a)



(b)

Figura 30: Perfis de concentração de etanol durante o ensaio da usina Clealco, onde (a) ensaio de julho e (b) ensaio de agosto.

Verifica-se, ainda, que os perfis mostram, nas duas usinas, que os dois últimos reatores não apresentam significativo aumento de concentração de etanol, o que evidencia a não utilização do sistema em toda a sua capacidade. Isto é muito comum na indústria sucroalcooleira que define a estratégia de produção, de acordo com o mercado internacional de açúcar e de álcool, visando o maior lucro possível.

## **3.2. *Classificação das Cepas Dominantes***

Apesar destes dados não serem utilizados diretamente na simulação é essencial que se conheça a população do biorreator para avaliar qual a influência da população de cepas no comportamento do processo de produção de álcool.

### **3.2.1. *Plaqueamento***

Somente a coleta da usina Alvorada do mês de outubro não foi plaqueada. A usina Alvorada apresentou três ou quatro cepas dominantes no processo em todos os ensaios, com concentração superior a  $10^5$ UFC/mL, porém, aparentemente, não se trata das mesmas cepas, pois apresentaram características diferentes de aparência no plaqueamento em WLN ágar. A contagem das cepas está apresentada nas Tabela 10 e Tabela 11, juntamente com as características de aparência visualizada no meio diferencial. Nas usinas Clealco e Alvorada a partida da fermentação na safra de 2002 foi feita por leveduras isoladas do próprio processo. A cepa C1, dominante do processo, não se trata necessariamente da cepa de partida e em todos os ensaios as cepas dominantes apresentaram aparência semelhantes ao ser plaqueada no meio WLN ágar. As outras colônias tiveram características diferentes se forem comparados os ensaios industriais e isto significa tipos diferentes o que indica instabilidade populacional.

Tabela 10: Contagem e aparência das cepas dominantes do processo da usina Clealco nas datas de amostras coletadas, na safra de 2002

Usina – Data	Cepa	Contagem	Participação Populacional (%)	Característica em WLN ágar
Julho	C1	$1,0 \cdot 10^8$	82,5	Colônia grande, centro verde, borda larga branca, lisa, regular, com gradiente de cor
	C2	$2,0 \cdot 10^7$	16,5	Colônia grande, centro pequeno verde claro, borda grande e braça, irregular, rugosa, com gradiente de cor
	C3	$1,2 \cdot 10^6$	1,0	Colônia pequena, centro grande verde, borda fina transparente, lisa, regular, com gradiente de cor
Agosto	C1	$3,4 \cdot 10^8$	94,7	Colônia grande, centro verde, borda larga branca, lisa, regular, com gradiente de cor
	C2	$1,2 \cdot 10^7$	3,3	Colônia média, centro grande verde, borda fina transparente, lisa, regular, com gradiente de cor
	C3	$4,0 \cdot 10^6$	1,1	Colônia pequena, centro verde escuro, borda finíssima transparente, lisa, regular, sem gradiente de cor
	C4	$3,0 \cdot 10^6$	0,8	Colônia grande, centro verde claro, borda larga branca, irregular, com gradiente de cor

Tabela 11: Contagem e aparência das cepas dominantes do processo da usina Alvorada nas datas de amostras coletadas, na safra de 2002

Data	Cepa	Contagem	Participação Populacional (%)	Característica em WLN ágar
Julho	C1	$7,0 \cdot 10^8$	61,4	Colônia grande, centro verde, borda larga branca, lisa, regular, com gradiente de cor
	C2	$2,0 \cdot 10^8$	17,5	Colônia grande, centro verde grande, borda estreita esverdeada, lisa, chantily, regular, com gradiente de cor
	C3	$2,0 \cdot 10^8$	17,5	Colônia grande, centro verde escuro, pigmentação verde escura na borda, lisa, regular, com gradiente de cor
	C4	$4,0 \cdot 10^7$	3,5	Colônia média, centro verde escuro, borda muito fina transparente, lisa, regular, com gradiente de cor
Agosto	C1	$2,0 \cdot 10^8$	95,7	Colônia grande, centro verde, borda larga branca, lisa, regular, com gradiente de cor
	C2	$4,0 \cdot 10^6$	1,9	Colônia média, centro grande verde, borda fina branca, lisa, regular, com gradiente de cor
	C3	$3,0 \cdot 10^6$	1,4	Colônia pequena, centro verde escuro, borda fina transparente, lisa, regular, sem gradiente de cor
	C4	$2,0 \cdot 10^6$	1,0	Colônia pequena verde, toda mesclada de branco, irregular, com gradiente de cor

Continua

Data	Cepa	Contagem	Participação Populacional (%)	Característica em WLN ágar
Setembro	C1	2,0.10 <sup>7</sup>	90,1	Colônia grande, centro verde, borda larga branca, lisa, regular, com gradiente de cor
	C2	2,0.10 <sup>6</sup>	9,0	Colônia grande, centro verde escuro, toda mesclada de branco, borda pequena esverdeada, lisa, regular, com gradiente de cor
	C3	2,0.10 <sup>5</sup>	0,9	Colônia pequena, centro verde escuro grande, borda fina branca, brilhante, lisa, regular, sem gradiente de cor

### 3.2.2. Cariotipagem

Os isolados dos ensaios industriais foram submetidos à cariotipagem eletroforética, segundo Blondin e Vezinhet (1988) modificado. Os perfis eletroforéticos são mostrados nas Figura 31 e Figura 32. As cepas de leveduras marcadas com o retângulo apresentam o mesmo perfil eletroforético. A cepa de levedura apontada pela seta não pode ser identificada pelos padrões conhecidos.

O padrão de bandas obtido para as leveduras analisadas inclui as amostras no grupo *Saccharomyces sensu stricto* (*S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* e *S. pastorianus*) que se caracteriza por apresentar 12 a 17 bandas na cariotipagem eletroforética (Segundo VAUGHAN-MARTINI et al., 1993 citado por STROPPIA, 2002), já que nenhum outro grupo de leveduras possui tantos cromossomos.

Os padrões são cepas selecionadas e conhecidas que servem de parâmetro para identificação daquelas a serem identificadas.

Note que a dinâmica de população no processo fermentativo industrial é instável, pois tanto na usina Alvorada quanto na Clealco somente um biotipo se repetiu. Ao observar as cepas marcadas com mesmo perfil cromossômico e comparando com o resultado do plaqueamento, notamos que não coincidem na aparência em WLN ágar. Isto significa que

não se trata da mesma cepa, porém são parentes entre si e indica a presença de uma levedura bem adaptada à fermentação. Apesar da aparência semelhante das cepas dominantes do processo, C1, no plaqueamento, nota-se que elas não possuem o mesmo perfil cromossômico, logo, não se trata da mesma cepa nos ensaios industriais.

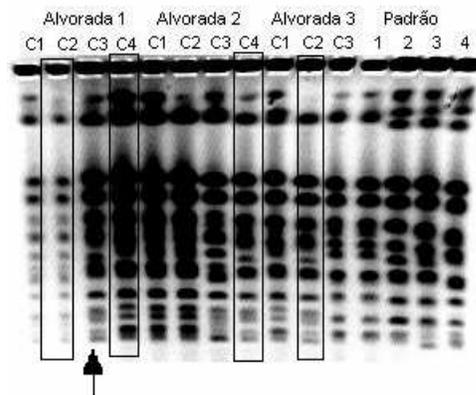


Figura 31: Perfis cromossômicos de isolados dominantes da safra 2002 da usina Alvorada.

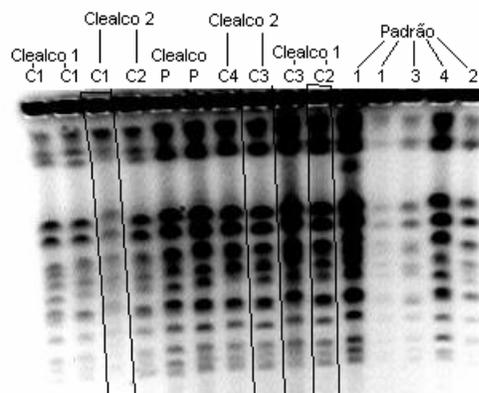


Figura 32: Perfis cromossômicos de isolados dominantes da safra 2002 da usina Clealco.

### 3.2.3. Capacidade Fermentativa das Cepas Dominantes

As leveduras isoladas no plaqueamento foram classificadas pelo sistema “Capacidade Fermentativa” (ANDRIETTA; MIGLIARI; ANDRIETTA, 1999), que se baseia em parâmetros de desempenho, os quais estão apresentados na Tabela 12, juntamente com o grupo da classificação das cepas, que foi definido de acordo com os parâmetros apresentados na Tabela 9. A velocidade específica máxima,  $\mu_{max}$ , foi fixada em  $0,5 \text{ h}^{-1}$ , pois segundo Stroppa (2002), todas as leveduras testadas em usinas de álcool combustível

possuem este valor entre 0,45/h e 0,55/h. O quarto número de identificação da levedura foi então fixado em 2.

Tabela 12: Valores de rendimento em células ( $Y_{x/s}$  – g massa seca/g ART consumido), velocidade de consumo de substrato (VCS – g de ART/L.h), nível de conversão de substrato (NCO - %), produtividade (PROD – g de etanol/L.h) e rendimento em etanol ( $Y_{p/s}$  – g de etanol/g de ART consumido) das leveduras isoladas das usinas Alvorada (A) e Clealco (CL)

Isolado	$Y_{x/s}$	VCS	NCO	PROD	$Y_{p/s}$	Grupo
A1-C1	0,034	5,926	91,840	2,359	0,425	313.222
A1-C2	0,044	5,857	90,825	2,510	0,457	212.211
A1-C3	0,042	5,849	90,597	2,377	0,434	212.222
A1-C4	0,051	5,657	87,914	2,242	0,423	123.222
A2-C1	0,039	5,378	83,756	2,233	0,443	323.222
A2-C2	0,049	5,912	91,708	2,369	0,428	112.222
A2-C3	0,054	5,901	91,497	2,454	0,444	112.212
A2-C4	0,042	5,490	85,508	2,364	0,460	223.221
A3-C1	0,041	6,053	93,570	2,444	0,431	212.212
A3-C2	0,033	6,331	97,658	2,603	0,460	312.211
A3-C3	0,054	4,785	74,926	2,079	0,460	133.231
CL1-C1	0,041	5,887	91,189	2,465	0,460	212.211
CL1-C2	0,050	5,831	90,479	2,486	0,460	112.211
CL1-C3	0,036	5,773	89,529	2,536	0,460	313.211
CL2-C1	0,033	5,026	89,743	2,522	0,507	333.211
CL2-C2	0,054	5,891	91,195	2,560	0,460	112.211
CL2-C3	0,038	6,077	94,042	2,701	0,460	312.211
CL2-C4	0,047	5,340	83,114	2,381	0,460	122.221

Obs.: O primeiro número depois do ponto (.X) foi fixado em 2.

Os isolados foram classificados em grupos distintos. Na maioria dos casos, são leveduras oportunistas que podem causar problemas sob condições operacionais desfavoráveis.

Associando os resultados do plaqueamento, da cariotipagem e da capacidade fermentativa das cepas, notamos que nenhuma espécie se mantém no processo com o decorrer da safra, isto significa uma população instável nas usinas em operação.

### 3.3. Ajuste dos Modelos Cinéticos

As análises laboratoriais mostraram que o processo oscilou mesmo nas horas iniciais de coleta, quando, teoricamente, o processo estaria estável e em regime permanente. Para a ajuste dos modelos cinéticos foram usados valores médios das concentrações nas três primeiras horas de coleta, considerando regime permanente, essencial para padronização da operação da usina, como exemplo está apresentada na Tabela 13 as médias dos componentes nos biorreatores e na alimentação do processo para o ensaio da usina Alvorada no mês de agosto de 2002. Os valores utilizados para os ajustes cinéticos tanto dos componentes dos biorreatores quanto das condições operacionais, para todos os ensaios industriais deste trabalho, estão apresentados no Apêndice 5.

Tabela 13: Média das concentrações de ART, etanol e massa celular das três primeiras horas de ensaio da usina Alvorada em agosto de 2002

	ART (g/L)	Etanol (g/L)	Massa Celular (g/L)
Mosto	288,459	0,000	0,00
Biorreator 1	31,826	38,520	74,66
Biorreator 2	9,625	48,611	55,88
Biorreator 3	6,345	50,070	55,66
Biorreator 4	6,101	50,211	55,29
Biorreator 5	5,446	50,509	51,01
Fermento	0,000	12,627	100,81

A escolha do melhor resultado para o ajuste dos parâmetros cinéticos está associada ao desvio ocasionado pela escolha do intervalo usado no programa e à possibilidade de reduzi-lo, sem causar inconsistência física no modelo. O ajuste dos parâmetros cinéticos é feito de acordo com o intervalo pré-definido. A Figura 33 é um caso onde o intervalo para ajuste não foi adequado, tendo em vista o alto valor do desvio, podendo também verificar a inadequação do ajuste pelo gráfico. É ainda importante lembrar que o desvio está sendo calculado de acordo com o ajuste com relação ao substrato, ART, esta escolha foi feita porque é o fator de maior alteração dentro do biorreator.

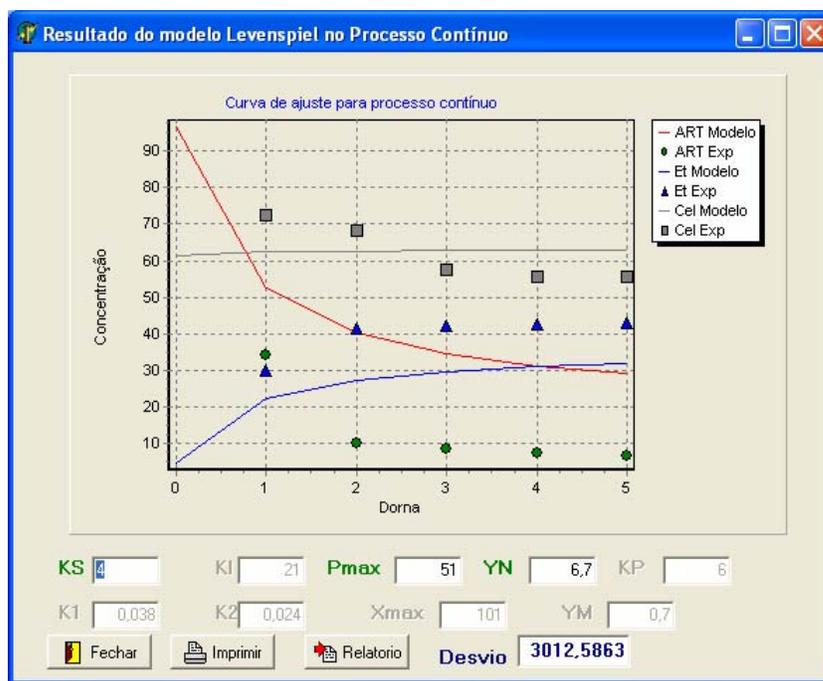
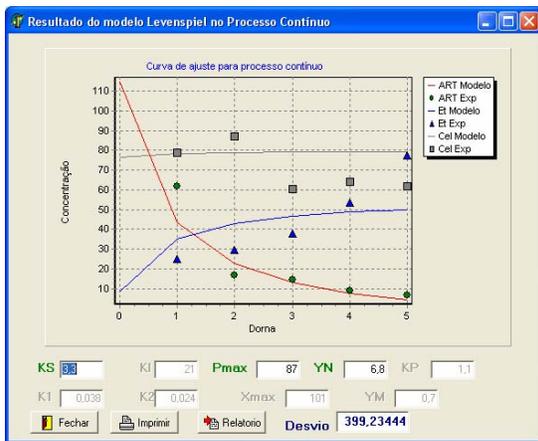


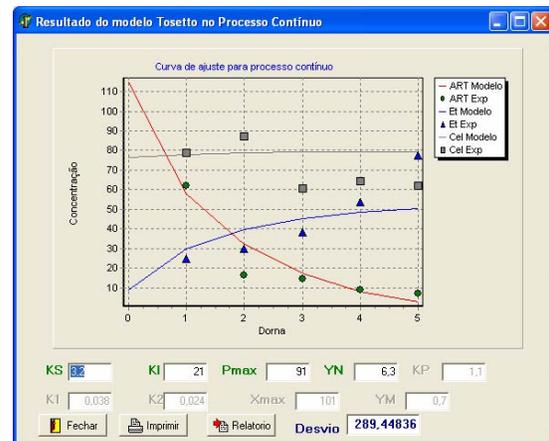
Figura 33: Ajuste do modelo Levenspiel (1980) para dados da usina Clealco, agosto de 2002, com alto desvio de ajuste ocasionado por intervalo de ajuste inadequado.

Devido à grande interação entre os parâmetros cinéticos dos modelos, deve-se avaliar o intervalo de ajuste que não gere inconsistência física. Desta forma, os valores que apresentam o menor desvio nem sempre são os melhores para descrever o sistema. O modelo Ghose não possibilitou a escolha de intervalo para os parâmetros cinéticos consistentes fisicamente, pois os valores de  $K_i$ , constante de inibição pelo substrato, foram muito próximos ou superiores aos valores de  $K_s$ , constante de limitação pelo substrato, o que resultou em valores muito baixos ou negativos para a velocidade de reação. Além das constantes de limitação e inibição pelo substrato, o modelo Ghose apresentou também valores inferiores aos citados em literatura para o parâmetro  $P_{max}$ , valor da concentração limite pelo produto inibidor, como pode ser visto na Tabela 6.

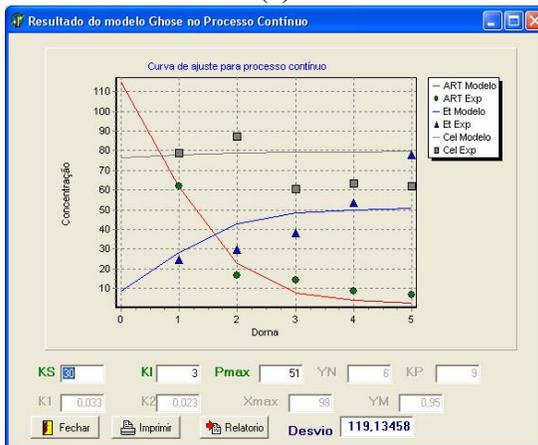
As figuras de Figura 34 à Figura 39 são os ajustes feitos para cada um dos modelos, apresentados na Tabela 5, com os dados obtidos nos ensaios industriais, apresentados no Apêndice 5. Os ajustes feitos com os dados da usina Alvorada no mês de julho estão apresentados na Figura 34, do mês de agosto na Figura 35, de setembro na Figura 36 e de outubro na Figura 37, enquanto que as Figura 38 e Figura 39 são os ajustes feitos para a usina Clealco com os dados dos ensaios industriais dos meses de julho e agosto de 2002, respectivamente.



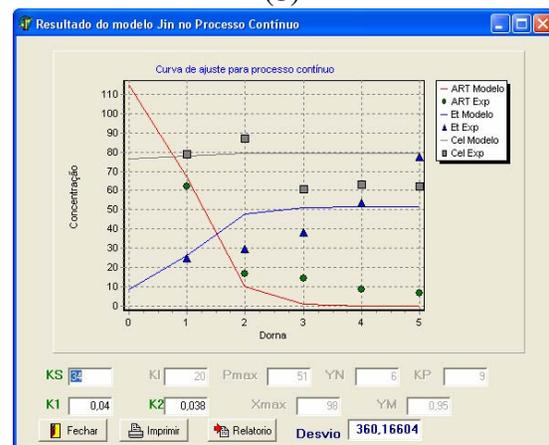
(a)



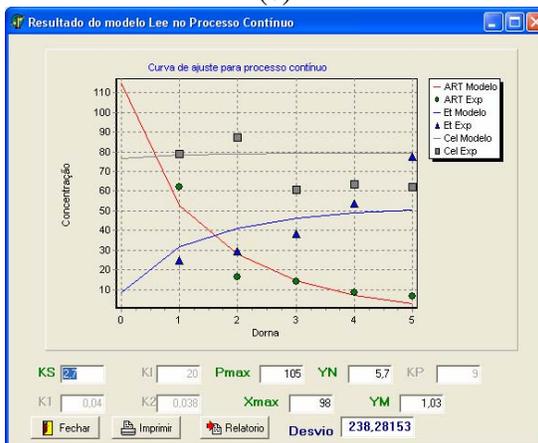
(b)



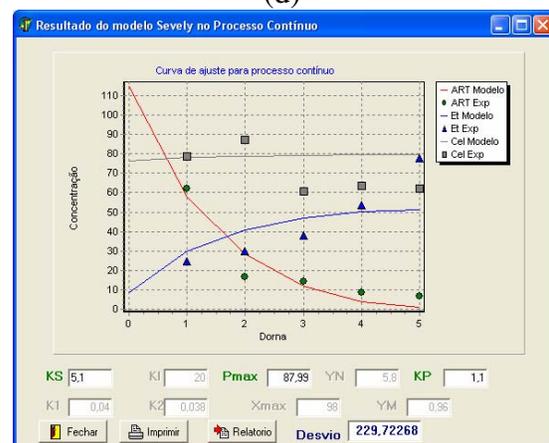
(c)



(d)

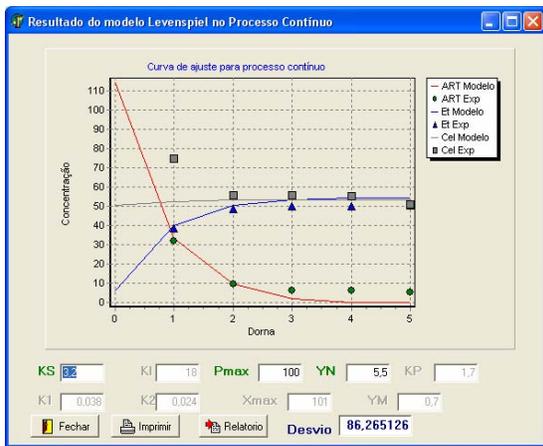


(e)

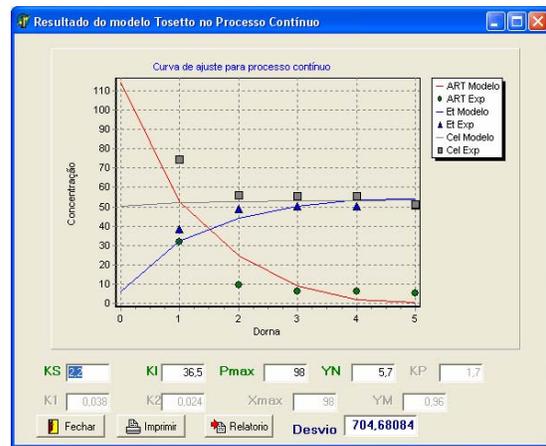


(f)

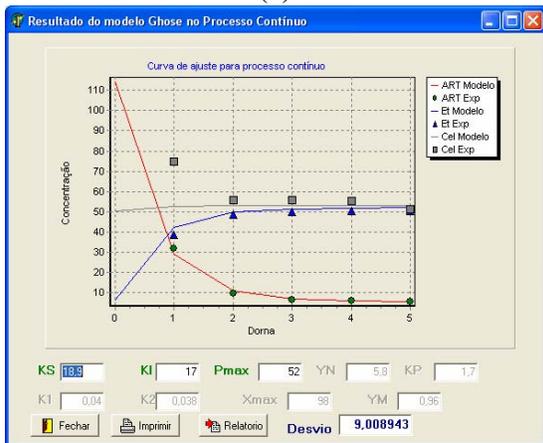
Figura 34: Tela de saída dos parâmetros cinéticos ajustados para: (a) Levenspiel, (b) Tosetto, (c) Ghose, (d) Jin, (e) Lee e (f) Sevely, com dados da Usina Alvorada, coleta de julho de 2002, e do desvio associado ao ajuste.



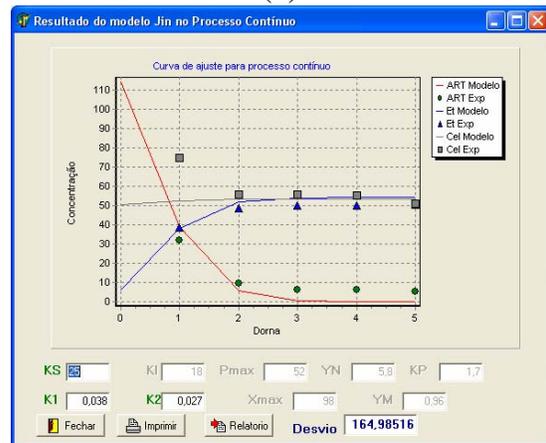
(a)



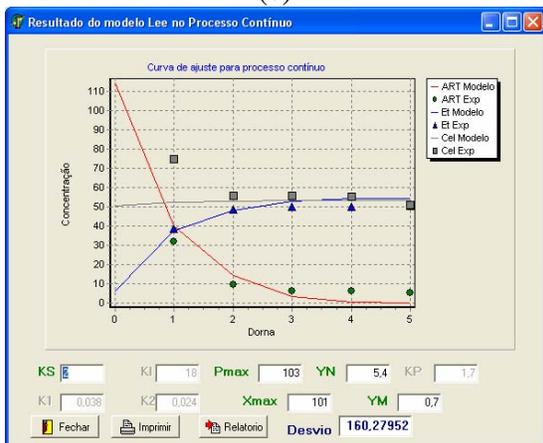
(b)



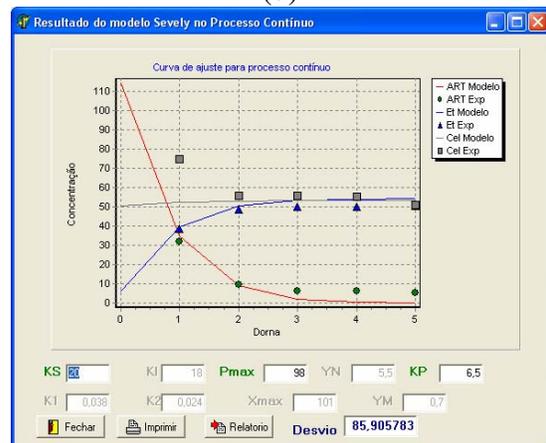
(c)



(d)

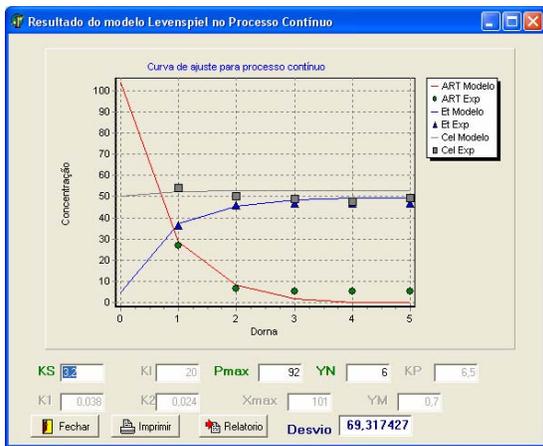


(e)

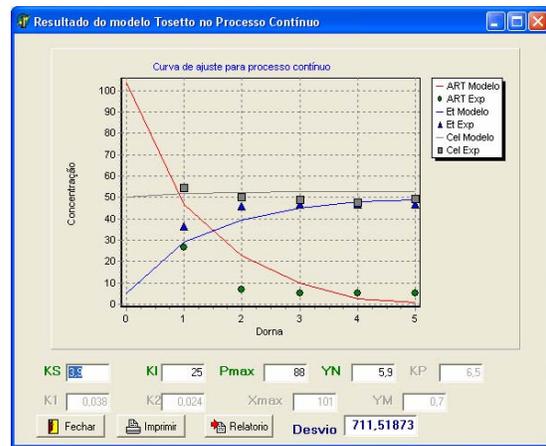


(f)

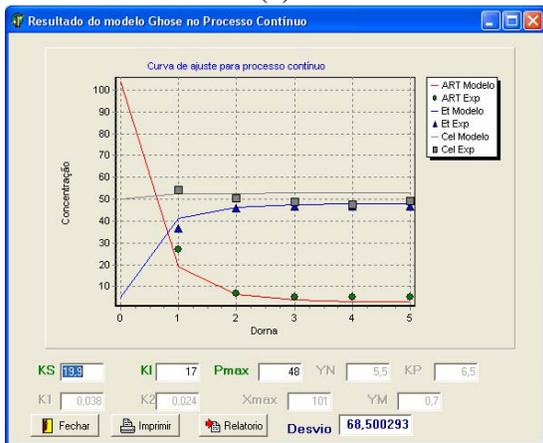
Figura 35: Tela de saída dos parâmetros cinéticos ajustados para: (a) Levenspiel, (b) Tasetto, (c) Ghose, (d) Jin, (e) Lee e (f) Sevely, com dados da Usina Alvorada, coleta de agosto de 2002, e do desvio associado ao ajuste.



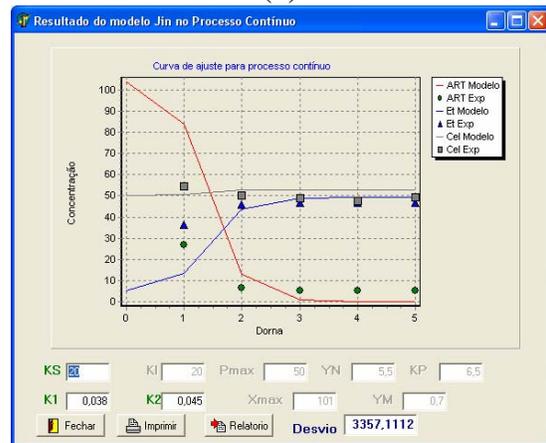
(a)



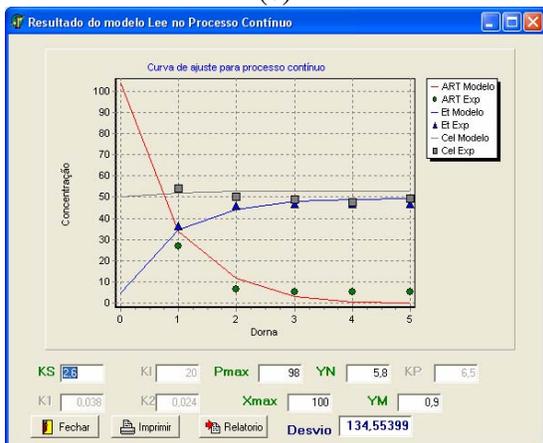
(b)



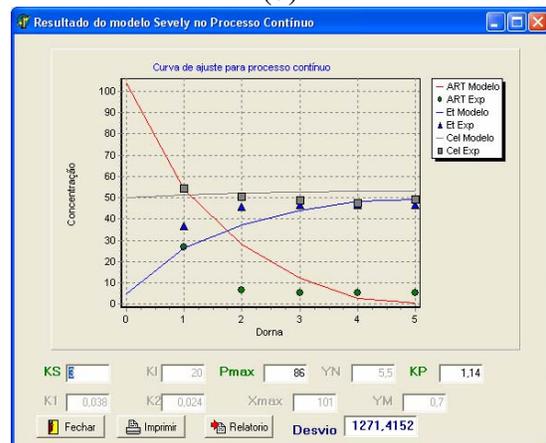
(c)



(d)

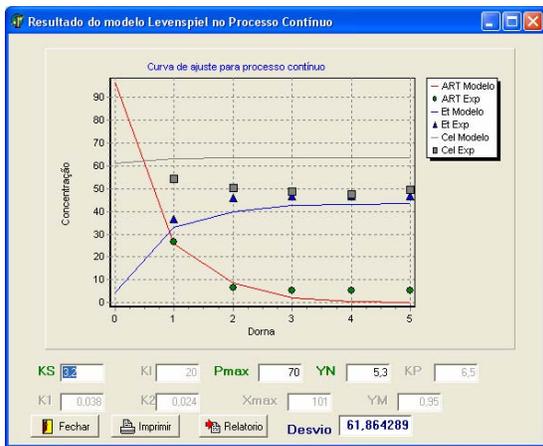


(e)

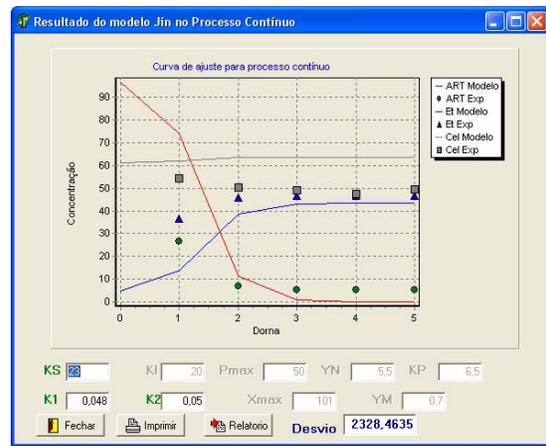


(f)

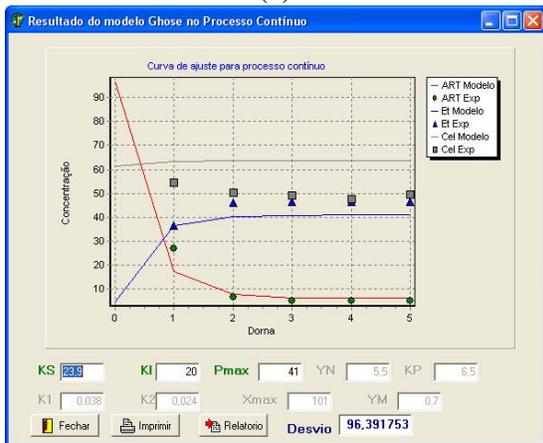
Figura 36: Tela de saída dos parâmetros cinéticos ajustados para : (a) Levenspiel, (b) Tosetto, (c) Ghose, (d) Jin, (e) Lee e (f) Sevely, com dados da Usina Alvorada, coleta de setembro de 2002, e do desvio associado ao ajuste.



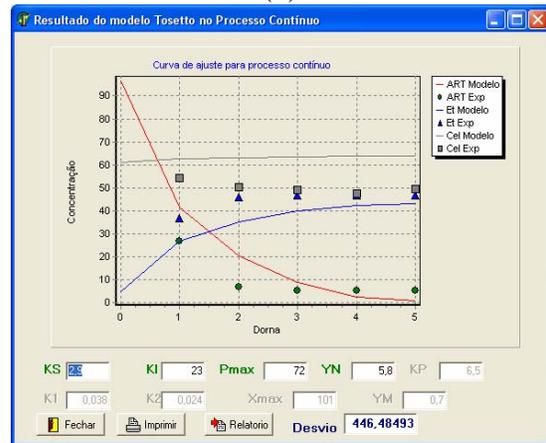
(a)



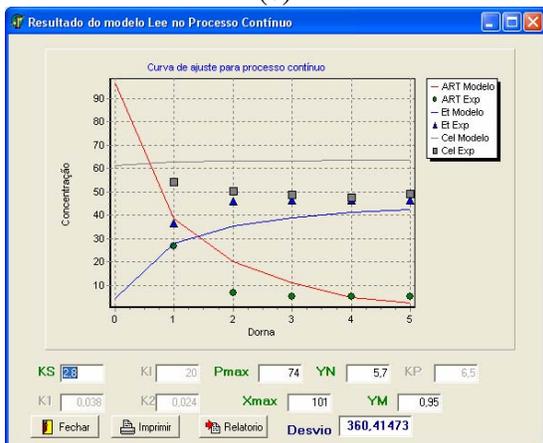
(b)



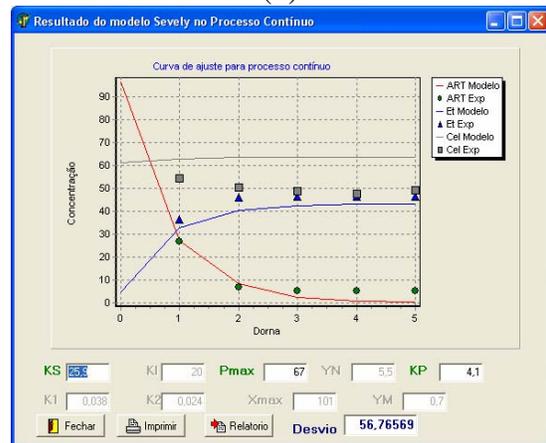
(c)



(d)

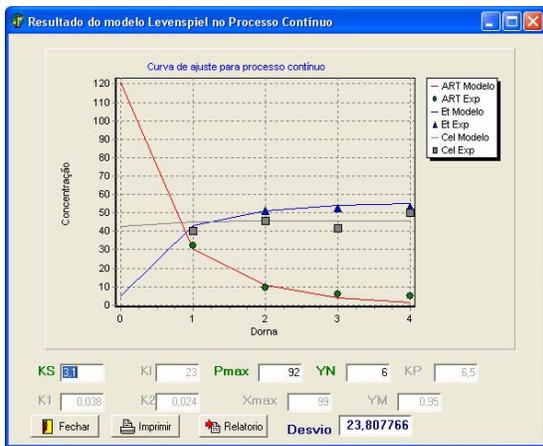


(e)

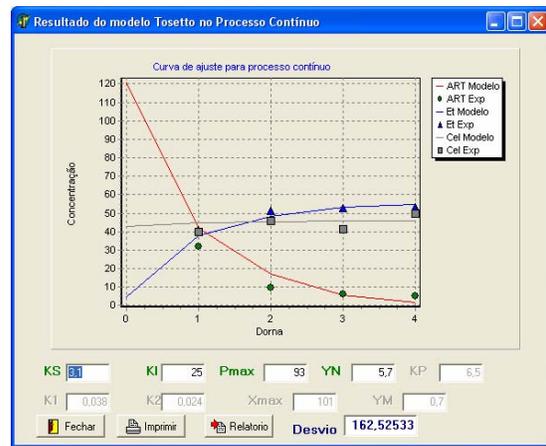


(f)

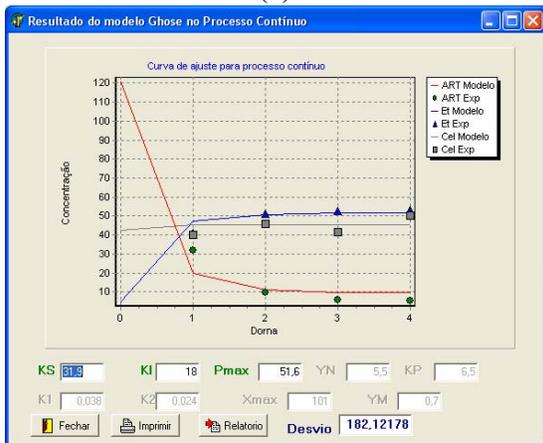
Figura 37: Tela de saída dos parâmetros cinéticos ajustados para: (a) Levenspiel, (b) Tostetto, (c) Ghose, (d) Jin, (e) Lee e (f) Sevely, com dados da Usina Alvorada, coleta de outubro de 2002, e do desvio associado ao ajuste.



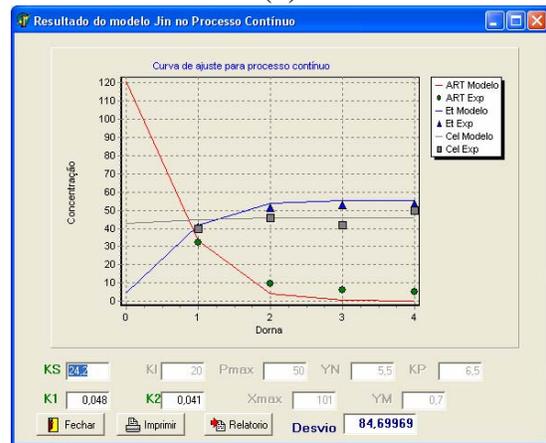
(a)



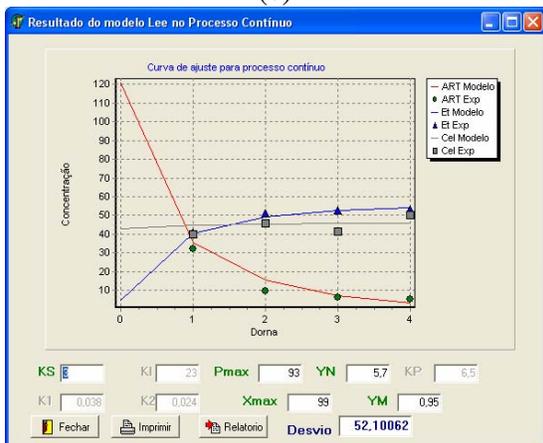
(b)



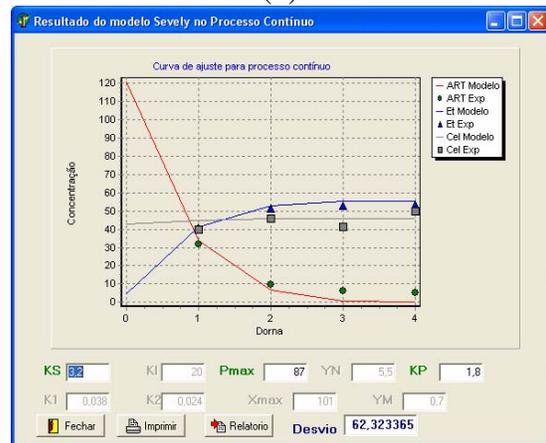
(c)



(d)

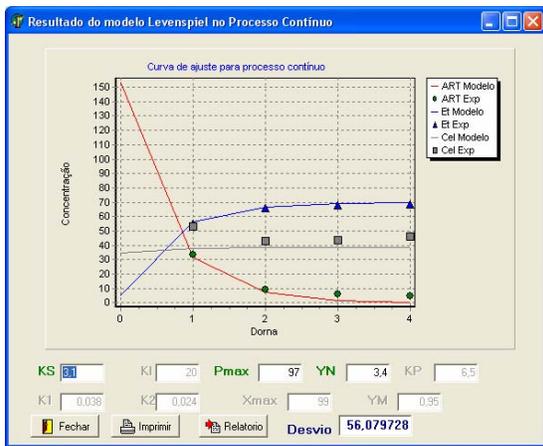


(e)

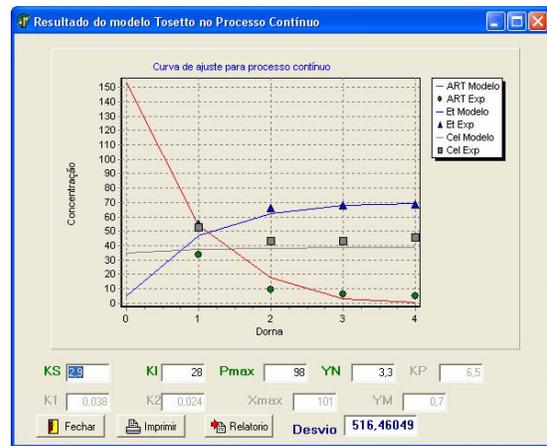


(f)

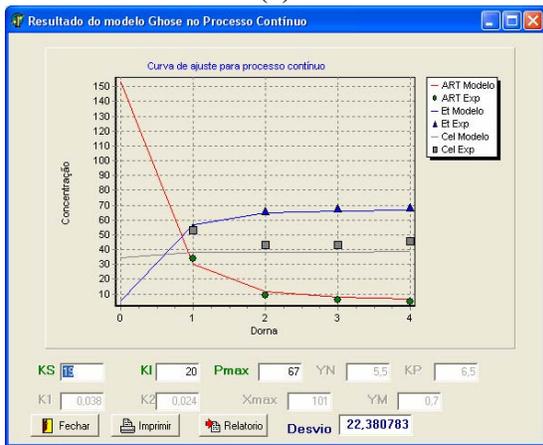
Figura 38: Tela de saída dos parâmetros cinéticos ajustados para: (a) Levenspiel, (b) Tasetto, (c) Ghose, (d) Jin, (e) Lee e (f) Sevely, com dados da Usina Clealco, coleta de julho de 2002, e do desvio associado ao ajuste.



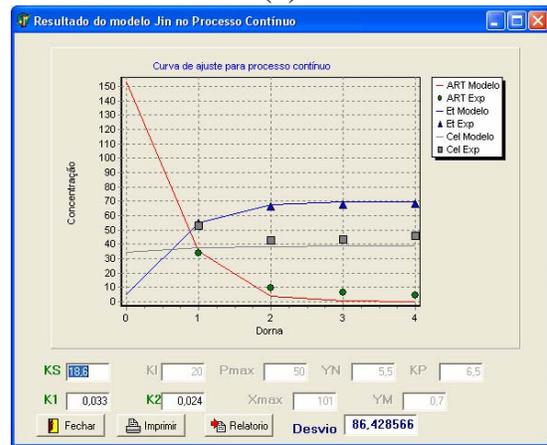
(a)



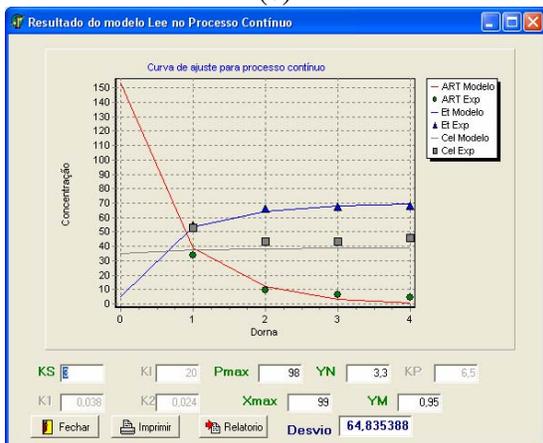
(b)



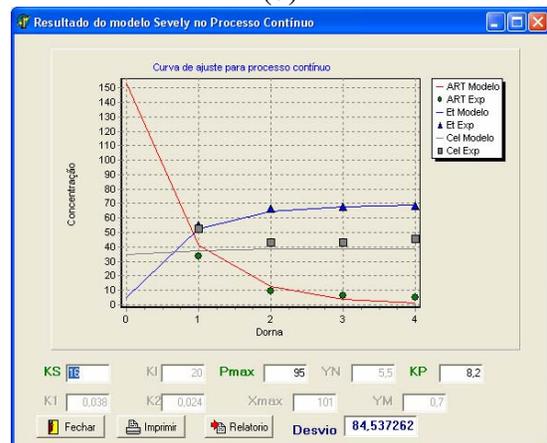
(c)



(d)



(e)



(f)

Figura 39: Tela de saída dos parâmetros cinéticos ajustados para: (a) Levenspiel, (b) Tostetto, (c) Ghose, (d) Jin, (e) Lee e (f) Sevely, com dados da Usina Clealco, coleta de agosto de 2002, e do desvio associado ao ajuste.

O modelo de JIN apresentou grande oscilação nos valores dos parâmetros, ajuste pouco eficiente e grandes variações com modificações pequenas dos parâmetros cinéticos.

O modelo de SEVELY resultou valores coerentes com a literatura em alguns ensaios, como pode ser visto na Figura 34, onde o parâmetro  $K_s$ , limitação pelo substrato, foi de 5,1 g/L,  $P_{máx}$  foi 88 g/L e  $K_p$ , constante de inibição pelo produto, foi de 1,1 g/L. Porém essa coerência não foi possível em todos os ensaios, como pode ser visto na Figura 40, para o ensaio feito na usina alvorada em agosto de 2002, onde o desvio associado a este ajuste ficou superior ao apresentado na Figura 35. Dessa forma não houve similaridade de valores dos parâmetros cinéticos entre os ensaios industriais.

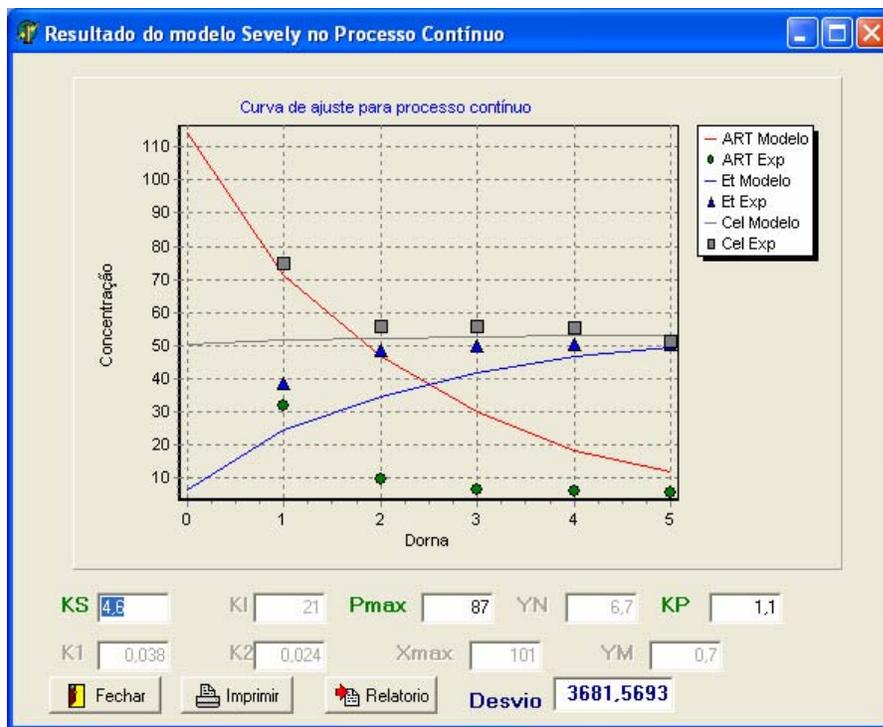


Figura 40: Problema de ajuste dos parâmetros cinéticos do modelo Sevely para os dados da Usina Alvorada no ensaio de agosto de 2002.

Os parâmetros cinéticos comuns aos modelos TOSETTO (2002), LEE; PAGAN; ROGERS (1983) e LEVENSPIEL (1980) apresentaram valores semelhantes, onde o parâmetro  $K_s$ , limitação pelo substrato, foi de  $(3,0 \pm 0,4)$  g/L. O fator de inibição pelo substrato do modelo TOSETTO (2002),  $K_i$ , foi  $(27 \pm 5)$  g/L. O parâmetro  $X_{máx}$ , inibição pela massa celular, e  $Y_M$ , fator exponencial desta inibição, para o modelo LEE; PAGAN; ROGERS (1983) foram  $(100 \pm 1)$  g/L e  $(0,9 \pm 0,1)$ , respectivamente.

O valor de  $P_{m\acute{a}x}$  esperado é próximo de 100 g/L e como a inibição pelo produto está descrita por duas constantes cinéticas,  $P_{m\acute{a}x}$  e  $Y_N$ , o fator potência de inibição pelo produto pode ser ajustado para obtenção do valor de  $P_{m\acute{a}x}$  que se deseja. Isto é uma questão de convergência do programa, depende dos valores iniciais testados para ajuste das constantes cinéticas. Neste caso, o  $Y_N$  é  $(6 \pm 0,5)$ . Se o fator exponencial de inibição pelo produto,  $Y_N$ , for  $(2,7 \pm 0,6)$ , o valor da concentração limite pelo produto inibidor,  $P_{m\acute{a}x}$ , seria  $(60 \pm 6)$  g/L. Note que estes valores fazem a Equação (23), que é a responsável pela inibição pelo produto, tem a mesma influência no modelo, isto é, se substituirmos os valores o resultado final de  $GP$  será o mesmo.

$$GP = \left(1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}}\right)^{Y_N} \quad (23)$$

O valor de  $Y_N$  obtido neste trabalho não é semelhante ao citado na bibliografia, próximo de 0,7. Nota-se que os dados apresentados no trabalho Tosetto (2002) não são ajustáveis à este modelo, apresentando inconsistência física, diferente dos dados obtidos nas análises deste trabalho, onde o intervalo de ajuste foi diferente e fisicamente consistente.

Pode-se observar que os modelos que apresentam inibição pelo produto em forma de potência são os que ajustam melhor os dados experimentais, independente do tipo de inibição pelo substrato, isto, segundo Thatipalama, Rohani e Hill(1992), porque a inibição pelo substrato só começa ser relevante ao processo em concentrações superiores à 150g/L, o que não é o caso das condições de operação das usinas. A inibição pela massa celular, considerada no modelo de Lee; Pagan; Rogers (1983), também não tem significativa relevância na descrição da cinética das usinas estudadas, pois este fator não apresentou influência nos resultados. Os modelos Tosetto (2002), Lee; Pagan; Rogers (1983) e Levenspiel (1980) apresentaram consistência física e de convergência de valores sendo, estes modelos, indicados para descrever a cinética da fermentação alcoólica.

A verificação de que um mesmo modelo pode descrever a cinética de fermentação em todos os ensaios industriais mostra que apesar da instabilidade da população, o processo independe das características individuais de cada levedura e se comportando de forma

semelhante. Isto significa que o modelo é eficiente na descrição do processo real de produção de álcool.

### **3.4. Modelagem Matemática**

A simulação do regime permanente é utilizado com dois propósitos: projeto e estudo cinético enquanto que a do estado dinâmico é utilizado para avaliação de usinas já em operação.

#### **3.4.1. Estado Estacionário**

Mesmo que a usina real não opere em estado estacionário, os resultados obtidos nesta etapa são utilizados para o dimensionamento de unidades a serem construídas e para a determinação da cinética, tanto para definição dos parâmetros quanto para o ajuste do modelo de unidades já em operação.

O programa foi testado em condições semelhantes às de operação das usinas Clealco e Alvorada para avaliação da capacidade de previsão de um sistema real. E como exemplo está apresentada a simulação, a partir dos dados referentes à coleta de julho de 2002, da usina Clealco. Veja, na Figura 41, a entrada dos dados de operação juntamente com os valores das constantes cinéticas definidas no item 3.3. A tela de saída dos cálculos, Figura 42, apresenta as concentrações dos componentes na entrada do processo e nos biorreatores. Note que, na simulação, praticamente todo o ART do sistema é convertido em etanol, chegando mais próximo do valor zero que no experimental, isso porque parte do ART medido é não fermentável, tendo em vista que inclusive no fermento foram detectadas quantidades pequenas de ART.

Simulação de processo contínuos em estado estacionario

### Entrada de dados para simulação

**Parâmetros do modelo**

Ks  g/L      Pmax  g/L      Mimax  1/h  
 Ki  g/L      YN

**Dados operacionais**

Vazão de mosto  m3/h      Vol Reator 1  m3  
 Conc ART Mosto  g/L      Vol Reator 2  m3  
 Vazão de reciclo  m3/h      Vol Reator 3  m3  
 Conc Alcool Reciclo  g/L      Vol Reator 4  m3  
 Conc Cel Reciclo  g/L  
 Yx/s       Rend Destil.  %  
 Yp/s

Figura 41: Tela de entrada dos dados para a simulação em regime permanente da usina Clealco com os dados do ensaio de julho de 2002 em regime permanente.

Resultado da simulação de processo contínuo em est...

### Resultado da simulação

**Concentrações (g/L)**

	ART	Etanol	Celulas
entrada do processo	120,72	4,8353	42,727
biorreator 1	35,644	40,396	44,939
biorreator 2	10,2	51,032	45,601
biorreator 3	1,95	54,48	45,815
biorreator 4	0,35	55,149	45,857
Produção	1,1912E6	GL Vinho	6,9809
	R	0,36364	

Figura 42: Tela de saída da simulação em regime permanente, com dados do ensaio de julho de 2002 da usina Clealco.

A simulação feita com os dados do ensaio feito na Usina Alvorada em setembro de 2002, demonstrou que o volume total dos biorreatores utilizados é superior ao necessário, o que era de se esperar, tendo em vista que nas análises laboratoriais detectou-se que no

segundo biorreator a fermentação já estava praticamente encerrada. Uma simulação foi feita com os dados deste ensaio, porém com diminuição dos volumes dos dois últimos reatores, Figura 43, os resultados desta simulação, Figura 44, evidenciaram o hiperdimensionamento do equipamento utilizado. Com o volume dos biorreatores foi feita uma simulação que mostrou a possibilidade de produção do dobro de álcool, veja na Figura 45 que as vazões de mosto e fermento foram duplicadas e o volume dos biorreatores os utilizados no ensaio de setembro de 2002 na usina Alvorada e veja na Figura 48 os resultados de como poderia ter sido aumentada a produção. Note, ainda, que a usina Alvorada possui cinco biorreatores, sendo que neste caso o último reator seria dispensável.

**Simulação de processo contínuos em estado estacionario**

*Entrada de dados para simulação*

**Parâmetros do modelo**

Ks	3 g/L	Pmax	92 g/L	Mimax	0,5 1/h
Ki	27 g/L	YN	5,3		

**Dados operacionais**

Vazão de mosto	85 m3/h	Vol Reator 1	262,1 m3
Conc ART Mosto	183,173 g/L	Vol Reator 2	236,3 m3
Vazão de reciclo	65 m3/h	Vol Reator 3	100 m3
Conc Alcool Reciclo	11,585 g/L	Vol Reator 4	100 m3
Conc Cel Reciclo	115,89 g/L		
Yx/s	0,026	Rend Destil.	99,2 %
Yp/s	0,425		

Confirmar    Calcular    Sair

Figura 43: Tela de entrada dos dados para a simulação, em regime permanente, da usina Alvorada, com os dados do ensaio de setembro de 2002 porém com diminuição do volume dos biorreatores.

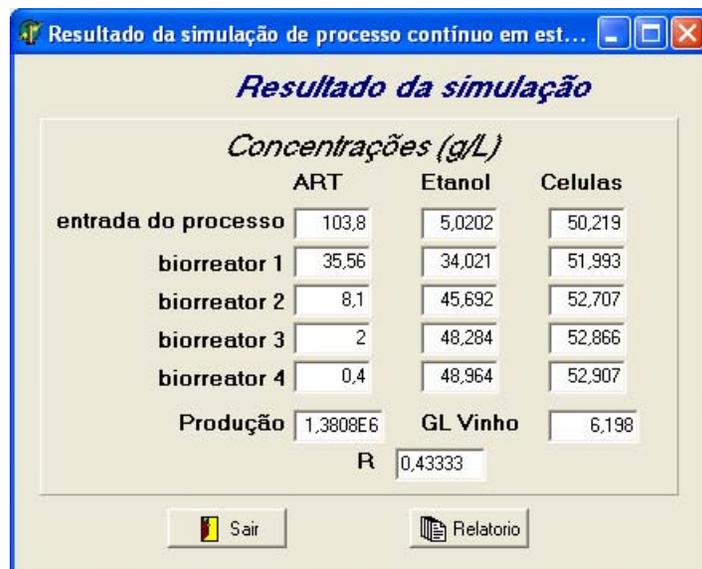


Figura 44: Tela de saída da simulação em regime permanente, com dados do ensaio de setembro de 2002 da usina Alvorada, porém com diminuição do volume dos biorreatores.

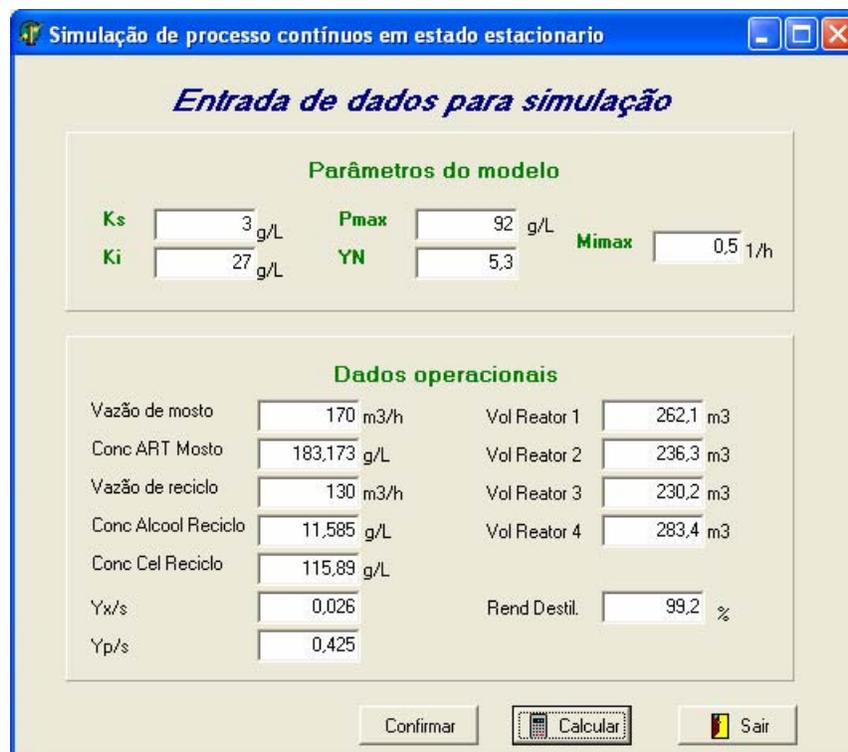
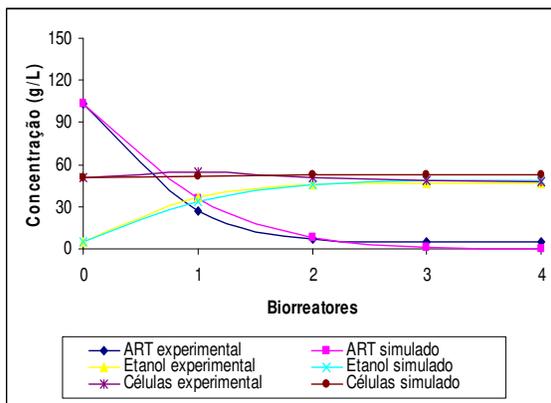


Figura 45: Tela de entrada dos dados para a simulação, em regime permanente, da usina Alvorada, com os dados do ensaio de setembro de 2002 e vazões de mosto e fermento duplicadas.

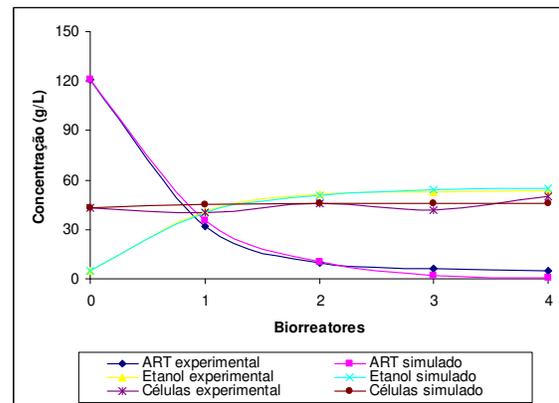


Figura 46: Tela de saída da simulação em regime permanente, com dados do ensaio de setembro de 2002 da usina Alvorada e vazões de mosto e fermento duplicadas.

As curvas obtidas experimentalmente à partir dos dados das análises dos ensaios na usina Alvorada em setembro de 2002 e na usina Clealco em julho de 2002 e pelo simulador para os quatro biorreatores são bastante semelhantes, como pode ser visto na Figura 47. Esta similaridade foi constatada em todos os testes comparativos entre dados experimentais e simulados.



(a)



(b)

Figura 47: Curvas dos componentes presentes nos biorreatores de dados experimentais e simulados: (a) Usina Alvorada, setembro de 2002, (b) Usina Clealco, julho de 2002.

### **3.4.2. Estado Transiente**

Com os resultados das análises laboratoriais, notou-se que o processo da usina de álcool é transiente, pôde-se perceber a não padronização do mosto de entrada no primeiro biorreator, constatada ao se fazer a análise de açúcares redutores totais nas amostras tiradas durante o ensaio industrial. Apesar do fluxo nos biorreatores estar constante e controlada pela malha de controle da usina, a concentração de substrato para a fermentação é todo o tempo variável.

A simulação do estado dinâmico inicialmente foi idealizada com o intuito de ser utilizada na usina de álcool somente nas horas iniciais de operação dos biorreatores, onde o estado estacionário ainda não fora atingido ou quando há modificação no fluxo de alimentação dos biorreatores. Mas como se sabe, o regime transiente do processo é mais comum na operação das usinas, fazendo com que esta etapa do trabalho tenha, então, uma aplicação mais ampla que a pensada originalmente. Nos ensaios o aumento da vazão após a coleta da hora 3 foi de 10% da vazão inicial, porém a oscilação do ART no mosto foi superior a 10%, não sendo possível avaliar esta modificação isoladamente.

A simulação em regime transiente necessita da entrada das constantes cinéticas, Figura 48, definidas no item 3.3. Uma simulação foi feita com os dados do ensaio de julho de 2002 na usina Clealco, os dados, colocado na tela apresentada na Figura 49, são a média das condições da usina nas três primeiras horas de coleta no ensaio industrial. A Figura 50 é da tela onde pode-se fazer a escolha da alteração que se deseja fazer no processo, neste caso foi feita na vazão de fermento, que foi modificada de  $40 \text{ m}^3/\text{h}$  para  $50 \text{ m}^3/\text{h}$ .

Simulação do Regime Transiente

Modelo Cinético: Tosetto (2002)

$$\mu_s = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{S}{\left(S + K_s + \frac{S^2}{K_i}\right)} \cdot \left(1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}}\right)^{Y_s}$$

Parâmetros Cinéticos

Mimax  Ki  YN   
 Ks  Pmax

Confirmar

Figura 48: Tela de entrada das constantes cinéticas para simulação em regime transiente.

Simulação do Regime Transiente

Condições Iniciais do Sistema

Vazão de Mosto  m3/h Yps   
 ART no mosto  g/L Volume do Reator1  m3  
 Vazão de Reciclo  m3/h Volume do Reator2  m3  
 Etanol no Reciclo  g/L Volume do Reator3  m3  
 Células no Reciclo  g/L Volume do Reator4  m3  
 Yxs

Confirmar

Figura 49: Tela de entrada das condições do processo em regime permanente anterior à modificação do sistema, da usina Clealco em julho de 2002.

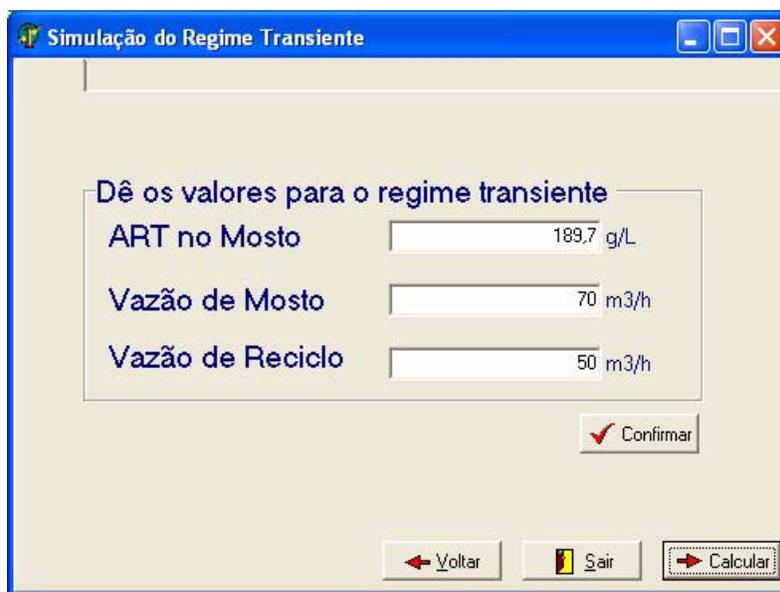


Figura 50: Tela de entrada de novos valores para condições operacionais do processo de fermentação alcoólica para uma usina em operação.

O resultado da simulação é o novo regime permanente a ser atingido com essa modificação, Figura 51, onde estão os valores dos componentes na entrada do processo e em cada um dos biorreatores, além do tempo necessário para atingir esse novo equilíbrio do processo fermentativo estabilização e o gráfico do comportamento da concentração de ART no primeiro reator durante o período de transiência do processo.

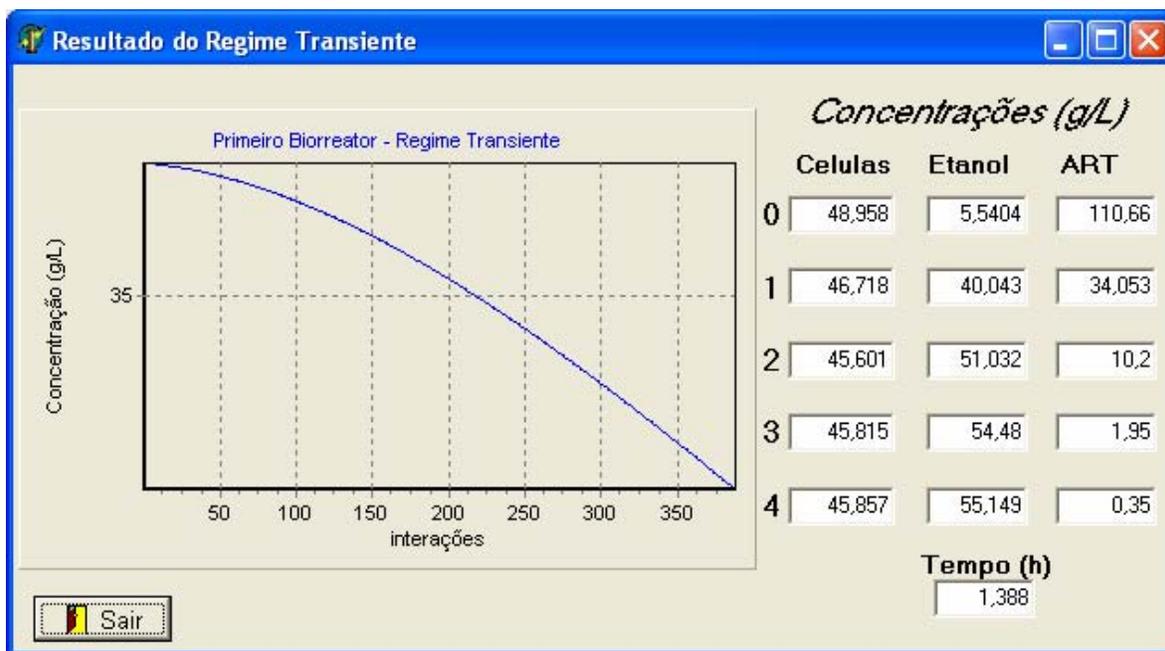


Figura 51: Tela de saída de dados da simulação do regime transiente.

A simulação mostra que para atingir um novo regime permanente seria necessária uma hora e vinte e três minutos e como era de se esperar, com o aumento da vazão de fermento sem modificação na vazão de mosto nem na concentração de ART, há uma diminuição da concentração de ART na entrada do primeiro biorreator, podendo ser observada essa diminuição no gráfico da Figura 51.

O hiperdimensionamento dos reatores da usina Alvorada verificados na simulação do regime permanente fez com que esta simulação utilizasse os dados do ensaio industrial de julho de 2002 na usina Alvorada porém com volumes de reatores reduzidos, como pode ser visto na Figura 52.

Condições Iniciais do Sistema	
Vazão de Mosto	106 m <sup>3</sup> /h
Y <sub>ps</sub>	0,374
ART no mosto	206,7 g/L
Volume do Reator1	140 m <sup>3</sup>
Vazão de Reciclo	85 m <sup>3</sup> /h
Volume do Reator2	120 m <sup>3</sup>
Etanol no Reciclo	19,401 g/L
Volume do Reator3	120 m <sup>3</sup>
Células no Reciclo	172,03 g/L
Volume do Reator4	120 m <sup>3</sup>
Y <sub>xs</sub>	0,026

Buttons: Voltar, Sair, Confirmar

Figura 52: Tela de entrada de dados do regime permanente anterior à modificação do sistema, com dados do ensaio da usina Alvorada de julho de 2002.

Nesta simulação, a alteração do processo foi feita no aumento da vazão de mosto no processo, como pode ser visto na Figura 53.



Figura 53: Tela de entrada de novos valores para condições operacionais do processo de fermentação alcoólica para uma usina em operação

O aumento da vazão de mosto faz com que haja um aumento da concentração de ART no sistema, como pode ser visto na Figura 54, e o tempo necessário para atingir o novo regime permanente nas condições desta simulação é de 1,456 horas.

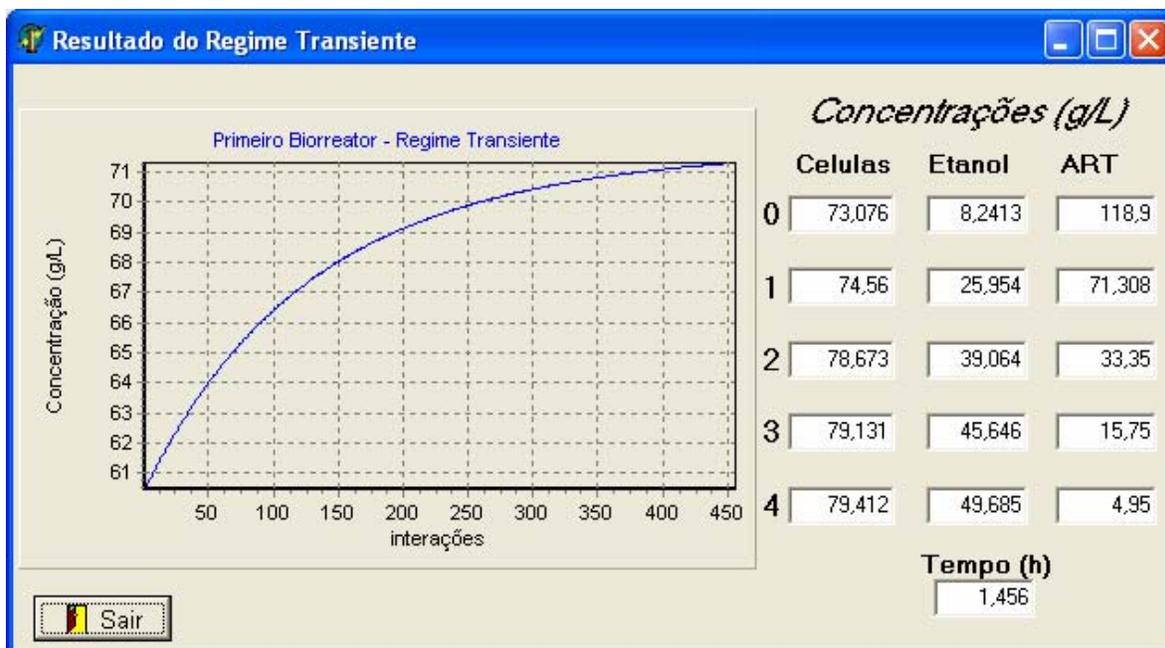


Figura 54: Tela de saída dos resultados da simulação.

Como foi dito anteriormente, as usinas estudadas neste trabalho não tem um controle da concentração de ART mosto, e como visto nestas simulações o tempo

necessário para atingir regime permanente é superior ao intervalo das coletas verificando que não há tempo suficiente para estabilização do sistema, sendo assim, as usinas não operaram em regime permanente em nenhum momento durante os ensaios industriais.

## 4- Conclusões

A cinética fermentativa das usinas Clealco e Alvorada foram descritas de forma satisfatória pelos modelos LEE; PAGAN; ROGERS (1983), LEVENSPIEL (1980) e TOSETTO (2002) que consideram limitação pelo substrato e inibição pelo produto. As inibições pelo substrato e pela massa celular podem ser desconsideradas das usinas em operação por não atingirem os valores de concentração nos quais influenciariam a cinética.

O processo fermentativo real possui uma variedade de cepas de leveduras que são características do ambiente da usina, contudo o modelo Tosetto (2002) é eficiente para descrever esta cinética com as constantes cinéticas de  $K_s$ , responsável pela limitação pelo substrato, 3,0 g/L. O fator de inibição pelo substrato  $K_i$ , 27 g/L, o valor de produto máximo  $P_{máx}$ , 92 g/L e  $Y_N$ , o fator potência de inibição pelo produto 5,3.

O programa desenvolvido para modelagem da usina em regime permanente não representa o caso real de operação dos biorreatores, porém tem sua aplicabilidade para dimensionamento de novas plantas.

A operação de um sistema fermentativo real acontece em regime transiente.

## Sugestões para Trabalhos Futuros

- Coletas em usinas em operação com um maior controle da concentração de ART no mosto.
- Análises laboratoriais das amostras separando a concentração de ART em concentração de sacarose, glicose e frutose e avaliação do modelo cinético misto, com mais de um substrato.
- Estudo mais detalhado do metabolismo da levedura para a compreensão do mecanismo de reação e das condições ótimas para desvio de rota com obtenção de diversos produtos tendo a cana de açúcar como matéria prima.
- Avaliação de modelos estruturados para descrição do processo.
- Implementação de programas para simulação de reatores com células imobilizadas.

## 5- Referências

1. AGUIRRE, Luis Antônio. Introdução à identificação de sistemas: técnicas lineares e não lineares a sistemas reais. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2004. 659p.
2. AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATANI, M. Kinetics of Product Inhibition in Alcohol Fermentation. Biotechnology and Bioengineering, New York, v.10, p.845-864, 1968.
3. ALTERTHUM, Flávio. Elementos de Microbiologia. In: Borzani, Walter et al. (Coord.). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. p. 1-32. (Biotecnologia Industrial; v.1)
4. ANDRIETTA, Sílvio Roberto. Otimização de Processos de Fermentação Alcoólica em Múltiplos Estágios. Stab: Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba, v.17, 1991.
5. ANDRIETTA, Sílvio Roberto. Modelagem, Simulação e Controle de Fermentação Alcoólica Contínua em Escala Industrial. 1994. 178p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
6. ANDRIETTA, S.R. Conceitos de processos de fermentação alcoólica contínua. In: Atualização Tecnológica na Indústria Sucroalcooleira: Apostila do curso. Piracicaba, 1997. CPQBA-UNICAMP/STAB, 12p.
7. ANDRIETTA, S.R.; MIGLIARI, P.C.; ANDRIETTA, M.G.S. Classificação das cepas de leveduras de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. Stab: Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba, v.17, nº5, p.54-59, 1999.
8. BAILEY, James E.; OLLIS, David F. Biochemical Engineering Fundamentals. New York: McGraw-Hill Book Company, 1986. 984p. (Second Edition)
9. BAJAY, Sérgio Valdir; FERREIRA, André Luis. A Energia da Biomassa no Brasil. In: Rosillo-Calle, Frank; Bajay, Sérgio V.; Rothman, Harry. (Org.). Uso da Biomassa para Produção de Energia na Indústria Brasileira. Campinas: Editora Unicamp, 2005. p.69-120.

10. BLONDIN, B.; VÉZINHET, F. Identification de souches de levures oenologiques par leurs caryotypes obtenus em électrophorèse en champ pulse. Revue Française d'Oenologie, v.28, p.7-11, 1988.
11. BORZANI, W. Fermentação Alcoólica Contínua. In: Semana da Fermentação Alcoólica, 1960, Piracicaba. Anais da Semana da Fermentação Alcoólica, Piracicaba, 1960, p.263-276.
12. CANTÙ, MARCO. Dominando o Delphi 7: A Bíblia. Tradução Kátia Aparecida Roque. São Paulo: Person Education do Brasil, 2003. 801p.
13. CASEY, G.P.; PRINGLE, A.T.; ERDMANN, P.A. Evaluation of recent techniques used to identify individual strains of *Saccharomyces* yeasts. American Society of Brewing Chemists, \_\_\_\_\_, v.48, n.3, p.100-106, 1990.
14. CARVALHO, Eduardo de. Potencial de Mercado para o Etanol. In: Seminário “Combustíveis, Lubrificantes e Aditivos”. Única: União da Agroindústria Canavieira de São Paulo, São Paulo, mar/2005.
15. CARVALHO, João Carlos Monteiro de; SATO, Sunao. Fermentação Descontínua. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher, 2001a. p. 193-204. (Biotecnologia Industrial; v.2)
16. CARVALHO, João Carlos Monteiro de; SATO, Sunao. Fermentação Descontínua Alimentada. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher, 2001b. p. 205-222. (Biotecnologia Industrial; v.2)
17. CASTRO, M.M.S. Leveduras contaminantes do processo de fermentação alcoólica: Diversidade Taxonômica e Metabólica. 1995. 124p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP
18. COBRA, Carlos. Álcool , combustível verde do presente e do futuro. In: MELLO, Marcello Guimarães (Org.). Biomassa: Energia dos Trópicos em Minas Gerais. Belo Horizonte: Labmídia, 2001. p.49-58.
19. CUNHA, M.C.C. Métodos Numéricos. Campinas: Editora Unicamp, 2003. 276p. (2ª edição).

20. CYSEWSKI, G.R.; WILKE, C.R. Process design and economic studies of alternative methods for the production of ethanol. Biotechnology and Bioengineering, New York, v.20, p.1421-1444, 1978.
21. DEIMLING, Lizete Cecília; BORILLI, Salete Polônia. Nível de Satisfação do Proprietário de Veículo Bicomustível no Município de Cascavel/PR: Uma Análise Exploratória. In: Shikida, Pery Francisco Assis; Staduto, Jefferson Andronio Ramundo (Org.). Agroindústria Canavieira no Paraná: Análises, Discussões e Tendências. Cascavel: Editora Coluna do Saber, 2005. p. 93-109.
22. DEGRÉ, R.; THOMAS, D.Y.; ASH, J.; MAILHIOT, M.; MORIN, A.; DUBORD, C. Wine yeasts strain identification. American Journal of Enology and Viticulture, Davis, v.40, n.4, p.309-315, 1989.
23. DOURADO, A.; GOMA, G.; ALBUQUERQUE, U.; SEVELY, Y. Modeling and Statistic Optimization of the Ethanol Production in a Cascade Reactor I. Modeling. Biotechnology and Bioengineering, New York, v.29, n.2, p. 187-194, 1987.
24. DUNN, I.J.; MOR J.R. Variable-Volume Continuous Cultivation. Biotechnology and Bioengineering, New York, v.17, p.1805-1822, 1975.
25. EDUARDO, J.H.P. Fermentação Contínua. Stab: Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba, v.9, nº.4/5, p.42-45, mar-jun 1991.
26. FACCIOITI, Maria Cândida Reginato. Fermentação Contínua. In: Schmidell et al. (Coord.). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. p. 223-246. (Biotecnologia Industrial; v.2)
27. FREIZER, V.; DUBOURDIEU, D. Ecology of yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation in a Bordeaux winery. American Journal of Enology and Viticulture, Davis, v.43, n.4, p.375-380, 1992.
28. 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, New York, v.21, p.1401-1420, 1979.
29. HALL, David.O.; HOUSE, Jo I.; SCRASE Ivan. Visão Geral de Energia e Biomassa. In: Rosillo-Calle, Frank; Bajay, Sérgio V.; Rothman, Harry. (Org.). Uso da Biomassa para

- Produção de Energia na Indústria Brasileira. Campinas: Editora Unicamp, 2005. p.25-67.
30. HAN, K.; LEVENSPIEL, O. Extend Monod Kinetics for Substrate, Product, and Cell Inhibition. Biotechnology and Bioengineering, New York, v.32, p.430-437, 1988.
31. LEE, J.H.; PAGAN, R.J.; ROGERS, P.L. Continuous simultaneous saccharification and fermentation of starch using *Zimomonas mobilis*. Biotechnology and Bioengineering, New York, v.25, p.659-669, 1983.
32. LEVENSPIEL, O. The Monod Equation. A Revisit and a Generalization to Product Inhibition Situation. Biotechnology and Bioengineering, New York, v.22, p.1671-1687, 1980.
33. LEWIS, M.J.; YOUNG, T.W. Brewing. Chapman & Hall, 1998. \_\_\_\_ p. (capítulo 13, p.191-210).
34. LIMA, L.R.; MARCONDES, A.A. Álcool Carburante: Uma Estratégia Brasileira. Curitiba: Editora UFPR, 2002. 248p.
35. LIMA, Urgel de Almeida; BASSO, Luiz Carlos; AMORIM, Henrique Vianna de. In: LIMA, Urgel de Almeida (Coord.). Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p.1-43. (Biotecnologia Industrial; v.3)
36. LUONG, J.H.T. Kinetics of Ethanol Inhibition in Alcohol Fermentation. Biotechnology and Bioengineering, New York, v.27, p.280-285, 1985.
37. MACEDO, Isaías de Carvalho; CORTEZ, Luís A.B. O processamento Industrial da Cana-se-Açúcar no Brasil. In: Rosillo-Calle, Frank; Bajay, Sérgio V.; Rothman, Harry. (Org.). Uso da Biomassa para Produção de Energia na Indústria Brasileira. Campinas: Editora Unicamp, 2005. p.247-268.
38. MANI, K.; DLAUCHI, D.; DEÁK, T. A comparative study of karyotyping, RAPD-PCR and nDNA/nDNA homology methods for identification of yeasts isolated from Indian beverages. Acta Alimentaria, \_\_\_\_\_, v.27, n.1, p.43-52, 1998.
39. MEADEN, P. DNA fingerprinting of brewers' yeast: current perspectives. Journal of the Institute of Brewing, \_\_\_\_\_, v.96, p.195-200, 1990.

40. MILLER, Gail Lorenz. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry. Washington, v.31, n.3, p.426-428, 1959.
41. NESS, F; LAVALLÉE, F.; DUBOURDIEU, D.; AIGLE, M. DULAU, L. Identification of yeast strain using the polymerase chain reaction. Journal of Science Food Agriculture, \_\_\_\_\_, v.62, p.89-94, 1993.
42. OMMETTO, João Guilherme Sabino. Protocolo de Quioto e Mecanismo de Desenvolvimento Limpo. In: MELLO, Marcello Guimarães (Org.). Biomassa: Energia dos Trópicos em Minas Gerais. Belo Horizonte: Labmídia, 2001. p.262-268.
43. O'NEIL, D.G.; LYBERATOS, G. Dynamic Model Development for a Continuous Culture of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering. New York, v.36, p.437-445, 1990.
44. O SUCESSO da tecnologia Flex Fuel brasileira. Revista CREA-SP, São Paulo, v.19, p.18-20, mar-abr 2005.
45. QUEROL, A.; BARRIO, E.; RAMÓN, D. Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. International Journal of Food Microbiology, \_\_\_\_\_, v.21, p.315-323, 1994.
46. SALIK, F.L.M.; POVH, N.P. Método electrofotométrico para determinação de teores alcoólicos em mistura hidroalcoólica. Anais do 5º Congresso Nacional da Stab, Águas de São Pedro, p.262-263, 1993.
47. SILVA, E.R.; SILVA, R.R.H. O Universo da Ciência: Álcool e Gasolina. São Paulo: Editora Scipione, 1997. 72p. (5ª edição, 2ª impressão).
48. SCHMIDELL, Willibaldo; FACCIOTTI, Maria Cândida Reginato. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. p. 179-192. (Biotechnology Industrial; v.2)
49. STECKELBERG, Cláudia. Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas. 2001. 215p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

50. STREMEL, Dile Pontarolo. Desenvolvimento de Modelos Estruturados Alternativos para o Processo de Produção de Etanol. 2001. 283 Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
51. STROPPOA, Cibele Tosin. Dinâmica Populacional de Leveduras Caracterizadas por Eletro-cariótipo e Desempenho Fermentativo em Processos de Fermentação Alcoólica. 2002. 133 Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
52. THATIPALAMA, R.; ROHANI, S.; HILL, G.A. Effects of High Product and Substrate Inhibitions on the Kinetics and Biomass and Product Yields During Ethanol Batch Fermentation. Biotechnology and Bioengineering, New York, v.40, p.289-297, 1992.
53. TORIJA, M.J.; ROZÈS, N.; POBLET, M.; GUILLAMÓN, J.M. MAS, A. Effects of Fermentation Temperature on the Strain Population of *Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Food Microbiology, \_\_\_\_\_v.80, p.47,53, 2003.
54. TOSETTO, Gisele Mantei. Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de Etanol. 2002. 82p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
55. VIEGAS, Marcelo C. Otimização de Sistema de Fermentação Alcoólica Contínua Utilizando Reatores Tipo Torre e Leveduras com Características Flocculantes. 2003. 135p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.
56. ZANIN, G.M.; SANTANA, C.C.; BON, E.P.S.; GIORDANO, R.C.L.; MORAES, F.F.; ANDRIETTA, S.R.; CARVALHO NETO, C.C.; MACEDO, I.C.; LAHR, F.O.D.; RAMOS, L.P. Brazilian Bioethanol Program, Applied Biochemistry and Biotechnology, \_\_\_\_\_ v. 84-86, p.1147-1161, 2000.
57. ZARPELON, FLORENAL; ANDRIETTA, SÍLVIO R. Fermentação Contínua para Produção de Alcool, STAB – Açúcar, Alcool e Subprodutos. Piracicaba, p.23-28, mar-abr 1992.

## 6- Apêndices

Apêndice 1 – Etapas da programação para ajuste de parâmetros do modelo Tosetto (2002)

A apresentação somente da implementação do modelo Tosetto(2002) foi feita porque a metodologia é a mesma para os modelos, diferenciando somente na fórmula da velocidade de reação ( $\mu$ ) e nas constantes cinéticas do modelo escolhido.

```
procedure TF_LabCont.Bt_CalcularClick(Sender: TObject);
Type
VVector=array[0..7] of real;
Var
XO, SO, PO, KS, MIMAX, PMAX, YN, KI, KSI, KII, INCRKI, INCRKS, INCRPMAX, INCRYN, KSF, PMAXI,
PMAXF, YNI, YNF, X, P, Temp, S, TINCR, SAnt, PAnt, XAnt, YXS, YPS, KSD, PMAXD, YND, KID, DESVIO,
DESVIOT, DESVIOP, FW, FR, XMAX, YM, KP, K1, K2, XMAXI, XMAXF, INCRXMAX, YMI, YMF, INCRYM,
KPI, KPF, INCRKP, KII, KIF, INCRK1, K2I, K2F, INCRK2, F, PR, XR, KIF, SOC, PRC, XRC, SC, PC, XC, DIF
:Real;
I, J, K, N :Integer;
XV, SV, PV, VE, SE, XE, PE, MI, TAL, T, D: VVector;

Label Inicio,Inicio1,Inicio2,Inicio3,Inicio4,Inicio5;

begin
// Entrada de dados
N := F_DM.T_OpCont1N_REATOR.Value;           //número de reatores
F := F_DM.T_OpCont1V_MO.Value*1000;          //vazão de mosto
FR := F_DM.T_OpCont1V_RE.Value*1000;         //vazão de reciclo
FW := F + FR;                                //vazão total de entrada no sistema
PR := F_DM.T_OpCont1P_RE.Value;              //concentração de etanol no reciclo
XR := F_DM.T_OpCont1X_RE.Value;              //concentração celular no reciclo
SO := F_DM.T_OpCont1ART_MO.Value;            //concentração de açúcares redutores totais no mosto
MIMAX := F_DM.T_OpCont1MI_MAX.value;         //velocidade máxima de reação ( $\mu_{max}$ )
INCRKS := F_DM.T_OpCont1INCRKS.value;        //incremento: Ks (limitação pelo substrato)
INCRPMAX := F_DM.T_OpCont1INCRPMAX.value;    // Pmax (concentração máxima de etanol)
INCRYN := F_DM.T_OpCont1INCRYN.value;        // Yn (fator potência de inibição pelo produto)
INCRKI := F_DM.T_OpCont1INCRKI.value;        // Ki (inibição pelo substrato)
KSI := F_DM.T_OpCont1KSI.value;              //valor inicial: Ks
KSF := F_DM.T_OpCont1KSF.value;              //valor final: Ks
PMAXI := F_DM.T_OpCont1PMAXI.value;          //valor inicial: Pmax
```

```

PMAXF := F_DM.T_OpCont1PMAXF.value;           //valor final: Pmax
YNI := F_DM.T_OpCont1YNI.value;                //valor inicial: Yn
YNF := F_DM.T_OpCont1YNF.value;                //valor final: Yn
KII := F_DM.T_OpCont1KII.value;                //valor inicial: Ki
KIF := F_DM.T_OpCont1KIF.value;                //valor final: Ki
YXS := F_DM.T_OpCont1YXS.value;                //rendimento de célula por substrato
YPS := F_DM.T_OpCont1YPS.value;                //rendimento de produto por substrato
F_DM.T_Parametro.Open;                          //ABRE TABELA PARA ATRIBUIR VALORES
KII := F_DM.T_OpCont1KII.value;
KIF := F_DM.T_OpCont1KIF.value;
K2I := F_DM.T_OpCont1K2I.value;
K2F := F_DM.T_OpCont1K2F.value;
YMI := F_DM.T_OpCont1YMI.value;
YMF := F_DM.T_OpCont1YMF.value;
KPI := F_DM.T_OpCont1KPI.value;
KPF := F_DM.T_OpCont1KPF.value;
XMAXI := F_DM.T_OpCont1XMAXI.value;
XMAXF := F_DM.T_OpCont1XMAXF.value;
INCRK1 := F_DM.T_OpCont1INCRK1.value;
INCRK2 := F_DM.T_OpCont1INCRK2.value;
INCRXMAX := F_DM.T_OpCont1INCRXMAX.value;
INCRYM := F_DM.T_OpCont1INCRYM.value;
INCRKP := F_DM.T_OpCont1INCRKP.value;

F_DM.T_Parametro.Edit;
F_DM.T_ParametroDesvioP.Value := 100000;
F_DM.T_Parametro.Post;

// Inicialização das variáveis

SV[0] := F*SO/FW;
PV[0] := FR*PR/FW;
XV[0] := FR*XR/FW;
SE[0] := SV[0];
PE[0] := PV[0];
XE[0] := XV[0];

//Dados Experimentais
F_DM.T_Reator.Open;
F_DM.T_Reator.First;

```

```

For I := 1 to N do                                     //contador do biorreator
  Begin
    F_DM.T_Reator.Edit;                               //EDITA TABELA COM DADOS DOS BIORREADORES
    SE[I] := F_DM.T_ReatorS.value ;                  //concentração de entrada de substrato no biorreator i
    PE[I] := F_DM.T_ReatorP.value ;                  //concentração de entrada de produto no reator i
    XE[I] := F_DM.T_ReatorX.value ;                  //concentração de entrada de células no reator i
    VE[I] := F_DM.T_ReatorV.value*1000;              //volume do biorreator e a conversão de m3 para L
    F_DM.T_Reator.Next;
  End;

If F_DM.T_ModelosModeloEscolhido.Value = 'TOSETTO' Then //MODELO TOSETTO (2002)
begin
  KS := KSI;                                         //atribui o valor inicial de Ks à variável

  While KS <= KSF do
  Begin
    KI := KII;                                       //atribui o valor inicial de Ki à variável

    While KI <= KIF do
    Begin
      PMAX := PMAXI;                                //atribui o valor inicial de Pmax à variável

      While PMAX <= PMAXF do
      Begin
        YN := YNI;                                   //atribui o valor inicial de Yn à variável

        While YN <= YNF do
        Begin
          SV[1] := 0;                                 //inicializa o vetor concentração de substrato com o valor 0
          SV[2] := 0;
          SV[3] := 0;
          SV[4] := 0;
          SV[5] := 0;
          SV[6] := 0;
          For I := 1 to N do
            Begin
              Inicio:
                SV[I] := SV[I] + 0.1;                 //acrescenta 0,1g/L na concentração de substrato
                TAL[I] := VE[I]/FW;                   //calcula o tempo de residência  $\tau = \frac{Volume}{vazão}$ 
                PV[I] := YPS * (SV[I-1] - SV[I]) + PV[I-1]; //calcula a concentração de produto
            End;
          End;
        End;
      End;
    End;
  End;
end;

```

```

XV[I] := YXS * (SV[I-1] - SV[I]) + XV[I-1];      //calcula a concentração de células
//Calcula a velocidade de reação do biorreator para as concentrações obtidas
MI[I] := MIMAX*((SV[I]/(KS + SV[I] + (SV[I] * SV[I] / KI)))*(EXP(YN*LN(1-(PV[I]/PMAX)))));
D[I] := (XV[I] * MI[I])/(XV[I] - XV[I-1]);
//Calcula o tempo de residência hidráulico
T[I] := 1/D[I];
DIF := ABS(T[I] - TAL[I]);                       //compara o tempo de residência com o tempo ( $\tau$ ) com o
tempo                                           //de residência hidráulico (T)

If DIF >= 0.1 Then GOTO Inicio;                 //se os tempos de residência tiverem diferença inferior a 0,1
                                                //aceita-se os valores calculados como os finais das variáveis,
                                                //senão retorna para recalcular

End; // end do For

with F_DM.T_CalcCont do
begin
Active := False;
DatabaseName := 'Continuo';
TableName := 'T_CalcCont';
EmptyTable;
end;

F_DM.T_CalcCont.Open;
F_DM.T_CalcCont.First;

For k := 0 to N do
Begin
F_DM.T_CalcCont.Append;
F_DM.T_CalcContN_RE.Value := K;
F_DM.T_CalcContS.Value := SV[k];
F_DM.T_CalcContP.Value := PV[k];
F_DM.T_CalcContX.Value := XV[k];
End;

//
Desvio := 0;
DesvioT := 0;

For k:= 0 to N do
Begin
Desvio := ((SV[k] - SE[k])*(SV[k] - SE[k]));
DesvioT := DesvioT + Desvio;

```

```

end;

If F_DM.T_ParametroDesvioP.Value >= DesvioT then
  Begin
    F_DM.T_Parametro.open;
    F_DM.T_Parametro.First;
    F_DM.T_Parametro.edit;
    F_DM.T_ParametroDesvioP.Value := DesvioT;
    F_DM.T_ParametroYN.Value := YN;
    F_DM.T_ParametroPMAx.Value := PMAx;
    F_DM.T_ParametroKS.Value := KS;
    F_DM.T_ParametroKI.Value := KI;
    F_DM.T_Parametro.Post;

with F_DM.T_ResCont do
begin
Active := False;
DatabaseName := 'Continuo';
TableName := 'T_ResCont';
EmptyTable;
end;

F_DM.T_ResCont.Open;
F_DM.T_ResCont.First;

For k := 0 to N do
  Begin
    F_DM.T_ResCont.Append;
    F_DM.T_ResContN_RE.Value := K;
    F_DM.T_ResContS.Value := SV[k];
    F_DM.T_ResContP.Value := PV[k];
    F_DM.T_ResContX.Value := XV[k];
  End;
end;
YN := YN + INCRYN;
End; // Fim do YN
PMAx := PMAx + INCRPMAx;
End; // Fim do PMAx
KI := KI + INCRKI;
End; // Fim do KI
KS := KS + INCRKS;

```

```
End; // Fim do Ks

Close;
F_ResCont1:=TF_ResCont1.Create(self);           //Cria a tela de resultados das constantes cinéticas calculadas
F_ResCont1.ShowModal;                           //Mostra a tela de resultados
F_ResCont1.Free;
End; // Toretto
```

## Apêndice 2 – Etapas da programação para simulação do processo em regime permanente

```
begin
// Entrada de dados
// Volume
VV[1] := F_DM.T_EDSCEVR1.Value*1000;           //Volume dos reatores convertidos
VV[2] := F_DM.T_EDSCEVR2.Value*1000;           //para L
VV[3] := F_DM.T_EDSCEVR3.Value*1000;
VV[4] := F_DM.T_EDSCEVR4.Value*1000;

F_DM.T_RSCE.Edit;
F_DM.T_EDSCE.Edit;
N := 4;

SV[1] := 0;
SV[2] := 0;
SV[3] := 0;
SV[4] := 0;

//Busca dados das tabelas
F:=F_DM.T_EDSCEF.Value*1000;                   //Vazão de mosto convertida para L/h
FR:=F_DM.T_EDSCEFR.Value*1000;                //Vazão de reciclo convertida para L/h
PR:=F_DM.T_EDSCEPR.Value;
ARTMosto:=F_DM.T_EDSCEARTMosto.Value;
XR:=F_DM.T_EDSCEXR.Value;

FW:=F+FR;                                       //Vazão total
F_DM.T_RSCEF.Value := FW;
R:=FR/FW;
F_DM.T_RSCE.Value := R;                         //Taxa de reciclo
FVT := FW * (1 - (R/2));
PV[0] := (FR * PR)/FW;
SV[0] := (F * ARTMosto)/FW;
XV[0] := (FR * XR)/FW;

F_DM.T_RSCE.SO.Value := SV[0] ;
F_DM.T_RSCE.PO.Value := PV[0] ;
F_DM.T_RSCE.XO.Value := XV[0] ;
SV[1]:=SV[0]/5;
```

```

For I := 1 to N do
  Begin
  Inicio:

  SV[I] := SV[I] + 0.05;
  TAL[I] := VV[I]/FW;
  PV[I] := F_DM.T_EDSCEYPS.Value * (SV[I-1] - SV[I]) + PV[I-1];
  XV[I] := F_DM.T_EDSCEYXS.Value * (SV[I-1] - SV[I]) + XV[I-1];
  MI[I] := F_DM.T_EDSCEMIMAX.Value*((SV[I]/(F_DM.T_EDSCEKS.Value + SV[I] + (SV[I] * SV[I] /
F_DM.T_EDSCEKI.Value)))*(EXP(F_DM.T_EDSCEYN.Value*LN(1-(PV[I]/F_DM.T_EDSCEPMAX.Value)))));
  D[I] := (XV[I] * MI[I])/(XV[I] - XV[I-1]);
  T[I] := 1/D[I];
  DIF := ABS(T[I] - TAL[I]);

  If DIF >= 0.15 Then GOTO Inicio;
End; // end do For

F_DM.T_RSCE.Open;
F_DM.T_RSCE.First;
F_DM.T_RSCE.Edit;
F_DM.T_RSCE.S1.Value := SV[1] ;
F_DM.T_RSCE.P1.Value := PV[1] ;
F_DM.T_RSCE.X1.Value := XV[1] ;
F_DM.T_RSCE.S2.Value := SV[2] ;
F_DM.T_RSCE.P2.Value := PV[2] ;
F_DM.T_RSCE.X2.Value := XV[2] ;
F_DM.T_RSCE.S3.Value := SV[3] ;
F_DM.T_RSCE.P3.Value := PV[3] ;
F_DM.T_RSCE.X3.Value := XV[3] ;
F_DM.T_RSCE.S4.Value := SV[4] ;
F_DM.T_RSCE.P4.Value := PV[4] ;
F_DM.T_RSCE.X4.Value := XV[4] ;

F_DM.T_RSCE.PD.Value := FVT * 24 * (F_DM.T_RSCE.P4.Value/100);
F_DM.T_RSCE.PV.Value := F_DM.T_RSCE.P4.Value/7.9;
F_DM.T_RSCE.Post;

F_RSCE:=TF_RSCE.Create(self);
F_RSCE.ShowModal;
F_RSCE.Free;
end;

```

### Apêndice 3 - Etapas da programação para simulação do processo em regime transiente

Para iniciar esta etapa de regime transiente há a necessidade de uma programação anterior que inicializa os vetores com valores do regime permanente anterior à modificação do sistema.

```
//Inicia a programação do regime transiente

V[1] := F_DMTrans.T_DadosOpVReator1.Value;           //volume desejado para o reator 1
V[2] := F_DMTrans.T_DadosOpVReator2.Value;           // volume desejado para o reator 2
V[3] := F_DMTrans.T_DadosOpVReator3.Value;           // volume desejado para o reator 3
V[4] := F_DMTrans.T_DadosOpVReator4.Value;           // volume desejado para o reator 4
VV[1]:=V[1];
VV[2]:=V[2];
VV[3]:=V[3];
VV[4]:=V[4];

M:= 500;                                           //número máximo de iterações possíveis

// Valores atribuídos
MIM:=F_DMTrans.T_TosettoMimax.Value;               //μmáx
Ks:=F_DMTrans.T_TosettoKs.Value;                   //Ks
Ki:=F_DMTrans.T_TosettoKi.Value;                   //Ki
PMAX:=F_DMTrans.T_TosettoPmax.Value;                //Pmax
YN:=F_DMTrans.T_TosettoYN.Value;                   //YN

YXS:=F_DMTrans.T_DadosOpYxs.Value;                 //YX/S
YPS:=F_DMTrans.T_DadosOpYps.Value;                 //YP/S
FMO:=F_DMTrans.T_DadosOpFMosto.Value;              //Vazão de mosto inicial
FMF:=F_DMTrans.T_FinalFMosto.Value;                //Vazão de mosto final
FRO:=F_DMTrans.T_DadosOpFRreciclo.Value;           //Vazão de reciclo inicial
FRF:=F_DMTrans.T_FinalFRreciclo.Value;             //Vazão de reciclo final
ART:=F_DMTrans.T_FinalART.Value*(FMF/(FMF+FRF));   //concentração de ART na entrada
Cel:=F_DMTrans.T_DadosOpConcCelRec.Value*(FRF/(FMF+FRF)); //concentração de células na entrada
Prod:=F_DMTrans.T_DadosOpConcEtRec.Value*(FRF/(FMF+FRF)); //concentração de etanol na entrada

tempo:=0;

H:=0.001;                                           //passo de integração
tol:=0.1;                                           //tolerância para a derivada
```

```

//Quando altera a vazão
SE[1]:=ART;
PE[1]:=Prod;
XE[1]:=Cel;
S[1]:= F_DMTrans.T_IntermediariaS1.Value;           //a conc de ART do reator 1 regime permanente
P[1]:= F_DMTrans.T_IntermediariaP1.Value;           //a conc de etanol do reator 1 regime permanente
X[1]:= F_DMTrans.T_IntermediariaX1.Value;           //a conc de células do reator 1 regime permanente
S[2]:= F_DMTrans.T_IntermediariaS2.Value;           //a conc de ART do reator 2 regime permanente
P[2]:= F_DMTrans.T_IntermediariaP2.Value;           //a conc de etanol do reator 2 regime permanente
X[2]:= F_DMTrans.T_IntermediariaX2.Value;           //a conc de células do reator 2 regime permanente
S[3]:= F_DMTrans.T_IntermediariaS3.Value;           //a conc de ART do reator 3 regime permanente
P[3]:= F_DMTrans.T_IntermediariaP3.Value;           //a conc de etanol do reator 3 regime permanente
X[3]:= F_DMTrans.T_IntermediariaV3.Value;           //a conc de células do reator 3 regime permanente
S[4]:= F_DMTrans.T_IntermediariaS4.Value;           //a conc de ART do reator 4 regime permanente
P[4]:= F_DMTrans.T_IntermediariaP4.Value;           //a conc de etanol do reator 4 regime permanente
X[4]:= F_DMTrans.T_IntermediariaV4.Value;           //a conc de células do reator 4 regime permanente

i:=2;

while i<5 do                                         //a entrada do reator é a saída do anterior
begin
  SE[i]:= S[i-1];                                   //vetor SE é o de entrada enquanto o S saída de
substrato
  PE[i]:= P[i-1];                                   //vetor PE é o de entrada enquanto o P saída de
produto
  XE[i]:= X[i-1];                                   //vetor XE é o de entrada enquanto o X saída de
células
  i:=i+1;
end;// do while

For L:=1 to M do                                     //tempo i enquanto não atingiu regime permanente
Begin
  For LX:=1 to N do                                  //biorreatores LX=1..4
  Begin
    FF:=FMF+FRF;                                     //Vazão redefinida para o regime transiente
    FO:=FF;                                           //Vazão modificada por controle
    If DIF >= 0.1 then
    Begin
      For K:=1 to 4 do //K do modelo Runge-Kutta de quarta ordem
      Begin

```

```

GP:=ln(exp(1-(P[LX]/PMAx)*YN));
GS:=S[LX]/(Ks+S[LX]+(S[LX]*S[LX]/Ki));

//Equações diferenciais por balanço de massa
EQ1[K]:=0;
EQ2[K]:=FO*SE[LX]-FF*S[LX]-V[LX]*(MIM/YXS)*X[LX]*(GP*GS);
EQ3[K]:=FO*XE[LX]-FF*X[LX]+V[LX]*MIM*X[LX]*(GP*GS);
EQ4[K]:=FO*PE[LX]-FF*P[LX]+V[LX]*(YPS/YXS)*MIM*X[LX]*(GP*GS);

If (K=4) then
begin
  TAL[LX] := VV[LX]/FF;
  VV[LX]:=VV[LX]+H/6*(EQ1[1]+2*(EQ1[2]+EQ1[3])+EQ1[4]);
  SV[LX]:=SV[LX]+H/6*(EQ2[1]+2*(EQ2[2]+EQ2[3])+EQ2[4]);
  XV[LX]:=XV[LX]+H/6*(EQ3[1]+2*(EQ3[2]+EQ3[3])+EQ3[4]);
  PV[LX]:=PV[LX]+H/6*(EQ4[1]+2*(EQ4[2]+EQ4[3])+EQ4[4]);
  MI[LX] :=MIM*((SV[LX]/(Ks + SV[LX] + (SV[LX] * SV[LX] / Ki)))*(EXP(YN*LN(1-(PV[LX]/PMAx)))));

  D[LX] := (XV[LX] * MI[LX])/(XV[LX] - XV[LX-1]);
  T[LX] := 1/D[LX];
  DIF := ABS(T[LX] - TAL[LX]);
end;//end do if

If K<3 then                                     //preparo para aplicar o Runge-Kutta
  E:=1
else
  E:=2;

VV[LX]:=VV[LX]+EQ1[K]*H*(E/2);
SV[LX]:=SV[LX]+EQ2[K]*H*(E/2);
XV[LX]:=XV[LX]+EQ3[K]*H*(E/2);
PV[LX]:=PV[LX]+EQ4[K]*H*(E/2);

V[LX]:=VV[LX];
S[LX]:=SV[LX]/V[LX];
X[LX]:=XV[LX]/V[LX];
P[LX]:=PV[LX]/V[LX];

tempo:=tempo+H;
//volta a saída do reator LX pra entrada do LX+1
If (Abs(SV[1])<tol) then

```

```

begin
  F_DMTrans.T_ResultTransTempo.Value:=tempo;
  F_DMTrans.T_ResultTrans.Post;
end;

If (P[LX]>PMAX) then
begin
  P[LX]:=PMAX-0.1;
  If (S[LX]<0) then
    S[LX]:=0.01;
  end;
end;
//dos Ks de Runge-Kutta
SE[LX]:=S[LX];
PE[LX]:=P[LX];
XE[LX]:=X[LX];
end; //do if
end; // dos reatores
end; // do tempo (M)

F_DMTrans.T_ResultTrans.Insert;
F_DMTrans.T_ResultTransS1.Value := S[1] ;
F_DMTrans.T_ResultTransP1.Value := P[1] ;
F_DMTrans.T_ResultTransX1.Value := X[1] ;
F_DMTrans.T_ResultTransV1.Value := V[1] ;
F_DMTrans.T_ResultTransS2.Value := S[2] ;
F_DMTrans.T_ResultTransP2.Value := P[2] ;
F_DMTrans.T_ResultTransX2.Value := X[2] ;
F_DMTrans.T_ResultTransV2.Value := V[2] ;
F_DMTrans.T_ResultTransS3.Value := S[3] ;
F_DMTrans.T_ResultTransP3.Value := P[3] ;
F_DMTrans.T_ResultTransX3.Value := X[3] ;
F_DMTrans.T_ResultTransV3.Value := V[3] ;
F_DMTrans.T_ResultTransS4.Value := S[4] ;
F_DMTrans.T_ResultTransP4.Value := P[4] ;
F_DMTrans.T_ResultTransX4.Value := X[4] ;
F_DMTrans.T_ResultTransV4.Value := V[4] ;
F_DMTrans.T_ResultTransTempo.Value:= M ;

F_DMTrans.T_ResultTrans.Post;
F_ResultTrans.ShowModal;
F_ResultTrans.Free;

```

```
F_DMTrans.T_ResultTrans.Close;  
end; // do segundo case (última tabsheet do control)  
  
end; // do case  
  
end; // do método do botão
```

Apêndice 4 – Tabelas das análises laboratoriais das coletas feitas nas usinas Alvorada e Clealco no período de safra de 2002

Os dados apresentados a seguir estão em unidades do sistema internacional e no sistema de unidade mais comum nas usinas de produção de álcool combustível. e a numeração dos reatores é feito da forma Reator X-Y, onde o X é o número do reator e Y a hora em que a amostra foi retirada no ensaio industrial.

Tabela 14: Análises laboratoriais das amostras coletadas na Usina Alvorada em julho de 2002

	ART(%)	ART(g/L)	Células(%)	Celulas(g/L)	Etanol(°GL)	Etanol(g/L)
Reator 1-1	4,680	49,140	28,530	85,590	3,674	29,022
Reator 1-2	5,691	59,756	26,820	80,460	3,008	23,760
Reator 1-3	7,352	77,196	23,510	70,530	2,737	21,625
Reator 2-1	1,901	19,961	31,020	93,060	4,361	34,453
Reator 2-2	1,169	12,275	26,050	78,150	3,813	30,119
Reator 2-3	1,660	17,430	29,980	89,940	3,097	24,466
Reator 3-1	1,420	14,910	19,860	59,580	5,701	45,035
Reator 3-2	1,384	14,532	20,690	62,070	4,894	38,666
Reator 3-3	1,276	13,398	19,980	59,940	3,881	30,659
Reator 4-1	0,834	8,757	21,460	64,380	8,091	63,923
Reator 4-2	0,897	9,419	20,380	61,140	6,834	53,987
Reator 4-3	0,762	8,001	22,460	67,380	5,387	42,557
Reator 5-1	0,609	6,395	21,270	63,810	11,845	93,577
Reator 5-2	0,690	7,245	20,230	60,690	9,894	78,162
Reator 5-3	0,654	6,867	20,500	61,500	7,730	61,069
Mosto 1-1	19,011	199,616	56,410	169,230	0,000	0,000
Mosto 1-2	18,914	198,597	57,870	173,610	0,000	0,000
Mosto 1-3	21,128	221,844	57,750	173,250	0,000	0,000
Fermento 1-1	0,000	0,000	0,000	0,000	2,961	23,394
Fermento 1-2	0,000	0,000	0,000	0,000	2,473	19,541
Fermento 1-3	0,000	0,000	0,000	0,000	1,933	15,267

Tabela 15: Análises laboratoriais das amostras coletadas na Usina Alvorada em agosto de 2002

	ART(%)	ART(g/L)	Células(%)	Celulas(g/L)	Etanol(°GL)	Etanol(g/L)
Reator 1-1	3,343	35,102	25,650	76,950	4,692	37,065
Reator 1-2	2,727	28,634	24,500	73,500	5,025	39,697
Reator 1-3	3,023	31,742	24,510	73,530	4,911	38,798
Reator 1-4	3,491	36,656	24,250	72,750	3,382	26,715
Reator 1-5	2,899	30,440	22,040	66,120	2,730	21,567
Reator 1-6	3,393	35,627	18,120	54,360	2,714	21,444
Reator 1-7	3,792	39,816	16,840	50,520	2,751	21,735
Reator 1-8	3,000	31,500	18,420	55,260	1,913	15,109
Reator 2-1	0,953	10,007	18,150	54,450	6,136	48,474
Reator 2-2	0,884	9,282	19,510	58,530	6,138	48,493
Reator 2-3	0,913	9,587	18,220	54,660	6,185	48,865
Reator 2-4	0,677	7,109	19,540	58,620	5,082	40,148
Reator 2-5	0,815	8,558	35,410	106,230	3,989	31,514
Reator 2-6	0,721	7,571	23,100	69,300	4,328	34,195
Reator 2-7	0,876	9,198	18,810	56,430	4,513	35,653
Reator 2-8	0,726	7,623	19,800	59,400	3,286	25,962
Reator 3-1	0,588	6,174	18,880	56,640	6,356	50,216
Reator 3-2	0,558	5,857	18,240	54,720	6,323	49,952
Reator 3-3	0,667	7,004	18,540	55,620	6,334	50,042
Reator 3-4	0,617	6,479	16,300	48,900	5,118	40,430
Reator 3-5	0,646	6,783	18,150	54,450	4,091	32,322
Reator 3-6	0,589	6,185	19,260	57,780	4,408	34,823
Reator 3-7	0,575	6,038	19,950	59,850	4,695	37,088
Reator 3-8	0,514	5,397	20,630	61,890	3,414	26,972
Reator 4-1	0,578	6,069	19,420	58,260	6,362	50,263
Reator 4-2	0,558	5,859	17,600	52,800	6,335	50,046
Reator 4-3	0,607	6,374	18,270	54,810	6,370	50,324
Reator 4-4	0,578	6,069	17,010	51,030	5,142	40,618
Reator 4-5	0,664	6,972	16,630	49,890	4,080	32,232
Reator 4-6	0,556	5,838	17,830	53,490	4,428	34,980
Reator 4-7	0,575	6,038	18,580	55,740	4,695	37,088
Reator 4-8	0,566	5,943	22,320	66,960	3,383	26,725

Continua

Continuação

	ART(%)	ART(g/L)	Células(%)	Celulas(g/L)	Etanol(°GL)	Etanol(g/L)
Reator 5-1	0,489	5,135	17,250	51,750	6,416	50,687
Reator 5-2	0,509	5,345	17,140	51,420	6,365	50,282
Reator 5-3	0,558	5,859	16,620	49,860	6,400	50,559
Reator 5-4	0,588	6,174	16,230	48,690	5,136	40,571
Reator 5-5	0,627	6,584	13,960	41,880	4,103	32,412
Reator 5-6	0,627	6,584	17,330	51,990	4,385	34,643
Reator 5-7	0,580	6,090	19,080	57,240	4,692	37,066
Reator 5-8	0,566	5,943	31,900	95,700	3,383	26,725
Fermento 1-1	0,000	0,000	34,210	102,630	1,604	12,672
Fermento 1-2	0,000	0,000	33,230	99,690	1,591	12,570
Fermento 1-3	0,000	0,000	33,370	100,110	1,600	12,640
Fermento 1-4	0,000	0,000	35,300	105,900	1,284	10,143
Fermento 1-5	0,000	0,000	28,840	86,520	1,026	8,103
Fermento 1-6	0,000	0,000	35,280	105,840	1,096	8,661
Fermento 1-7	0,000	0,000	28,200	84,600	1,173	9,266
Fermento 1-8	0,000	0,000	41,840	125,520	0,846	6,681
Mosto 1-1	21,758	228,459	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-2	21,659	227,420	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-3	21,857	229,499	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-4	17,714	185,997	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-5	14,418	151,389	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-6	15,452	162,246	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-7	16,392	172,116	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-8	11,879	124,730	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabela 16: Análises laboratoriais das amostras coletadas na Usina Alvorada em setembro de 2002

	ART(%)	ART(g/L)	Células(%)	Celulas(g/L)	Etanol(°GL)	Etanol(g/L)
Reator 1-1	2,235	23,468	20,170	60,510	4,822	38,094
Reator 1-2	2,259	23,720	16,870	50,610	4,807	37,975
Reator 1-3	3,156	33,138	17,260	51,780	4,252	33,591
Reator 1-4	4,385	46,043	17,550	52,650	3,493	27,595
Reator 1-5	5,369	56,375	17,660	52,980	2,885	22,792
Reator 1-6	4,215	44,258	25,050	75,150	3,599	28,432
Reator 1-7	2,315	24,308	27,930	83,790	4,772	37,699
Reator 1-8	1,671	17,546	25,940	77,820	5,170	40,843
Reator 2-1	0,611	6,416	16,840	50,520	5,825	46,018
Reator 2-2	0,629	6,605	16,900	50,700	5,814	45,931
Reator 2-3	0,667	7,004	16,570	49,710	5,790	45,741
Reator 2-4	1,007	10,574	17,770	53,310	5,580	44,082
Reator 2-5	1,366	14,343	17,560	52,680	5,358	42,328
Reator 2-6	1,569	16,475	11,910	35,730	5,233	41,341
Reator 2-7	1,306	13,713	13,470	40,410	5,396	42,628
Reator 2-8	0,873	9,167	16,640	49,920	5,663	44,738
Reator 3-1	0,497	5,219	16,500	49,500	5,895	46,571
Reator 3-2	0,497	5,219	17,060	51,180	5,895	46,571
Reator 3-3	0,497	5,219	15,360	46,080	5,895	46,571
Reator 3-4	0,488	5,124	16,750	50,250	5,901	46,618
Reator 3-5	0,678	7,119	17,010	51,030	5,784	45,694
Reator 3-6	0,720	7,560	15,610	46,830	5,757	45,480
Reator 3-7	0,652	6,846	13,200	39,600	5,800	45,820
Reator 3-8	0,689	7,235	13,860	41,580	5,777	45,638
Reator 4-1	0,516	5,418	15,840	47,520	5,884	46,484
Reator 4-2	0,544	5,712	15,960	47,880	5,866	46,341
Reator 4-3	0,497	5,219	15,720	47,160	5,895	46,571
Reator 4-4	0,469	4,925	16,560	49,680	5,913	46,713
Reator 4-5	0,631	6,626	16,500	49,500	5,813	45,923
Reator 4-6	0,617	6,479	16,620	49,860	5,821	45,986
Reator 4-7	0,652	6,846	15,900	47,700	5,800	45,820
Reator 4-8	0,578	6,069	14,730	44,190	5,845	46,176

Continua  
Continuação

	ART(%)	ART(g/L)	Células(%)	Celulas(g/L)	Etanol(°GL)	Etanol(g/L)
Reator 5-1	0,544	5,712	17,000	51,000	5,866	46,341
Reator 5-2	0,554	5,817	16,000	48,000	5,860	46,294
Reator 5-3	0,535	5,618	16,340	49,020	5,872	46,389
Reator 5-4	0,516	5,418	16,390	49,170	5,884	46,484
Reator 5-5	0,640	6,720	16,200	48,600	5,807	45,875
Reator 5-6	0,626	6,573	17,090	51,270	5,816	45,946
Reator 5-7	0,656	6,888	16,150	48,450	5,797	45,796
Reator 5-8	0,656	6,888	14,610	43,830	5,797	45,796
Fermento 1-1	0,000	0,000	38,630	115,890	1,467	11,585
Mosto 1-1	17,445	183,173	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabela 17: Análises laboratoriais das amostras coletadas na Usina Alvorada em outubro de 2002

	ART(%)	ART(g/L)	Células(%)	Celulas(g/L)	Etanol(°GL)	Etanol(g/L)
Reator 1-1	3,300	34,65	25,08	75,24	4,816	38,048124
Reator 1-2	3,103	32,5815	23,01	69,03	3,179	25,110318
Reator 1-3	3,370	35,385	24,49	73,47	3,439	27,169774
Reator 1-4	2,642	27,741	26,04	78,12	4,557	35,998818
Reator 1-5	1,671	17,5455	26,97	80,91	6,084	48,067407
Reator 1-6	3,300	34,65	26,6	79,8	4,816	38,048124
Reator 1-7	3,106	32,613	22,44	67,32	3,177	25,09561
Reator 1-8	3,370	35,385	21,8	65,4	3,439	27,169774
Reator 2-1	0,849	8,9145	23,91	71,73	6,337	50,06451
Reator 2-2	1,072	11,256	23,32	69,96	4,439	35,067592
Reator 2-3	0,950	9,975	21,09	63,27	4,941	39,034178
Reator 2-4	0,800	8,4	17,9	53,7	5,700	45,029492
Reator 2-5	0,836	8,778	20,31	60,93	6,603	52,161116
Reator 2-6	0,849	8,9145	19,04	57,12	6,337	50,06451
Reator 2-7	1,072	11,256	20,69	62,07	4,439	35,067592
Reator 2-8	0,950	9,975	22,11	66,33	4,941	39,034178
Reator 3-1	0,829	8,7045	17,42	52,26	6,350	50,162563
Reator 3-2	0,800	8,4	18,64	55,92	4,608	36,401112
Reator 3-3	0,815	8,5575	21,32	63,96	5,025	39,696035
Reator 3-4	0,747	7,8435	20,06	60,18	5,733	45,289333
Reator 3-5	0,891	9,3555	20,08	60,24	6,569	51,891471
Reator 3-6	0,829	8,7045	20,9	62,7	6,350	50,162563
Reator 3-7	0,800	8,4	21,42	64,26	4,608	36,401112
Reator 3-8	0,815	8,5575	22,86	68,58	5,025	39,696035
Reator 4-1	0,679	7,1295	18,09	54,27	6,443	50,89796
Reator 4-2	0,737	7,7385	17,93	53,79	4,647	36,709978
Reator 4-3	0,722	7,581	19,67	59,01	5,083	40,151981
Reator 4-4	0,747	7,8435	19,29	57,87	5,733	45,289333
Reator 4-5	0,877	9,2085	19,64	58,92	6,577	51,960108
Reator 4-6	0,679	7,1295	20,27	60,81	6,443	50,89796
Reator 4-7	0,737	7,7385	19,25	57,75	4,647	36,709978
Reator 4-8	0,722	7,581	20,49	61,47	5,083	40,151981

Continua

Continuação

	ART(%p/p)	ART(g/L)	Células(%)	Celulas(g/L)	Etanol(°GL)	Etanol(g/L)
Reator 5-1	0,562	5,901	18,34	55,02	6,515	51,471569
Reator 5-2	0,621	6,5205	18,9	56,7	4,719	37,278685
Reator 5-3	0,708	7,434	18,48	55,44	5,091	40,220618
Reator 5-4	0,655	6,8775	20,21	60,63	5,790	45,740376
Reator 5-5	0,831	8,7255	19,28	57,84	6,606	52,185629
Reator 5-6	0,562	5,901	22,33	66,99	6,515	51,471569
Reator 5-7	0,621	6,5205	20,29	60,87	4,719	37,278685
Reator 5-8	0,708	7,434	22,13	66,39	5,091	40,220618
Fermento 1-1	0,000	0,000	48,81	146,43	1,629	12,867892
Fermento 1-2	0,000	0,000	34,74	104,22	1,180	9,3196713
Fermento 1-3	0,000	0,000	56,64	169,92	1,273	10,055155
Fermento 1-4	0,000	0,000	42,38	127,14	1,447	11,435094
Fermento 1-5	0,000	0,000	41,76	125,28	1,651	13,046407
Fermento 1-6	0,000	0,000	49,44	148,32	1,629	12,867892
Fermento 1-7	0,000	0,000	41,16	123,48	1,180	9,3196713
Fermento 1-8	0,000	0,000	43,7	131,1	1,273	10,055155
Mosto 1-1	19,298	202,629	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-2	14,351	150,686	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-3	15,321	160,871	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-4	17,261	181,241	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-5	20,127	211,334	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-6	19,298	202,629	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-7	14,351	150,686	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-8	15,321	160,871	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabela 18: Análises laboratoriais das amostras coletadas na Usina Clealco em julho de 2002

	ART(%p/p)	ART(g/L)	Células(%)	Celulas(g/L)	Etanol(°GL)	Etanol(g/L)
Reator 1-1	3,195	33,550	12,453	37,358	4,978	39,277
Reator 1-2	2,957	31,052	13,082	39,245	5,202	41,041
Reator 1-3	2,990	31,394	14,444	43,333	5,337	42,113
Reator 1-4	3,014	31,643	15,849	47,547	5,557	43,842
Reator 1-5	3,541	37,183	17,692	53,077	4,260	33,610
Reator 1-6	3,431	36,028	15,679	47,037	4,405	34,756
Reator 1-7	3,008	31,584	15,879	47,636	4,236	33,419
Reator 1-8	2,952	30,994	15,185	45,556	4,621	36,457
Reator 2-1	0,884	9,279	16,242	48,727	6,393	50,441
Reator 2-2	0,913	9,583	14,568	43,704	6,453	50,916
Reator 2-3	0,942	9,892	14,909	44,727	6,591	52,003
Reator 2-4	0,953	10,001	15,769	47,308	6,818	53,797
Reator 2-5	0,890	9,343	15,723	47,170	5,883	46,416
Reator 2-6	0,900	9,451	16,250	48,750	5,955	46,981
Reator 2-7	0,827	8,678	17,444	52,333	5,571	43,956
Reator 2-8	0,892	9,367	15,723	47,170	5,882	46,405
Reator 3-1	0,542	5,692	14,150	42,449	6,602	52,091
Reator 3-2	0,589	6,186	13,580	40,741	6,651	52,479
Reator 3-3	0,571	5,998	13,827	41,481	6,818	53,795
Reator 3-4	0,601	6,313	14,830	44,490	7,033	55,494
Reator 3-5	0,598	6,281	15,513	46,538	6,061	47,825
Reator 3-6	0,549	5,761	15,067	45,200	6,170	48,678
Reator 3-7	0,488	5,128	16,026	48,077	5,778	45,589
Reator 3-8	0,524	5,498	16,667	50,000	6,107	48,185
Reator 4-1	0,463	4,864	16,500	49,500	6,650	52,472
Reator 4-2	0,500	5,251	17,333	52,000	6,706	52,909
Reator 4-3	0,490	5,141	16,190	48,571	6,868	54,189
Reator 4-4	0,457	4,795	16,818	50,455	7,122	56,192
Reator 4-5	0,446	4,686	16,818	50,455	6,154	48,558
Reator 4-6	0,492	5,167	16,340	49,020	6,204	48,952
Reator 4-7	0,464	4,867	17,233	51,698	5,793	45,709
Reator 4-8	0,500	5,250	16,727	50,182	6,122	48,299

Continua

Continuação

	ART(%p/p)	ART(g/L)	Células(%)	Celulas(g/L)	Etanol(°GL)	Etanol(g/L)
Fermento 1-1	0,000	0,000	39,444	118,333	1,663	13,118
Fermento 1-2	0,000	0,000	39,070	117,209	1,676	13,227
Fermento 1-3	0,000	0,000	38,986	116,957	1,717	13,547
Fermento 1-4	0,000	0,000	35,745	107,234	1,780	14,048
Fermento 1-5	0,000	0,000	35,641	106,923	1,539	12,140
Fermento 1-6	0,000	0,000	35,294	105,882	1,551	12,238
Fermento 1-7	0,000	0,000	33,333	100,000	1,448	11,427
Fermento 1-8	0,000	0,000	32,716	98,148	1,530	12,075
Mosto 1-1	17,800	186,900	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-2	18,000	189,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-3	18,400	193,200	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-4	19,000	199,500	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-5	16,500	173,250	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-6	16,700	175,350	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-7	15,600	163,800	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-8	16,500	173,250	0,000	0,000	0,000	0,000

Tabela 19: Análises laboratoriais das amostras coletadas na Usina Clealco em agosto de 2002

	ART(%p/p)	ART(g/L)	Células(%)	Celulas(g/L)	Etanol(°GL)	Etanol(g/L)
Reator 1-1	3,372	35,408	16,782	50,345	6,289	49,619
Reator 1-2	3,241	34,032	17,356	52,069	6,774	53,447
Reator 1-3	2,986	31,349	18,693	56,078	7,868	62,079
Reator 1-4	3,379	35,474	20,267	60,800	6,285	49,589
Reator 1-5	3,157	33,147	17,212	51,636	5,952	46,960
Reator 1-6	3,413	35,834	17,212	51,636	6,733	53,122
Reator 1-7	2,675	28,090	15,402	46,207	6,289	49,623
Reator 1-8	3,002	31,522	17,193	51,579	6,643	52,416
Reator 2-1	0,945	9,923	14,103	42,308	7,775	61,342
Reator 2-2	0,890	9,345	15,385	46,154	8,213	64,803
Reator 2-3	0,843	8,852	13,590	40,769	9,180	72,427
Reator 2-4	0,952	9,996	14,744	44,231	7,770	61,309
Reator 2-5	0,815	8,556	15,256	45,769	7,386	58,272
Reator 2-6	0,721	7,569	16,543	49,630	8,381	66,124
Reator 2-7	0,866	9,093	16,267	48,800	7,397	58,361
Reator 2-8	0,805	8,453	20,408	61,224	7,988	63,027
Reator 3-1	0,570	5,983	13,333	40,000	8,004	63,155
Reator 3-2	0,600	6,301	15,679	47,037	8,391	66,203
Reator 3-3	0,599	6,284	14,267	42,800	9,329	73,608
Reator 3-4	0,572	6,009	11,771	35,313	8,003	63,143
Reator 3-5	0,633	6,641	14,248	42,745	7,497	59,153
Reator 3-6	0,589	6,179	15,333	46,000	8,462	66,763
Reator 3-7	0,658	6,910	15,172	45,517	7,524	59,366
Reator 3-8	0,636	6,675	15,977	47,931	8,092	63,845
Reator 4-1	0,466	4,891	16,000	48,000	8,068	63,657
Reator 4-2	0,501	5,264	15,723	47,170	8,451	66,680
Reator 4-3	0,400	4,201	14,103	42,308	9,451	74,566
Reator 4-4	0,583	6,123	14,545	43,636	7,996	63,090
Reator 4-5	0,442	4,644	14,524	43,571	7,614	60,072
Reator 4-6	0,488	5,127	15,054	45,161	8,523	67,247
Reator 4-7	0,503	5,279	15,394	46,182	7,619	60,116
Reator 4-8	0,562	5,905	24,809	74,426	8,137	64,199

Continua

Continuação

	ART(%p/p)	ART(g/L)	Células(%)	Celulas(g/L)	Etanol(°GL)	Etanol(g/L)
Fermento 1-1	0,000	0,000	37,163	111,489	2,017	15,914
Fermento 1-2	0,000	0,000	38,113	114,340	2,113	16,670
Fermento 1-3	0,000	0,000	38,986	116,957	2,363	18,642
Fermento 1-4	0,000	0,000	38,519	115,556	1,999	15,773
Fermento 1-5	0,000	0,000	42,893	128,679	1,903	15,018
Fermento 1-6	0,000	0,000	36,552	109,655	2,131	16,812
Fermento 1-7	0,000	0,000	37,160	111,481	1,905	15,029
Fermento 1-8	0,000	0,000	35,977	107,931	2,034	16,050
Mosto 1-1	19,600	205,800	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-2	20,550	215,775	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-3	22,750	238,875	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-4	19,600	205,800	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-5	18,500	194,250	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-6	20,700	217,350	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-7	18,600	195,300	0,000	0,000	0,000	0,000
Mosto 1-8	19,900	208,950	0,000	0,000	0,000	0,000

Apêndice 5 – Concentrações de ART, Etanol e Células nos biorreatores e condições operacionais das usinas Alvorada e Clealco no período de safra de 2002 durante os ensaios industriais

**Usina Alvorada – Julho de 2002**

Tabela 20: Concentrações dos componentes ART, etanol e células nos biorreatores e volume dos biorreatores durante o ensaio de julho de 2002 na usina Alvorada

	ART (g/L)	ETANOL (g/L)	CÉLULAS (g/L)	VOLUME (m <sup>3</sup> )
BIORREATOR 1	62,031	24,802	78,86	318,6
BIORREATOR 2	16,555	29,679	87,05	289,0
BIORREATOR 3	14,280	38,120	60,53	267,7
BIORREATOR 4	8,726	53,489	64,30	243,3
BIORREATOR 5	6,836	77,603	62,00	212,9

Dados Operacionais da Usina Alvorada durante o ensaio de julho de 2002

Número de reatores	5
Vazão de mosto (m <sup>3</sup> /h)	106
Vazão de reciclo (m <sup>3</sup> /h)	85
Concentração de etanol no reciclo (g/L)	19,401
Concentração celular no reciclo (g/L)	172,03
ART do mosto (g/L)	206,7
Velocidade específica máxima (h <sup>-1</sup> )	0,5
Y <sub>P/S</sub>	0,374
Y <sub>X/S</sub>	0,026

## Usina Alvorada – Agosto de 2002

Tabela 21: Concentrações dos componentes ART, etanol e células nos biorreatores e volume dos biorreatores durante o ensaio de agosto de 2002 na usina Alvorada

	ART (g/L)	ETANOL (g/L)	CÉLULAS (g/L)	VOLUME (m <sup>3</sup> )
BIORREATOR 1	31,826	38,520	74,66	235
BIORREATOR 2	9,625	48,611	55,88	230
BIORREATOR 3	6,345	50,070	55,66	223
BIORREATOR 4	6,101	50,211	55,29	220
BIORREATOR 5	5,446	50,509	51,01	140

### Dados Operacionais da Usina Alvorada durante o ensaio de agosto de 2002

Número de reatores	5
Vazão de mosto (m <sup>3</sup> /h)	85
Vazão de reciclo (m <sup>3</sup> /h)	85
Concentração de etanol no reciclo (g/L)	12,627
Concentração celular no reciclo (g/L)	100,81
ART do mosto (g/L)	228,459
Velocidade específica máxima (h <sup>-1</sup> )	0,5
Y <sub>P/S</sub>	0,42
Y <sub>X/S</sub>	0,026

## Usina Alvorada – Setembro de 2002

Tabela 22: Concentrações dos componentes ART, etanol e células nos biorreatores e volume dos biorreatores durante o ensaio de setembro de 2002 na usina Alvorada

	ART (g/L)	ETANOL (g/L)	CÉLULAS (g/L)	VOLUME (m <sup>3</sup> )
BIORREATOR 1	26,775	36,553	54,30	262,1
BIORREATOR 2	6,675	45,897	50,31	236,3
BIORREATOR 3	5,219	46,571	48,92	230,2
BIORREATOR 4	5,219	46,571	47,52	283,4
BIORREATOR 5	5,219	46,571	49,34	182

### Dados Operacionais da Usina Alvorada durante o ensaio de setembro de 2002

Número de reatores	5
Vazão de mosto (m <sup>3</sup> /h)	85
Vazão de reciclo (m <sup>3</sup> /h)	65
Concentração de etanol no reciclo (g/L)	11,585
Concentração celular no reciclo (g/L)	115,89
ART do mosto (g/L)	183,173
Velocidade específica máxima (h <sup>-1</sup> )	0,5
Y <sub>P/S</sub>	0,426
Y <sub>X/S</sub>	0,026

## Usina Alvorada – Outubro de 2002

Tabela 23: Concentrações dos componentes ART, etanol e células nos biorreatores e volume dos biorreatores durante o ensaio de outubro de 2002 na usina Alvorada

	ART (g/L)	ETANOL (g/L)	CÉLULAS (g/L)	VOLUME (m <sup>3</sup> )
BIORREATOR 1	34,206	30,109	72,58	256
BIORREATOR 2	10,049	41,389	68,32	243
BIORREATOR 3	8,554	42,087	57,38	232
BIORREATOR 4	7,483	42,587	55,69	230
BIORREATOR 5	6,619	42,991	55,72	158

### Dados Operacionais da Usina Alvorada durante o ensaio de julho de 2002

Número de reatores	5
Vazão de mosto (m <sup>3</sup> /h)	80
Vazão de reciclo (m <sup>3</sup> /h)	62
Concentração de etanol no reciclo (g/L)	10,748
Concentração celular no reciclo (g/L)	140,19
ART do mosto (g/L)	171,395
Velocidade específica máxima (h <sup>-1</sup> )	0,5
Y <sub>P/S</sub>	0,401
Y <sub>X/S</sub>	0,026

## Usina Clealco – Julho de 2002

Tabela 24: Concentrações dos componentes ART, etanol e células nos biorreatores e volume dos biorreatores durante o ensaio de julho de 2002 na usina Clealco

	ART (g/L)	ETANOL (g/L)	CÉLULAS (g/L)	VOLUME (m <sup>3</sup> )
BIORREATOR 1	31,999	40,810	39,979	541,6
BIORREATOR 2	9,585	51,120	45,719	372,4
BIORREATOR 3	5,959	52,788	41,557	298,6
BIORREATOR 4	5,085	53,190	50,024	235,9

### Dados Operacionais da Usina Alvorada durante o ensaio de julho de 2002

Número de reatores	4
Vazão de mosto (m <sup>3</sup> /h)	70
Vazão de reciclo (m <sup>3</sup> /h)	40
Concentração de etanol no reciclo (g/L)	13,297
Concentração celular no reciclo (g/L)	117,5
ART do mosto (g/L)	189,7
Velocidade específica máxima (h <sup>-1</sup> )	0,5
Y <sub>P/S</sub>	0,418
Y <sub>X/S</sub>	0,026

## Usina Clealco – Agosto de 2002

Tabela 25: Concentrações dos componentes ART, etanol e células nos biorreatores e volume dos biorreatores durante o ensaio de agosto de 2002 na usina Clealco

	ART (g/L)	ETANOL (g/L)	CÉLULAS (g/L)	VOLUME (m <sup>3</sup> )
BIORREATOR 1	33,596	55,048	52,831	541,6
BIORREATOR 2	9,373	66,191	43,077	372,4
BIORREATOR 3	6,189	67,655	43,279	298,6
BIORREATOR 4	4,785	68,301	45,826	235,9

### Dados Operacionais da Usina Alvorada durante o ensaio de agosto de 2002

Número de reatores	4
Vazão de mosto (m <sup>3</sup> /h)	110
Vazão de reciclo (m <sup>3</sup> /h)	48
Concentração de etanol no reciclo (g/L)	17,075
Concentração celular no reciclo (g/L)	114,262
ART do mosto (g/L)	220,15
Velocidade específica máxima (h <sup>-1</sup> )	0,5
Y <sub>P/S</sub>	0,425
Y <sub>X/S</sub>	0,026