

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SACAROSE POR
FERMENTAÇÃO EXTRATIVA UTILIZANDO ARRASTE COM
DIÓXIDO DE CARBONO**

Jorge Luiz Silveira Sonego

Orientador: Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior

Coorientador: Prof. Dr. Antonio José Gonçalves Cruz

SÃO CARLOS – SP

2016

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SACAROSE POR
FERMENTAÇÃO EXTRATIVA UTILIZANDO ARRASTE COM
DIÓXIDO DE CARBONO**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Jorge Luiz Silveira Sonogo

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SACAROSE POR
FERMENTAÇÃO EXTRATIVA UTILIZANDO ARRASTE COM
DIÓXIDO DE CARBONO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior

Coorientador: Prof. Dr. Antonio José Gonçalves Cruz

SÃO CARLOS – SP

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

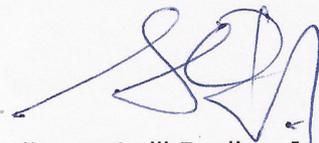
S698e Sonego, Jorge Luiz Silveira
Estudo da produção de etanol de sacarose por
fermentação extrativa utilizando arraste com dióxido
de carbono / Jorge Luiz Silveira Sonego. -- São
Carlos : UFSCar, 2016.
139 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

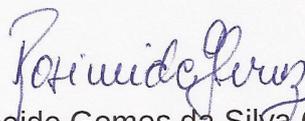
1. Arraste de etanol por CO₂. 2. Fermentação
extrativa. 3. Otimização da fermentação extrativa. I.
Título.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE JORGE LUIS SILVEIRA SONEGO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 18 DE ABRIL DE 2016.

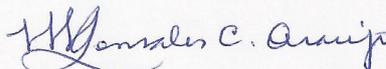
BANCA EXAMINADORA:



Alberto Colli Badino Junior
Orientador, UFSCar



Rosineide Gomes da Silva Cruz
UFSCar



Maria Lucia Gonsales da Costa Araújo
UNESP



Eloizio Julio Ribeiro
UFU



Camila Ramos da Silva Pinto
UFSCar

Aos meus pais, Mauro Roberto Sonogo e Esclarena Silveira Sonogo,

Aos meus irmãos Anna e Mauro,

Dedico.

À minha noiva, Rosana,

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior e ao Prof. Dr. Antonio José Gonçalves Cruz pela orientação, ensinamentos, dedicação, amizade, conselhos e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), através do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, pela oportunidade e estrutura para realização deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos os colegas e amigos que fiz na pós-graduação ao longo desses quatro anos.

“A ciência ensina ao homem o amor e o respeito pela verdade, a ideia do dever e a necessidade do trabalho, não como um castigo, mas como o mais elevado meio de empregar sua atividade”.

(Marcelin Berthelot)

RESUMO

O etanol acumulado no caldo durante a fermentação é o principal componente tóxico para levedura, afetando o crescimento celular e produção de etanol. Uma forma de contornar esse efeito de inibição é a utilização de fermentação extrativa, onde o etanol é removido a partir do caldo de fermentação durante o processo. No presente trabalho foi realizado o estudo da produção de etanol de sacarose empregando fermentação extrativa com arraste de etanol por dióxido de carbono. Inicialmente foi avaliada a influência da vazão específica de CO_2 , da concentração inicial de etanol na solução e da temperatura da solução no arraste de etanol com dióxido de carbono. Nesta etapa foi realizada a modelagem da remoção de etanol e da água por arraste com CO_2 segundo um modelo de primeira ordem. Na sequência foi estudada a produção de etanol por fermentação extrativa em batelada e batelada alimentada, empregando um biorreator tipo coluna de bolhas com volume útil de 5 L e temperatura de 34°C . Foi desenvolvida a modelagem cinética da fermentação alcoólica convencional (sem extração) em batelada e batelada alimentada. Os parâmetros do modelo cinético híbrido de Andrews-Levenspiel foram estimados para as fermentações convencionais com C_{S0} de 180 g.L^{-1} . Na sequência foi proposta a modelagem matemática da fermentação extrativa em batelada e batelada alimentada, considerando a remoção de etanol e água, devido ao arraste por CO_2 , segundo um modelo de primeira ordem. Posteriormente foi realizada a otimização da produção de etanol por fermentação extrativa em batelada alimentada. Um algoritmo genético foi empregado para otimizar simultaneamente a vazão de alimentação de substrato (F) e a concentração de etanol para dar início o arraste por CO_2 durante as fermentações extrativas em batelada alimentada (C_{E0}), de modo a obter a máxima produtividade em etanol. A remoção de etanol por arraste com dióxido de carbono pode ser modelada como um modelo de primeira ordem. O modelo híbrido de Andrews-Levenspiel foi adequado para descrever a cinética das fermentações alcoólicas em batelada e batelada alimentada. A modelagem proposta para a fermentação extrativa por arraste com CO_2 foi adequada para descrever o comportamento das fermentações extrativas em batelada e batelada alimentada. Nas fermentações extrativas com arraste de etanol por CO_2 , houve um aumento na velocidade de consumo do substrato e conseqüentemente o consumo total do substrato ocorreu antes nas fermentações extrativas em comparação com as convencionais. A fermentação extrativa em batelada com $C_{S0}=180 \text{ g.L}^{-1}$ e o arraste por CO_2 iniciado com 3 h de fermentação, quando a concentração de etanol no caldo de fermentação era $43,3 \text{ g.L}^{-1}$, resultou em uma produtividade de etanol (em $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$) cerca de 25% superior a fermentação convencional. As fermentações extrativas em batelada alimentada com tempo de enchimento da dorna $t_e=5 \text{ h}$ e o início do arraste de etanol por CO_2 com 3 h de fermentação resultou em significativa redução do efeito inibição relacionado ao substrato e ao etanol. Esta condição experimental tornou possível realizar fermentações extrativas em batelada alimentada com concentração de substrato na alimentação de até 240 g.L^{-1} , com consumo total do substrato e concentração final total de etanol de $110,3 \text{ g.L}^{-1}$ (14°GL) (vinho + arrastado). O emprego da ferramenta de otimização possibilitou o uso de mosto com concentração de até 300 g.L^{-1} gerando uma concentração total de etanol de $17,2^\circ\text{GL}$ (vinho + arrastado), o que significa um aumento de 65% comparado à concentração final de etanol obtida na fermentação convencional sem arraste.

Palavras-Chave: Arraste de etanol por CO_2 . Fermentação extrativa. Fermentação Alcoólica em batelada e batelada alimentada. Otimização da fermentação extrativa.

ABSTRACT

The ethanol accumulated in the broth during fermentation is the main component toxic to yeast, causing slower yeast growth and decreased ethanol production. One way of overcoming this inhibition effect is to use extractive fermentation, where the ethanol is removed from the broth during the fermentation process. The present work evaluated sucrose ethanol production using extractive fermentation using CO₂ as stripping gas. Firstly, it was made investigation of the influence of specific CO₂ flow rate, initial ethanol concentration and solution temperature on ethanol stripping by CO₂. At this stage the modeling of the of ethanol and water removal was achieved by CO₂ stripping according to a first order model. In sequence, it was studied the production of ethanol by extractive fermentation in batch and fed-batch modes, employing in a 5 L bubble column bioreactor and temperature of 34.0 °C. The kinetic parameters of the hybrid Andrews-Levenspiel model were estimated by modeling of conventional batch and fed-batch fermentations (without stripping) with C_{S0} of 180 g.L⁻¹. Mathematical modeling of extractive in batch and fed-batch ethanol fermentation was developed considering the removal of ethanol and water, due to the CO₂ stripping, according to a first order model. Later it was optimized the production of ethanol by extractive fed-batch fermentation. A genetic algorithm was used to simultaneous optimization the substrate feed rate (F) and the ethanol concentration (C_{E0}) to start CO₂ stripping in extractive fed-batch fermentation, so as to obtain the maximum ethanol productivity. The ethanol removal by stripping with carbon dioxide can be modeled as a first order model. The hybrid model of Andrews-Levenspiel was adequate to describe the kinetics of batch and fed batch ethanol fermentation. The proposed model for extractive ethanol fermentation with CO₂ was adequate to describe the behavior of extractive fermentation in batch and fed batch modes. In the extractive ethanol fermentation with CO₂ stripping an increase in substrate uptake rate ($r_s = -dC_s/dt$) after the beginning of ethanol stripping and the total consumption of the substrate occurred before the extractive fermentation compared to the conventional process. The extractive batch fermentation with C_{S0}=180 g.L⁻¹ and CO₂ stripping initiated after 3 h of fermentation at an ethanol concentration of 43.3 g.L⁻¹, resulted in an ethanol productivity (in g.L⁻¹.h⁻¹) about 25% higher than conventional batch fermentation. For fed-batch fermentation, vat filling time (Ft) of 5 h and start of ethanol stripping at 3 h of fermentation substantially reduced the inhibitory effects of the substrate and ethanol on the yeast cells. This condition enabled the extractive fed-batch ethanol fermentation to be performed using substrate concentrations of up to 240 g.L⁻¹ in the feed. The total ethanol concentration reached 110.3 g.L⁻¹ (14 °GL) (wine + entrained). The use of the optimization tool enabled using substrate concentrations of up to 300 g.L⁻¹ generating a total concentration of ethanol of 17.2 °GL (wine + entrained), which means an increase of 65% compared to the concentration final ethanol obtained in conventional fermentation without stripping.

Keywords: Ethanol stripping by CO₂. Extractive fermentation. Ethanol fermentation in batch and fed-batch. Optimization of extractive ethanol fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Diagrama esquemático de uma planta industrial sucroalcooleira com as principais etapas da produção de açúcar, etanol e energia elétrica.....	24
Figura 2.2 - Perfis de substrato, produto e volume de um processo em batelada alimentada. V: volume de meio, S: concentração de substrato, MP: massa de produto em função do tempo para um processo em batelada alimentada com vazão de alimentação constante, TE: tempo de enchimento da dorna em horas e TF: tempo de fermentação.....	26
Figura 2.3 - Esquema simplificado do processo em batelada alimentada de fermentação.	27
Figura 2.4 - Esquema simplificado do processo contínuo de fermentação.....	28
Figura 2.5 – Reação de hidrólise da sacarose pela enzima invertase em meio aquoso.	31
Figura 2.6 - Classificação de crescimento associado à formação de produtos, sendo (a) Produção associada ao crescimento (Tipo 1), (b) Produção parcialmente associada ao crescimento (Tipo 2) e (c) Produção dissociada ao crescimento (Tipo 3).....	35
Figura 3.1 - Biorreator pneumático.....	51
Figura 3.2 - Esquema representativo do aparato experimental.	51
Figura 3.3 - Concentrações de etanol e água ao longo do tempo para os experimentos de arraste por CO ₂ . Concentração de etanol (C _E): símbolos fechados; concentração de água (C _W) símbolos abertos; linhas valores simulados usando o modelo de primeira ordem.	56
Figura 3.4 - Valores preditos em função dos observados em relação ao fator de arraste (F _A).	62
Figura 3.5 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta fator de arraste (F _A): (A) em função da vazão de gás de arraste (X ₁) e concentração de etanol na solução (X ₂); (B) Superfície de resposta e curva de contorno em função da vazão de gás de arraste (X ₁) e temperatura da solução (X ₃) e (C) Superfície de resposta e curva de contorno em função da concentração de etanol na solução (X ₂) e temperatura da solução (X ₃).	63
Figura 3.6 - Valores preditos em função dos observados em relação a constante de velocidade de remoção de etanol (k _E).....	68
Figura 3.7 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta k _E : (A) em função da vazão de gás de arraste (X ₁) e concentração de etanol na solução (X ₂); (B) Superfície de resposta e curva de contorno em função da vazão de gás de arraste (X ₁) e temperatura da solução (X ₃) e (C) Superfície de resposta e curva de contorno em função da concentração de etanol na solução (X ₂) e temperatura da solução (X ₃).	69
Figura 3.8 - Valores preditos em função dos observados em relação a constante de velocidade de remoção de água (k _W).....	73

- Figura 3.9** - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta k_w : (A) em função da vazão de gás de arraste (X_1) e concentração de etanol na solução (X_2); (B) Superfície de resposta e curva de contorno em função da vazão de gás de arraste (X_1) e temperatura da solução (X_3) e (C) Superfície de resposta e curva de contorno em função da concentração de etanol na solução (X_2) e temperatura da solução (X_3). 75
- Figura 3.10** - Perfis de desejabilidade para o arraste de etanol por CO_2 77
- Figura 3.11** - Concentrações de etanol e água ao longo do tempo para os experimentos de arraste de etanol por CO_2 . Concentração de etanol (C_E): símbolos fechados; concentração de água (C_W): símbolos abertos; linhas: valores simulados obtidos usando o modelo de primeira ordem..... 78
- Figura 4.1** - Foto da parte superior do biorreator com detalhe do sistema de agitação. 81
- Figura 4.2** - Gráfico Comparativo entre os valores simulados (—) e experimentais de C_x (■), C_s (◆) e C_E (●) para a fermentação convencional em batelada ($C_{s0}=180 \text{ g.L}^{-1}$). 87
- Figura 4.3** - Comparação entre os valores experimentais de C_x (■), C_s (◆) e C_E (●) e simulados (—) para a fermentação extrativa com arraste por CO_2 iniciado após 5 h (FE1; $C_E=65,5 \text{ g.L}^{-1}$). 89
- Figura 4.4** - Comparação entre os valores experimentais de C_x (■), C_s (◆) e C_E (●) e simulados (—) para a fermentação extrativa com arraste por CO_2 iniciado após 4 h (FE2; $C_E=58,4 \text{ g.L}^{-1}$). 90
- Figura 4.5** - Comparação entre os valores experimentais de C_x (■), C_s (◆) e C_E (●) e simulados (—) para a fermentação extrativa com arraste por CO_2 iniciado após 3 h (FE 3; $C_E=43,3 \text{ g.L}^{-1}$). 90
- Figura 4.6** - Comparativo entre os perfis de pH ao longo do tempo para as fermentações convencional e extrativa. (■) fermentação convencional, (●) fermentação extrativa FE1, (▲) fermentação extrativa FE2 e (◆) fermentação extrativa FE3. 94
- Figura 5.1** - Esquema representativo do aparato experimental empregado nos experimentos de fermentação em batelada alimentada. Descrição: (1) Cilindro de CO_2 ; (2) Fluxômetro de massa; (3) Banho termostaticado; (4) Biorreator; (5) Antiespumante; (6) Bomba peristáltica; (7) Meio de cultura; (8) Termômetro; (9) Rotor; (10) Retirada de amostra; (11) Exaustão (CO_2 + etanol + água). 98
- Figura 5.2** - Imagem da bancada de trabalho empregada nos experimentos de fermentação em batelada alimentada..... 98
- Figura 5.3** - Gráfico Comparativo entre os valores simulados (—) e experimentais de C_x (■), C_s (◆) e C_E (●) para a fermentação convencional em batelada alimentada com concentração de substrato na alimentação de 180 g.L^{-1} . (A) FC1 – tempo de enchimento (t_e) de 3 h; (B) FC2 - tempo de enchimento (t_e) de 5 h..... 105
- Figura 5.4** - Gráficos comparando os valores simulados (—) e experimentais para as concentrações de células C_x (■), substrato C_s (◆) e etanol C_E (●) nas fermentações

extrativas em batelada alimentada: (A) FE1 - te e início do arraste na 3 h; (B) FE2 - te e início do arraste na 5 h; (C) FE3 - te de 5 h e início do arraste na 3 h. 107

Figura 5.5 - Gráficos comparativos entre os valores de concentração simulados (—) e experimentais de C_X (■), C_S (◆) e C_E (●) para fermentação alcoólica em batelada alimentada com $C_{SF}=200 \text{ g.L}^{-1}$. (A) fermentação convencional (FC3); (B) fermentação extrativa (FE4). 111

Figura 5.6 - Gráficos comparativos entre os valores de concentração simulados (—) e experimentais de C_X (■), C_S (◆) e C_E (●) para fermentação alcoólica em batelada alimentada com $C_{SF}=220 \text{ g.L}^{-1}$. (A) fermentação convencional (FC4); (B) fermentação extrativa (FE5). 112

Figura 5.7 - Gráficos comparativos entre os valores de concentração simulados (—) e experimentais de C_X (■), C_S (◆) e C_E (●) para fermentação alcoólica extrativa em batelada alimentada (FE6) com $C_{SF}=240 \text{ g.L}^{-1}$ 113

Figura 6.1 - Comparação entre os valores simulados (—) e experimentais de C_X (■), C_S (◆), e C_E (●) para a fermentação convencional (FC; $C_{SF}=180 \text{ g.L}^{-1}$) para a vazão de alimentação de mosto de $F=1,0 \text{ L.h}^{-1}$ 121

Figura 6.2 - Comparação entre os valores simulados (—) e experimentais de C_X (■), C_S (◆), e C_E (●) para a fermentação extrativa FE1 ($C_{SF}=260 \text{ g.L}^{-1}$) com vazão de alimentação de mosto de $0,56 \text{ L.h}^{-1}$ e início do arraste de etanol quando $C_{E0}=34,18 \text{ g.L}^{-1}$ 123

Figura 6.3 - Comparação entre os valores simulados (—) e experimentais de C_X (■), C_S (◆), e C_E (●) para a fermentação extrativa FE 2 ($C_{SF}=280 \text{ g.L}^{-1}$), vazão de alimentação de mosto de $0,51 \text{ L.h}^{-1}$ e início do arraste de etanol quando $C_{E0}=35,24 \text{ g.L}^{-1}$ 124

Figura 6.4 - Comparação entre os valores simulados (—) e experimentais de C_X (■), C_S (◆), e C_E (●) para a fermentação extrativa FE3 ($C_{SF}=300 \text{ g.L}^{-1}$), vazão de alimentação de mosto de $0,44 \text{ L.h}^{-1}$ e início do arraste de etanol quando $C_{E0}=34,48 \text{ g.L}^{-1}$ 124

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Dimensões do biorreator.....	50
Tabela 3.2 - Condições experimentais do arraste de etanol apartir de uma solução hidroalcoólica empregando CO ₂	52
Tabela 3.3 - Valores reais e codificados das variáveis independentes utilizadas nos experimentos.....	54
Tabela 3.4 - Condições Experimentais empregadas nos experimentos de arraste de etanol realizados usando soluções hidroalcoólicas a 34°C e vazão específica de CO ₂ de 2,5 vvm. ..	55
Tabela 3.5 - Valores k_E , k_w , e F_A obtidos a partir dos experimentos de arraste de etanol.	57
Tabela 3.6 - Matriz do planejamento DCCR e valores numéricos das variáveis respostas. ...	59
Tabela 3.7 - Resultados da regressão múltipla para resposta fator de arraste (F_A) com todas as variáveis com seus respectivos parâmetros e níveis de significância.	60
Tabela 3.8 - Resultados da regressão múltipla para a resposta fator de arraste, apenas com as variáveis significativas e seus respectivos parâmetros e níveis de significância.	61
Tabela 3.9 - Análise de variância para o fator de arraste.	62
Tabela 3.10 - Resultados da regressão múltipla para resposta constante de velocidade de remoção de etanol com todas as variáveis com seus respectivos parâmetros e níveis de significância.....	66
Tabela 3.11 - Resultados da regressão múltipla para a resposta constante de velocidade de remoção de etanol, apenas com as variáveis significativas e seus respectivos parâmetros e níveis de significância.	67
Tabela 3.12 - Análise de variância para a constante de velocidade de remoção de etanol (k_E).	68
Tabela 3.13 - Resultados da regressão múltipla para resposta constante de velocidade de remoção de água (k_w) com todas as variáveis com seus respectivos parâmetros e níveis de significância.....	71
Tabela 3.14 - Resultados da regressão múltipla para a resposta constante de velocidade de remoção de água (k_w), apenas com as variáveis significativas e seus respectivos parâmetros e níveis de significância.	72
Tabela 3.15 - Análise de variância para a constante de velocidade de remoção de água.	73
Tabela 3.16 - Valores de k_E , k_w , e F_A obtidos nos experimentos de arraste gasoso com vazão de 2,5 vvm e temperatura de 34 °C.....	79

Tabela 4.1 - Composição do meio de cultura empregado nos experimentos de fermentação.	82
Tabela 4.2 - Valores estimados dos parâmetros cinéticos da fermentação convencional (intervalo de confiança de 95%).	87
Tabela 4.3 - Comparação entre a fermentação convencional e extrativa.	93
Tabela 5.1 - Valores estimados dos parâmetros cinéticos para a fermentação convencional em batelada alimentada (duplicatas FC1 e FC2).	104
Tabela 5.2 - Comparativo entre as fermentações convencionais (FC) e extrativas (FE) realizadas com tempos de enchimento de 3 e 5 h e início do arraste de etanol por CO ₂ após 3 e 5 h.	109
Tabela 5.3 - Comparativo entre as fermentações convencionais (FC3, C _{SF} =200 g.L ⁻¹ e FC4, C _{SF} =220 g.L ⁻¹) e extrativas (FE4, C _{SF} =200 g.L ⁻¹ ; FE5, C _{SF} =220 g.L ⁻¹ e FE6, C _{SF} =240 g.L ⁻¹) em batelada alimentada realizadas com t _e = 5 h e início do arraste de etanol por CO ₂ com 3 h de fermentação.	114
Tabela 6.1 - Parâmetros do algoritmo genético empregado na otimização.	120
Tabela 6.2 - Valores dos coeficientes de rendimento e parâmetros cinéticos empregados na etapa de otimização.	120
Tabela 6.3 - Comparação entre a fermentação convencional otimizada (FC) e as fermentações extrativas otimizadas (FE).	126

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS.....	vi
Capítulo 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	16
1.1 Introdução	17
1.2 Objetivos.....	19
1.2.1 Objetivo geral.....	19
1.2.2 Etapas	19
1.3 Estrutura da tese	20
Capítulo 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1. Produção de Etanol no Brasil	22
2.2 Formas de condução dos processos fermentativos para produção de etanol	24
2.2.1 Processo em Batelada	25
2.2.2 Processo em Batelada Alimentada (<i>Fed-batch</i>).....	25
2.2.3 Processo Contínuo.....	27
2.3 Processo fermentativo industrial	28
2.4 Bioquímica da fermentação alcoólica	30
2.5 Fatores que afetam a fermentação alcoólica	31
2.5.1 Etanol.....	32
2.5.2 Temperatura	32
2.5.3 Substrato	33
2.5.4 pH.....	33
2.5.5 Contaminação bacteriana.....	33
2.6 Cinética da fermentação alcoólica	34
2.7 Modelagem da fermentação alcoólica.....	36
2.7.1 Modelos cinéticos de crescimento celular	37
2.7.1.1 Modelos cinéticos sem inibição	37
2.7.1.2 Modelos cinéticos com inibição.....	38
2.8 Fermentação Extrativa	41
2.8.1 Formas de remoção do produto inibidor	41
2.8.2 Estudos relacionados à remoção do produto inibidor por arraste gasoso (<i>gas stripping</i>).....	45
Capítulo 3. ESTUDO DA REMOÇÃO DE ETANOL DE SOLUÇÕES HIDROALCOÓLICAS POR ARRASTE COM CO₂.....	49
3.1 MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1.1 Equipamento empregado nos experimentos	50
3.1.2 Estudo preliminar do arraste de etanol a partir de uma solução hidroalcoólica	52
3.1.3 Caracterização da remoção de etanol por arraste – Influências da vazão de CO ₂ , concentração inicial de etanol e da temperatura da solução.....	53

3.1.4 Estudo da influência do volume da solução e da concentração de etanol durante a remoção de etanol por arraste com CO ₂	54
3.1.5 Metodologia analítica	55
3.1.6 Procedimento experimental empregado nos experimentos de arraste de etanol.....	55
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
3.2.1 Estudo preliminar do arraste - Efeito das condições operacionais sobre a remoção de etanol por arraste com CO ₂	56
3.2.2 Influências da vazão de CO ₂ , concentração inicial de etanol e da temperatura da solução no arraste de etanol por CO ₂	58
3.2.2.1 Análise dos resultados obtidos para a resposta fator de arraste (F _A).....	60
3.2.2.2 Análise dos resultados obtidos para a resposta constante de velocidade de remoção de etanol (k _E).....	65
3.2.2.3 Análise dos resultados obtidos para a resposta constante da velocidade de remoção de água (k _w)	70
3.2.3 Efeito do volume da solução e concentração de etanol durante o arraste por CO ₂	78

Capítulo 4. PRODUÇÃO DE ETANOL POR FERMENTAÇÃO EXTRATIVA EM BATELADA COM ARRASTE DE ETANOL POR CO₂: MODELAGEM E VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS	81
4.1.1 Equipamento	81
4.1.2 Microrganismo	82
4.1.3 Meio de cultura	82
4.1.4 Procedimento experimental empregado nas fermentações convencionais e extrativas ..	82
4.1.5 Metodologias Analíticas	83
4.1.6 Modelagem matemática da fermentação convencional em batelada	83
4.1.7 Ajuste do modelo cinético	85
4.1.8 Modelagem matemática da fermentação extrativa em batelada com arraste por CO ₂	85
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
4.2.1 Fermentação alcoólica convencional em batelada – Ajuste do modelo cinético e estimativa dos parâmetros	86
4.2.2 Fermentação extrativa em batelada - Simulação do processo e validação experimental	88
4.2.3 Efeito do CO ₂ no pH da fermentação	93

Capítulo 5. PRODUÇÃO DE ETANOL POR FERMENTAÇÃO EXTRATIVA EM BATELADA ALIMENTADA COM ARRASTE DE ETANOL POR CO₂: MODELAGEM E VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL

5.1 MATERIAL E MÉTODOS	97
5.1.1 Equipamento	97
5.1.2 Microrganismo e meio de cultura	99
5.1.3 Procedimento experimental batelada alimentada convencional e extrativa	99
5.1.4 Determinações analíticas	100
5.1.5 Modelagens matemáticas das fermentações convencional e extrativa.....	100
5.1.6 Ajuste do modelo cinético	102
5.1.7 Modelagem matemática da fermentação extrativa em batelada alimentada com arraste de etanol por CO ₂	102
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	103
5.2.1 Fermentação alcoólica convencional em batelada alimentada com diferentes tempos de enchimento: Ajuste do Modelo e estimativa de parâmetros cinéticos	103

5.2.2 Fermentação extrativa em batelada alimentada utilizando diferentes tempos de início do arraste e diferentes concentrações de substrato	106
5.2.3 Estudo da viabilidade celular durante as fermentações extrativas em batelada alimentada	116

Capítulo 6. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR FERMENTAÇÃO EXTRATIVA EM BATELADA ALIMENTADA UTILIZANDO CO₂ COMO GÁS DE ARRASTE..... 117

6.2 MATERIAL E MÉTODOS	118
6.2.1 Equipamento	118
6.2.2 Microrganismo e meio de cultura	118
6.2.3 Procedimento experimental das fermentações em batelada alimentada convencional e extrativa.....	118
6.2.4 Determinações analíticas	119
6.2.5 Otimização das fermentações convencional e extrativa em batelada alimentada.....	119
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	120
6.3.1 Otimização da fermentação convencional em batelada alimentada.....	120
6.3.2 Otimização da fermentação extrativa em batelada alimentada.....	122

Capítulo 7. CONCLUSÕES- 128

Capítulo 8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 131

REFERÊNCIAS..... 133

Capítulo 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 Introdução

Atualmente, a crescente demanda por combustíveis líquidos no sector dos transportes, juntamente com preocupações ambientais relacionadas ao aquecimento global e o possível esgotamento dos combustíveis fósseis levaram à busca de fontes de energia alternativas (NIGAM e SINGH, 2011). Neste cenário, o bioetanol surge como uma fonte de energia renovável e altamente sustentável, gerando uma quantidade menor de poluentes quando comparado aos derivados do petróleo (WHEALS et al., 1999; BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

O Brasil é o maior exportador de etanol do mundo e o segundo maior produtor depois dos Estados Unidos. O Brasil é o mais competitivo produtor de etanol do mundo (IBETO; OFOEFULE; AGBO, 2011). Entre todas as formas de produção de etanol, a rota de fermentação utilizando cana de açúcar como matéria-prima (etanol 1G) é o processo economicamente mais viável no Brasil. Isto é devido à localização geográfica, tipo de solo, variedades de cana-de-açúcar e à possibilidade de cultivo em todo o país (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

Nas destilarias brasileiras, a produção de etanol em processos contínuos ou descontínuos envolve a reciclagem da levedura, resultando em uma elevada densidade celular na dorna de fermentação (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008). Esta prática de fermentação proporciona altos rendimentos em etanol, com uma concentração de etanol no vinho ao final da fermentação em torno de 8-11% (v.v⁻¹) em fermentações com duração de 6 a 11 h.

No entanto, o baixo teor de etanol alcançado no vinho após a fermentação é consequência da inibição do produto. Durante a fermentação o etanol se acumula no caldo e atinge níveis tóxicos (AIBA; SHODA; NAGATANI, 1968; LLOYD et al., 1993), agindo como inibidor direto não competitivo do metabolismo (MAIORELLA; BLANCH; WILKE, 1983). Como resultado, as velocidades de crescimento celular e de produção de etanol diminuem, limitando a produtividade do processo.

Assim, torna-se necessário iniciar o processo fermentativo empregando mosto em concentrações relativamente diluídas, para alcançar a conversão completa dos açúcares presentes num intervalo de tempo razoável (TAYLOR et al., 1995). Com isso, um grande volume de água é inserido no processo fermentativo, tornando-se necessário o uso de dornas com grandes volumes a fim de assegurar alta produção temporal de etanol.

Outra consequência da baixa concentração de etanol no vinho é durante a etapa de destilação, a qual apresenta uma elevada demanda energética (aproximadamente 2,6 kg de vapor por kg de etanol produzido) para obtenção de etanol hidratado ou anidro (EZEJI; QURESHI; BLASCHEK, 2003; MOHANA; ACHARYA; MADAMWAR, 2009; MORANDIN et al., 2011).

Após a fermentação, o vinho é destilado, originando uma mistura azeotrópica de etanol hidratado 95% (v/v). Ao final da destilação é gerado um grande volume de vinhaça, um resíduo com elevada demanda bioquímica de oxigênio e rico em minerais, como potássio, cálcio, magnésio, nitrogênio e fósforo (MOHANA; ACHARYA; MADAMWAR, 2009; AMORIM et al., 2011).

Uma forma de diminuir o efeito da inibição e obter um elevado rendimento é a utilização da fermentação extrativa com arraste gasoso, onde parte do etanol é extraído do caldo de fermentação durante o processo (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007; SCHÜGERL, 2000; TAYLOR et al., 1995). O arraste gasoso utilizado durante a fermentação é um método atraente para a produção em larga escala, devido à sua relativa simplicidade e a possibilidade de empregar como gás de arraste o dióxido de carbono gerado na própria fermentação.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Baseado no que foi exposto, a presente tese de doutorado teve como objetivo geral estudar a produção de etanol de sacarose empregando fermentação extrativa com arraste de etanol por dióxido de carbono. Para avaliar o efeito da remoção de etanol durante a fermentação foram realizadas as modelagens das fermentações extrativas em batelada e em batelada alimentada, considerando a remoção de etanol por arraste gasoso. A partir dos modelos obtidos foram realizadas simulações para avaliar o comportamento das fermentações com remoção de etanol, bem como a otimização do processo em batelada alimentada.

1.2.2 Etapas

As etapas desenvolvidas que levaram à conquista do objetivo geral foram as seguintes:

- Avaliação experimental e modelagem do arraste de etanol de soluções hidroalcoólicas com CO₂;
- Modelagem matemática e a simulação da produção de etanol do processo fermentativo em batelada, considerando a remoção de etanol por arraste com CO₂,
- Verificação experimental do efeito da remoção de etanol por arraste gasoso durante a fermentação em batelada,
- Modelagem matemática do processo fermentativo em batelada alimentada, considerando a remoção de etanol por arraste com CO₂,
- Simulações da fermentação extrativa em batelada alimentada,
- Verificação experimental do efeito da remoção de etanol durante a fermentação extrativa em batelada alimentada,
- Otimização da fermentação extrativa em batelada alimentada empregando CO₂ como gás de arraste visando empregar mosto concentrado;
- Validação experimental das condições otimizadas da fermentação extrativa de etanol.

1.3 Estrutura da tese

A presente tese encontra-se dividida em oito capítulos, a saber:

- **Capítulo 1.** Introdução e Objetivos do trabalho
- **Capítulo 2.** Revisão Bibliográfica
- **Capítulo 3.** Estudo do arraste de etanol de soluções hidroalcoólicas com CO₂
- **Capítulo 4.** Produção de etanol por fermentação extrativa em batelada com arraste de etanol por CO₂: modelagem e validação experimental
- **Capítulo 5.** Produção de etanol por fermentação extrativa em batelada alimentada com arraste de etanol por CO₂: modelagem e validação experimental
- **Capítulo 6.** Otimização da produção de etanol por fermentação extrativa em batelada alimentada utilizando CO₂ como gás de arraste
- **Capítulo 7.** Conclusões
- **Capítulo 8.** Sugestões para trabalhos futuros
- Referências Bibliográficas

Capítulo 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produção de Etanol no Brasil

No Brasil, o uso do álcool combustível teve início por volta de 1900, mas somente em meados da década de 1970 com a crise do petróleo e a criação do Programa Nacional do Álcool (Proálcool), a produção em larga escala de álcool combustível passou a ser estimulada.

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de etanol, tendo em primeiro lugar os Estados Unidos (IBETO; OFOEFULE; AGBO, 2011). A produção industrial de etanol ocorre principalmente por via fermentativa. Um dos fatores que torna a produção de etanol por fermentação mais econômica é o grande número de matérias-primas naturais existentes em todo o país. Qualquer matéria que contenha açúcar ou outro carboidrato constitui-se em matéria-prima para obtenção de etanol, o qual é produzido principalmente por meio da conversão de açúcares, de amido ou celulose (AQUARONE et al., 2001; SZWARC, 2008).

Do ponto de vista de fermentação, as matérias-primas podem ser agrupadas em diretamente fermentescíveis, que não necessitam de conversão prévia do carboidrato e as indiretamente fermentescíveis, que precisam sofrer conversão prévia do carboidrato antes da fermentação de modo a torná-lo assimilável pela levedura (MENEZES, 1980).

O açúcar é a matéria-prima que possui o método de produção de etanol mais simplificado, pois a fermentação ocorre de maneira direta, sem necessitar de outras etapas químicas ou biológicas de preparo do substrato. Já o amido, pelo fato de ser um polissacarídeo, necessita de pré-tratamento, como cozimento e hidrólise enzimática, a fim de formar monossacarídeos os quais serão fermentados até a formação do etanol. Por fim, o material lignocelulósico, assim como o amido, também é um polissacarídeo e necessita da hidrólise enzimática ou química para a formação de monossacarídeos fermentáveis para a produção de etanol (NIGAN e SINGH, 2011; BALAT e BALAT, 2009).

No Brasil, a principal fonte de matéria-prima empregada na produção de etanol é a cana-de-açúcar. A cana se destaca como a principal matéria-prima utilizada na fermentação alcoólica, devido a sua disponibilidade e custo, bem como por ser uma fonte rica de carbono com elevada concentração de açúcares. Além disso, estudos comprovam que a cana possui maior produtividade anual em etanol por área colhida, se comparada a outras

fontes de açúcares (ATALA, 2004). De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento – Conab (2015), durante a safra 2015/2016 658,7 milhões de toneladas de cana-de-açúcar foram moídas no setor sucroalcooleiro, resultando em uma produção de 34,6 milhões de toneladas de açúcar e um volume de etanol de 29,21 bilhões de litros de etanol. Deste total, 11,03 bilhões de litros foram de etanol anidro (utilizado na mistura com a gasolina) e 18,19 bilhões de litros de álcool hidratado (utilizado nos veículos *flex fuel*). A região sudeste foi responsável por 58,1% do total de etanol produzido no país e com destaque para o estado de São Paulo que sozinho produziu cerca de 13,84 bilhões de litros, 47,4% de etanol na safra.

Nas destilarias brasileiras, o etanol é produzido pela fermentação de mostos preparados a partir da mistura de caldo de cana-de-açúcar ou água e melaço em diferentes proporções de modo a se obter uma concentração total de açúcares fermentáveis de cerca de 20°Brix (180 g.L⁻¹ de sacarose, considerando 90% de pureza) (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

O melaço de cana é um subproduto da produção de açúcar, apresenta em sua composição, água, carboidratos fermentescíveis (cerca de 45-60% de sacarose e 5-20% de glicose e frutose), compostos não açucarados de origem orgânica (aminoácidos, vitaminas e proteínas) e minerais (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

O processo integrado de produção de açúcar e etanol é o mais empregado pelas indústrias sucroalcooleiras no Brasil. Cerca de 70% das instalações industriais são plantas produtoras de açúcar com destilarias anexas e as demais são destilarias autônomas. Além do açúcar e do etanol, a energia elétrica também passou a fazer parte dos produtos gerados no setor sucroalcooleiro (HENDLER, 2011).

A **Figura 2.1** ilustra como as partes deste sistema se relacionam. As operações de recepção e preparo da cana, extração, tratamento e concentração do caldo são essencialmente as mesmas tanto para a produção do etanol, como para a produção do açúcar.

grande dispêndio de tempo, além de ter excesso de manipulação (SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

2.2.1 Processo em Batelada

Durante uma fermentação em batelada, não há entrada nem saída de massa da dorna, a menos de antiespumante e de gases. Se não ocorrer retirada de amostras ou evaporação de produto, o volume reacional permanece constante durante o processo.

O processo de fermentação em batelada clássico foi muito empregado na produção de etanol nas destilarias brasileiras até o início dos anos 60. Este processo pode ser operado no sistema de cortes ou no sistema de cultura pura (pé-de-cuba). O sistema de cortes consiste em realizar a primeira fermentação, então o volume do caldo é dividido em duas dornas, completando o volume de ambas com mosto e deixando fermentar até o término do substrato. No sistema de cultura pura, em cada fermentação se utiliza uma nova cultura pura, a qual é adicionada ao mosto até completar o volume da dorna e deixando fermentar (TOSETTO, 2002).

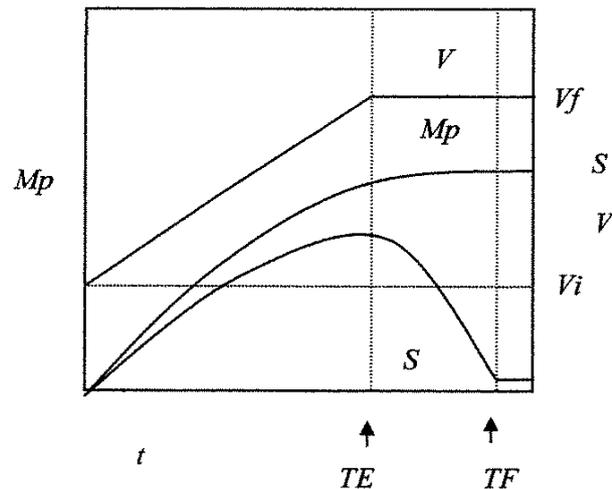
Para cada batelada o reator tem que ser limpo, o mosto e o inóculo devem ser carregados ao sistema para dar início ao processo fermentativo. Assim, os processos em modo batelada demandam tempo muito longo (MAIORELLA; BLANCH; WILKE, 1981).

2.2.2 Processo em Batelada Alimentada (*Fed-batch*)

Este processo, é uma variante do processo em batelada (TOSETTO, 2002). Este tipo de processo consiste na adição de um ou mais nutrientes no fermentador durante o cultivo e os produtos formados permanecem no fermentador até o final do processo. Na batelada alimentada, pode-se realizar o controle da vazão de alimentação do substrato com a finalidade de controlar sua concentração no biorreator e deslocar o metabolismo microbiano para uma determinada via de interesse, na qual ocorre maior formação do produto de interesse. A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo e a adição de substrato pode ser de forma contínua ou intermitente. Uma vazão de alimentação é estabelecida de forma que ao final do processo seja completado o volume útil do reator (CARVALHO e SATO, 2001).

A **Figura 2.2** ilustra os perfis típicos de substrato, do produto e do volume de um processo em batelada alimentada.

Figura 2.2 - Perfis de substrato, produto e volume de um processo em batelada alimentada. V : volume de meio, S : concentração de substrato, Mp : massa de produto em função do tempo para um processo em batelada alimentada com vazão de alimentação constante, TE : tempo de enchimento da dorna em horas e TF : tempo de fermentação.



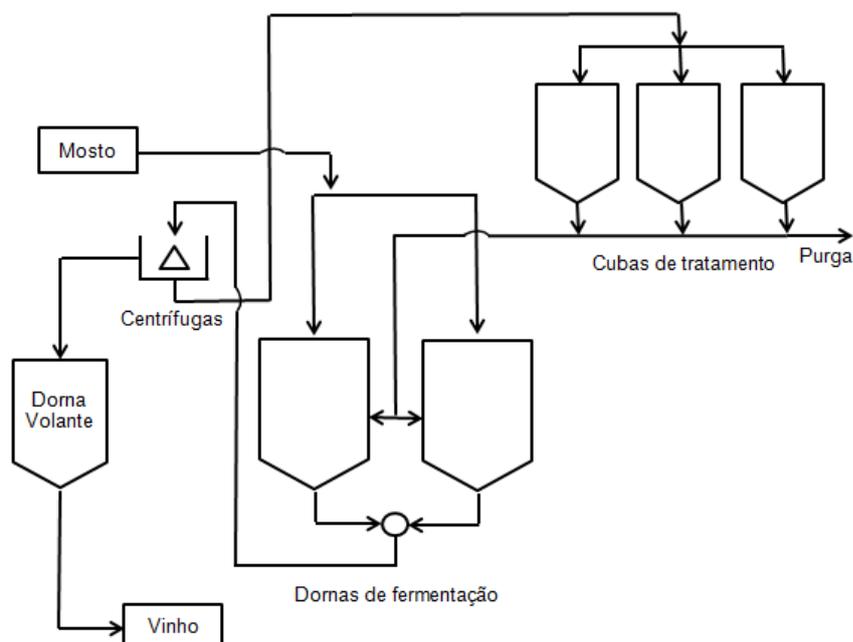
Uma inovação do processo de fermentação alcoólica em batelada alimentada foi o emprego da etapa de tratamento ácido do creme de levedura. Esta etapa tem como finalidade eliminar contaminantes e possibilitar a utilização deste como inóculo para o próximo ciclo de fermentação. Neste caso, há o reaproveitamento das células de levedura, as quais são separadas do vinho por centrifugação (STECKELBERG, 2001). O processo “Melle-Boinot” no qual se recicla as leveduras foi introduzido com o intuito de aumentar a produtividade do processo fermentativo em relação à operação em batelada, a qual apresenta baixa produtividade.

Segundo Tosetto (2002), o processo fermentativo em batelada alimentada apresenta algumas vantagens como:

- economia de açúcar, devido a menor reprodução celular,
- elevado rendimento em etanol;
- eliminação de contaminantes pela centrifugação do vinho;
- fermentação mais pura, devido ao tratamento ácido do creme de levedura;
- eliminação do emprego de cultura pura no preparo do pé-de-cuba, reduzindo a complexidade do processo fermentativo.

Na **Figura 2.3** é apresentado o esquema do processo fermentativo em batelada alimentada.

Figura 2.3 - Esquema simplificado do processo de fermentação em batelada alimentada.



Fonte: Adaptado de Reis (2011).

2.2.3 Processo Contínuo

Segundo Carvalho (1996) com o esgotamento tecnológico do processo batelada alimentada, a fermentação alcoólica contínua surgiu como uma alternativa industrial viável.

O processo de fermentação contínuo se caracteriza por possuir uma alimentação contínua de meio de cultura (mosto) a uma determinada vazão constante, sendo o volume de reação mantido constante através da retirada contínua de caldo fermentado (FACCIOTTI, 2001). Neste processo, o volume de meio no fermentador deve ser mantido constante para que o sistema atinja a condição de estado estacionário, condição na qual as variáveis (concentração de células, de substrato limitante e de produto) permanecem constantes ao longo do tempo de operação do sistema. A produção de etanol empregando sistemas contínuos pode ocorrer com tanques ligados em série ou tanques individuais e com ou sem recirculação das células de levedura.

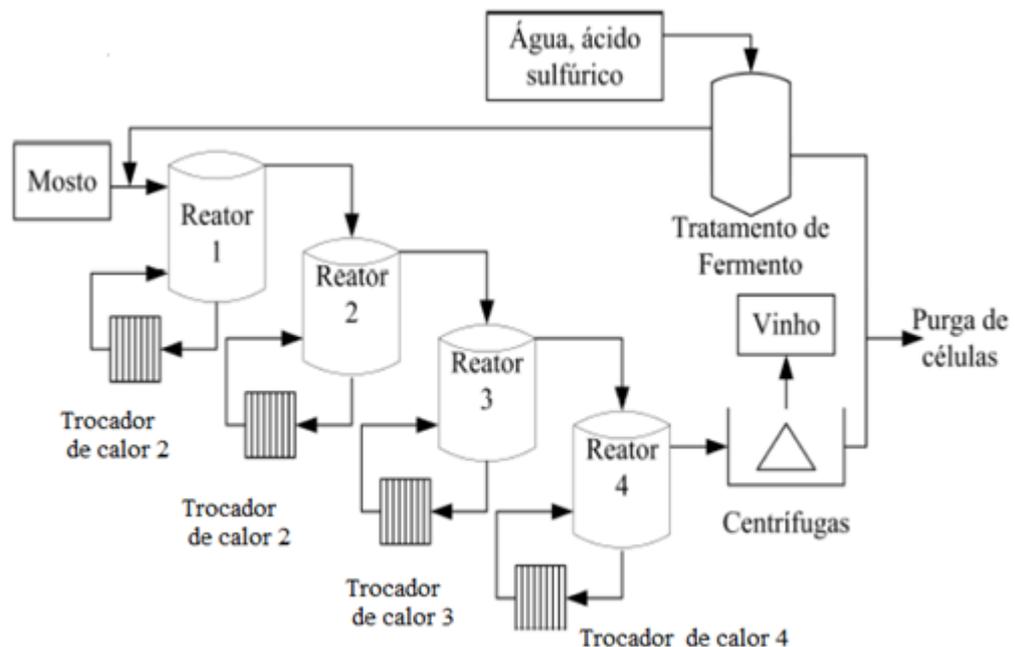
Segundo Facciotti (2001), entre as grandes vantagens do modo contínuo de operação estão:

- redução de tempos mortos, levando a um aumento na produtividade;
- obtenção de um meio fermentado mais uniforme, o que facilita o processo de recuperação do produto;
- maior facilidade de utilização de controladores;
- redução de mão-de-obra empregada no processo.

O processo de fermentação alcoólica contínua pode ser dividido em 3 partes: unidade de tratamento ácido, unidade de separação de células de leveduras e fermentadores.

Na **Figura 2.4** é apresentado o esquema do processo fermentativo em modo contínuo.

Figura 2.4 - Esquema simplificado do processo contínuo de fermentação.



Fonte: Adaptado de Reis (2011).

2.3 Processo fermentativo industrial

Nas destilarias brasileiras, o etanol é produzido por fermentação de mostos preparados a partir de misturas de caldo de cana-de-açúcar e melão em proporções

diferentes, a fim de se obter uma concentração de açúcares fermentescíveis com cerca de 20°Brix (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

Aproximadamente, 85% das destilarias utilizam o processo fermentativo em batelada alimentada, enquanto que apenas 15% operam com o modo contínuo (GODOY et al., 2008). A fermentação é realizada em dornas de grande volume e a levedura é reciclada no processo, o que resulta em uma alta densidade celular no fermentador (10-15% m/v) (GODOY et al., 2008). As fermentações são realizadas simultaneamente em várias dornas durante um período de 6 a 12 horas, com temperaturas na faixa de 32-35 °C. A concentração final de etanol no caldo de fermentação é de até 11°GL (% v/v), o que corresponde a um rendimento médio de etanol entre 90-92% em relação ao teórico (WHEALS et al., 1999; AMORIM et al., 2011).

Após a fermentação, o mosto fermentado é centrifugado para remoção das leveduras e na sequência o vinho delevedurado segue para a etapa de destilação. O concentrado de células de levedura recebe um tratamento com ácido sulfúrico, visando reduzir a contaminação bacteriana. Após 2-3 h, as células de levedura retornam às dornas de fermentação para iniciar um novo ciclo (AMORIM et al., 2011). Assim, grandes quantidades de biomassa de levedura são recicladas diariamente nas destilarias. Ao longo da safra que dura de 200 a 300 dias, as células de levedura são recicladas de 400 a 600 vezes (AMORIM et al., 2011).

Segundo Amorim et al. (2011), em razão do baixo teor de etanol no vinho, ao final da fermentação são gerados grandes volumes de vinhaça, cerca de 12 litros de vinhaça para cada litro de etanol produzido.

A vinhaça, principal resíduo gerado nas destilarias, apresenta características como elevada demanda bioquímica de oxigênio (variando de 20.000 a 35.000 mg.L⁻¹), grande quantidade de matéria orgânica, alta temperatura na saída dos destiladores (85 a 90°C), as quais fazem da vinhaça um resíduo com grande poder poluidor quando descartada diretamente na água. Sua composição é extremamente variável, mas, basicamente, apresenta-se como uma suspensão aquosa contendo sólidos orgânicos e minerais. É formada por 93,5% de água, 4,6% de matéria orgânica e 1,9% de substâncias minerais (ANA, 2009; GASI e SANTOS, 2000; CETESB, 1986; ROSSETO, 1987). Com relação à composição, a vinhaça apresenta fósforo, nitrogênio, potássio, óxidos, sulfatos, substâncias estas necessárias à recomposição dos solos agrícolas da agroindústria (SILVA e CABEDA, 2006).

A vinhaça tem sido usada como alternativa parcial para substituição da adubação mineral em lavouras, principalmente de cana-de-açúcar (CRISPIM, 2000; LEONEL et al., 1999).

Quando aplicada no solo, a vinhaça promove melhoria da fertilidade, entretanto, as quantidades aplicadas não devem ultrapassar a capacidade do solo em reter íons, isto é, as dosagens devem ser mensuradas de acordo com as características de cada solo. O solo possui quantidades desbalanceadas de elementos minerais e orgânicos, podendo ocorrer a lixiviação de vários destes íons, sobretudo do nitrato e do potássio (SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007).

2.4 Bioquímica da fermentação alcoólica

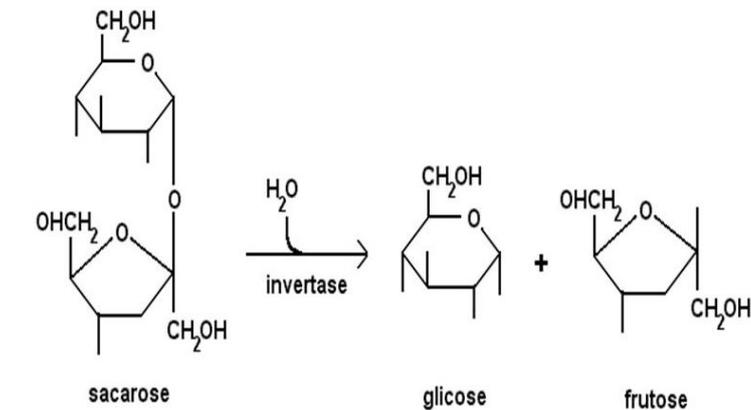
Bioquimicamente, a fermentação alcoólica é um processo de conversão anaeróbia da glicose em etanol, realizado principalmente pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (BASTOS, 2010).

Segundo Amorim et al. (1996), a levedura realiza a fermentação dos açúcares com o objetivo de conseguir a energia química necessária à sua sobrevivência, sendo o etanol apenas um subproduto desse processo.

O etanol apenas pode ser formado pelas leveduras a partir de monossacarídeos, sendo portanto necessário decompor a sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) em D-glicose e D-frutose ($C_6H_{12}O_6$).

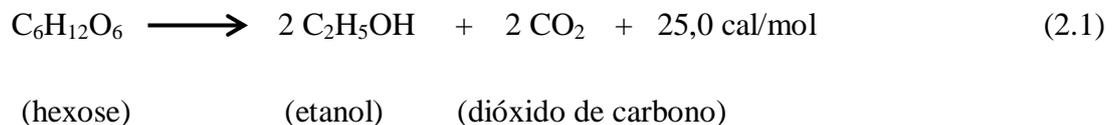
O processo bioquímico pelo qual ocorre a fermentação alcoólica pode ser dividido em duas etapas. Na primeira etapa ocorre a hidrólise da sacarose (**Figura 2.5**), convertendo-a em glicose e frutose pela ação da enzima invertase expressada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (LOPES e BORGES, 2009).

Figura 2.5 – Reação de hidrólise da sacarose pela enzima invertase em meio aquoso.



Fonte: Adaptado de Torres e Marzzoco (1999).

Em uma segunda etapa, as moléculas de hexose (glicose e frutose) formadas pela inversão ou já presentes no mosto são submetidas à fermentação, num processo anaeróbico em que se transformam em álcool etílico e dióxido de carbono, conforme a **Equação (2.1)** (LOPES e BORGES, 2009).



Pela estequiometria da reação, o coeficiente de rendimento teórico da fermentação alcoólica é 0,511 kg de etanol por kg de hexose consumida e de 0,489 kg de CO₂ por kg de hexose. Porém, na prática, este valor não é observado devido a utilização de parte da hexose para o crescimento celular e produção de outros compostos como glicerol e álcoois superiores, substâncias necessárias para síntese de material celular e manutenção da levedura.

2.5 Fatores que afetam a fermentação alcoólica

Durante a produção de etanol, alguns fatores podem afetar negativamente o processo fermentativo, entre eles as altas concentrações de etanol, temperatura elevada, concentração de substrato, pH e a contaminação bacteriana.

2.5.1 Etanol

O etanol acumulado no caldo durante a fermentação é o principal componente tóxico para a levedura (MAIORELLA; BLANCH; WILKE, 1983). Em concentrações acima de 40 g.L^{-1} , o etanol passa a afetar o crescimento celular e conseqüentemente a velocidade de produção de etanol reduzindo, portanto, a produtividade volumétrica do processo (AIBA; SHODA; NAGATANI, 1968).

De acordo com Lloyd et al. (1993) e Ly; Block; Longo (2002), uma concentração de etanol no caldo de fermentação superior a 8% v/v (cerca de 63 g.L^{-1}) pode causar danos nos lipídeos da membrana das células e em outras organelas. Em concentrações de etanol em torno de 95 g.L^{-1} o crescimento celular das leveduras é completamente inibido (MAIORELLA; BLANCH; WILKE, 1984).

2.5.2 Temperatura

De acordo com Albers et al. (2002), o calor liberado na conversão da glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) em etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) e CO_2 é de $697,7 \text{ kJ/kg}$ de glicose consumida. Devido a essa característica exotérmica, a temperatura da fermentação deve ser controlada para garantir a produtividade esperada e evitar a proliferação de bactérias contaminantes.

As fermentações industriais devem ser conduzidas com temperatura na faixa de $32\text{-}35 \text{ }^\circ\text{C}$ (WHEALS et al., 1999). No entanto, a temperatura de fermentação em unidades industriais produtoras de etanol pode ultrapassar $40 \text{ }^\circ\text{C}$ em casos de controle ineficiente da temperatura (RIVERA et al., 2006). Em temperaturas elevadas, a levedura torna-se mais vulnerável à toxidez exercida pelo etanol produzido, ocasionando queda na viabilidade (LOPES e PARAZZI, 2007).

Na maioria das destilarias brasileiras, o resfriamento das dornas de fermentação é realizado na parte externa da dorna. O meio reacional a alta temperatura e a utilidade fria gerada por um sistema de resfriamento trocam calor entre si em um trocador de calor de placas em circuito fechado. O sistema de resfriamento é, em geral, composto por torres de resfriamento que suprem utilidade fria a uma temperatura dependente da temperatura de bulbo úmido das condições climáticas locais (MAGAZONI, 2011).

2.5.3 Substrato

A levedura também sofre inibição pelo substrato. As linhagens de leveduras normalmente utilizadas nos processos industriais apresentam uma osmotolerância limitada. O estresse induzido pelo aumento da osmolaridade externa leva à redução do crescimento e perda da viabilidade celular, devido às perturbações no gradiente osmótico através da membrana plasmática (DIAS, 2008; SOUZA, 2009; SCHULZ, 2010). De acordo com Thatipamala; Rohani; Hill (1992), os efeitos inibitórios são observados em concentrações de substrato acima de 150 g.L⁻¹. O emprego da fermentação em batelada alimentada possibilita contornar a inibição pelo substrato, uma vez que na fermentação industrial a concentração máxima do substrato na dorna normalmente não excede 70 g.L⁻¹ (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

2.5.4 pH

O pH é um fator significativo para as fermentações industriais devido a sua importância, tanto no controle da contaminação bacteriana, quanto ao seu efeito sobre o crescimento da levedura, velocidade de fermentação e formação de subprodutos (AMORIM et al., 1996). O pH ótimo utilizado nas usinas fica na faixa de 4 a 5. Nos mostos industriais, os valores de pH geralmente se encontram na faixa de 4,5 a 5.

Nos processos industriais, um tratamento é realizado para reutilização das leveduras, onde ácido sulfúrico é utilizado durante uma ou duas horas para redução da contaminação microbiana mantendo o pH no tanque de tratamento na faixa de 2 a 3 (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001; ROMÃO, 2011). Assim, mesmo que esse tratamento seja estressante para a levedura, o uso de ácido é benéfico ao processo, devido à redução significativa no número de bactérias contaminantes (AMORIM et al., 1996).

2.4.5 Contaminação bacteriana

Quando as condições de temperatura, acidez, concentração de açúcares, qualidade da cana, assepsia, preparação do inóculo e do mosto são impróprias, outros tipos de microrganismos podem se desenvolver na dorna de fermentação. Esses microrganismos competem com as leveduras pelo mesmo substrato, gerando subprodutos inibidores do

crescimento da levedura (DARÉ, 2008).

Dentre os inconvenientes causados pelos contaminantes, destacam-se o consumo de açúcar, a inversão da sacarose, o aumento da acidez, a produção de biopolímeros (gomos), a floculação de leveduras e a formação de espumas (LOPES e PARAZZI, 2007).

As bactérias lácticas, que são os principais contaminantes da fermentação, produzem ácido láctico e acético que tornam o meio estressante para as leveduras que passam a produzir menos etanol e mais biomassa (DARÉ, 2008).

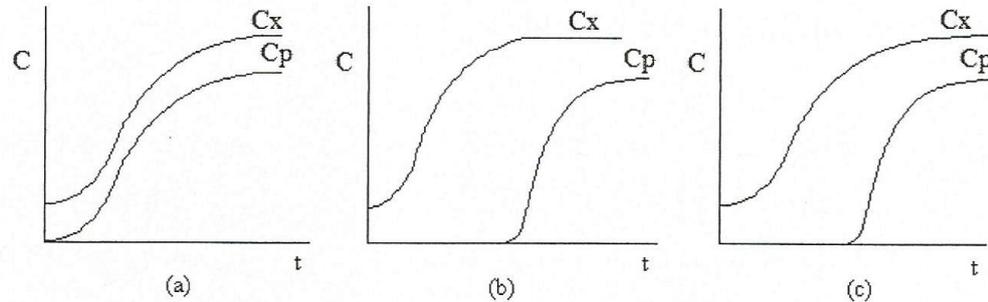
2.6 Cinética da fermentação alcoólica

Segundo Andrietta, Migliari e Andrietta (1999), o conhecimento da cinética é essencial para o entendimento das velocidades de transformação que ocorrem nas dornas de fermentação. O intuito do estudo da cinética de processos microbianos é de quantificar as velocidades de crescimento celular, consumo de substrato, formação de produtos e demais parâmetros relacionados. A partir deste estudo, pode-se compreender ainda a influência em que fatores como pH, temperatura, agitação, inibidores, entre outros podem exercer na cinética da fermentação.

O conhecimento da cinética do processo de fermentação alcoólica é imprescindível não somente para a correção de falhas, mas também para elaborar uma estratégia de controle eficiente para as unidades industriais de produção de etanol visando sobretudo, maximizar suas eficiências (ANDRIETTA, 1994).

A produção de um dado metabólito pode estar intimamente associada ao crescimento celular, de forma que somente haverá formação de produto quando ocorrer crescimento. Há três possibilidades de ocorrência de produto em fermentações: produção associada ao crescimento (Tipo 1), produção parcialmente associada ao crescimento (Tipo 2) e produção dissociada do crescimento (Tipo 3), conforme ilustrado na **Figura 2.6**, sendo “P”, o produto e “X”, as células (BASTOS, 2010).

Figura 2.6 - Classificação de crescimento associado à formação de produtos, sendo (a) Produção associada ao crescimento (Tipo 1), (b) Produção parcialmente associada ao crescimento (Tipo 2) e (c) Produção dissociada ao crescimento (Tipo 3).



Luedeking e Piret (1959) propuseram o modelo descrito pela **Equação (2.2)** para representar a formação do produto em reator batelada:

$$r_p = \alpha \cdot r_x + \beta \cdot C_x \quad (2.2)$$

$\left(\begin{array}{c} \text{termo de produção} \\ \text{associado ao} \\ \text{crescimento} \end{array} \right) + \left(\begin{array}{c} \text{termo de produção} \\ \text{associado a} \\ \text{massa celular} \end{array} \right)$

Assim,

$$\text{Tipo 1: } \mu_p = \alpha \cdot \mu_x \quad (2.3)$$

$$\text{Tipo 2: } \mu_p = \alpha \cdot \mu_x + \beta \quad (2.4)$$

$$\text{Tipo 3: } \mu_p = \beta \quad (2.5)$$

O modelo de Luedeking-Piret é o que apresenta maior aplicação para explicar o surgimento do produto. Microrganismos “Tipo 1” são aqueles em que o termo associado ao crescimento (α) é muito superior ao termo associado a quantidade de biomassa (β) e reflete os casos em que o surgimento do produto está fortemente associado ao crescimento celular. Por outro lado, os microrganismos “Tipo 3” são aqueles em que o parâmetro β é muito superior a α , caracterizando a produção de metabólitos secundários ou surgimento de produtos na fase estacionária de crescimento. Os microrganismos do “Tipo 2” apresentam um comportamento intermediário (BASTOS, 2010).

A produção de etanol pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* é caracterizada pelo Tipo 1, onde a produção de etanol está associada ao crescimento celular, ou seja, a geração do etanol ocorre simultaneamente ao processo de multiplicação celular.

2.7 Modelagem da fermentação alcoólica

O uso da modelagem matemática diminui os custos do desenvolvimento do processo de fermentação alcoólica, pois reduz o trabalho experimental desnecessário e permite o estudo dos vários parâmetros do processo e as interações destes por meio de simulação. Além disso, fornece uma melhor compreensão do processo, o que é útil para uma etapa posterior de otimização e controle do processo fermentativo (WANG, 2000 e RIVERA et al., 2006).

Pelo ponto de vista conceitual, a descrição da fase celular em um modelo pode ser feita com diferentes graus de complexidade. Os modelos cinéticos normalmente usados em fermentações podem ser divididos em (BONOMI e SCHMIDELL, 2001):

Modelos não estruturados: o material celular é representado por uma única variável (massa celular ou número de células), sem considerar variações de componentes intracelulares, ou usar tais variações na previsão do comportamento cinético do processo.

Modelos estruturados: as células são descritas com maiores detalhes, considerando os componentes intracelulares, permitindo descrever o estado das células e sua adaptação às mudanças do meio ambiente.

Quanto à heterogeneidade da população microbiana, os modelos cinéticos também são classificados em duas categorias, descritas a seguir.

Modelos não segregados: a população celular é considerada homogênea, isto é, todas as células apresentam o mesmo comportamento.

Modelos segregados: as células são consideradas discretas, como indivíduos de uma população heterogênea, com distribuição de idade, de tamanho e de propriedades celulares (BONOMI e SCHMIDELL, 2001).

De acordo com Bonomi e Schmidell (2001), os modelos segregados e estruturados oferecem uma descrição mais detalhada do comportamento cinético do processo fermentativo que os não segregados e os não estruturados, mas à custa de maior complexidade e maior esforço computacional. Porém, em muitos casos, a qualidade e a reprodutibilidade dos resultados obtidos não justificam a complexidade e a perda de generalidade introduzida.

Assim, 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).

A fermentação alcoólica apresenta uma cinética complexa, onde a velocidade de fermentação muda continuamente com o consumo do substrato e formação do produto. Assim, os modelos do tipo não-estruturado e não-segregado são os mais encontrados na literatura para descrever a fermentação alcoólica (MOULIN et al., 1980). No entanto, a imprecisão que possa ocorrer, devido ao uso desses modelos mais simples é compensada pela facilidade de obtenção e diminuição do número de parâmetros cinéticos necessários (ANDRIETIA, 1994).

2.7.1 Modelos cinéticos de crescimento celular

Na literatura estão disponíveis vários modelos cinéticos de crescimento celular não estruturados e não segregados. Esses modelos podem ser divididos em dois grupos: os livres de inibição; e os que consideram a parcela de inibição pelo substrato (S), produto (P) ou mesmo pelas próprias células (X). Na sequência são apresentados alguns desses modelos (BADINO e CRUZ, 2012).

2.7.1.1 Modelos cinéticos sem inibição

Modelo de Monod (1942):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C_S}{K_S + C_S} \quad (2.6)$$

onde:

μ_{\max} é a velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1});

C_S é a concentração de substrato limitante ($g.L^{-1}$);

K_S é a constante de saturação ($g.L^{-1}$);

Modelo de Moser (1958):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C_S^u}{K_S + C_S^u} \quad (2.7)$$

onde:

μ_{\max} é a velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1});

C_s é concentração de substrato limitante ($g.L^{-1}$);

K_s é a constante de saturação ($g.L^{-1}$);

u é uma constante cinética do modelo.

Modelo de Contois (1959):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C_s}{K_s \cdot C_x + C_s} \quad (2.8)$$

onde:

C_s é a concentração de substrato limitante ($g.L^{-1}$);

C_x é a concentração celular ($g.L^{-1}$);

K_s é a constante de saturação ($g.L^{-1}$);

2.7.1.2 Modelos cinéticos com inibição

A presença de um inibidor no meio reacional diminui a velocidade específica de crescimento celular (μ). O inibidor pode ser o próprio substrato limitante (S), um produto gerado pelas células ou até a presença das células em alta concentração no meio fermentativo.

a) Inibição pelo substrato

Modelo de Andrews (1968):

Este é o modelo mais aceito para descrever a inibição pelo substrato. É também conhecido como modelo de Monod com inibição pelo substrato.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C_s}{K_s + C_s + \frac{C_s^2}{K_{IS}}} \quad (2.9)$$

onde:

μ_{\max} : velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1});

C_s é concentração de substrato limitante ($g.L^{-1}$);

K_s : constante de saturação ($g.L^{-1}$);

K_{IS} : constante de inibição pelo substrato ($g.L^{-1}$);

Modelo de Wu (1988):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C_S}{K_S + C_S + C_S \cdot \left(\frac{C_S}{K_{IS}}\right)^v} \quad (2.10)$$

onde:

μ_{\max} : velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1});

C_S é concentração de substrato limitante ($g.L^{-1}$);

K_S é a constante de saturação ($g.L^{-1}$);

K_{IS} é a constante de inibição pelo substrato ($g.L^{-1}$);

v é uma constante do modelo (-).

b) Inibição pelo produto

Modelo de Aiba (1968):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C_S}{K_S + C_S} e^{(-K_{IP} \cdot C_P)} \quad (2.11)$$

onde:

μ_{\max} : velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1});

C_S é concentração de substrato limitante ($g.L^{-1}$);

K_S : constante de saturação ($g.L^{-1}$);

K_{IP} é a constante de inibição pelo produto ($g.L^{-1}$);

C_P é a concentração de produto ($g.L^{-1}$).

Modelo de Levenspiel (1980):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot \left(1 - \frac{C_P}{C_P^*}\right)^n \quad (2.12)$$

onde:

μ_{\max} : velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1});

C_S é concentração de substrato limitante ($g.L^{-1}$);

K_S : constante de saturação ($g.L^{-1}$);

C_P é a concentração de produto ($g.L^{-1}$);

C_P^* é a concentração máxima de etanol a partir da qual cessa o crescimento celular ($g.L^{-1}$);

n é uma constante adimensional.

Modelo de Hoppe e Hansford (1982):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot \frac{K_{IP}}{K_{IP} + C_P} \quad (2.13)$$

onde:

μ_{\max} : velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1});

C_S é concentração de substrato limitante ($g.L^{-1}$);

K_S : constante de saturação ($g.L^{-1}$);

C_P é a concentração de produto ($g.L^{-1}$).

K_{IP} é a constante de inibição pelo produto.

c) Inibição por células

Modelo de Lee (1983):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C_S}{K_S + C_S} \cdot \left(1 - \frac{C_X}{C_X^*}\right)^m \quad (2.14)$$

onde:

μ_{\max} : velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1});

C_S é concentração de substrato limitante ($g.L^{-1}$);

K_S : constante de saturação ($g.L^{-1}$);

C_X é a concentração celular ($g.L^{-1}$);

C_X^* é a concentração máxima de células a partir da qual cessa o crescimento celular ($g.L^{-1}$);

d) Inibição mista

O comportamento cinético de alguns bioprocessos pode ser explicado pela ocorrência de inibição mista envolvendo substrato/produto, substrato/células, produto/células ou até substrato/produto/células.

Modelo de Andrews (1968)/Levenspiel (1980):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C_S}{K_S + C_S + \frac{C_S^2}{K_{IS}}} \cdot \left(1 - \frac{C_P}{C_P^*}\right)^n \quad (2.15)$$

onde:

μ_{\max} : velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1});

C_S é concentração de substrato limitante (g.L^{-1});

K_S : constante de saturação (g.L^{-1});

K_{IS} : constante de inibição pelo substrato (g.L^{-1});

C_P é a concentração de produto (g.L^{-1}).

C_P^* é a concentração máxima de etanol a partir da qual cessa o crescimento celular (g.L^{-1});

n : constante adimensional.

Modelo de Andrews (1968)/Hoppe e Hansford (1982):

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C_S}{K_S + C_S + \frac{C_S^2}{K_{IS}}} \cdot \frac{K_{IP}}{K_{IP} + C_P} \quad (2.16)$$

onde:

μ_{\max} : velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1});

C_S é concentração de substrato limitante (g.L^{-1});

K_S : constante de saturação (g.L^{-1});

K_{IS} : constante de inibição pelo substrato (g.L^{-1});

K_{IP} é a constante de inibição pelo produto;

C_P é a concentração de produto (g.L^{-1}).

2.8 Fermentação Extrativa

Em essência, a fermentação extrativa é um processo onde um produto potencialmente inibitório é continuamente removido do meio de fermentação. A remoção do inibidor possibilita vantagens importantes para o processo como, por exemplo, o aumento da produtividade do processo. Como exemplos clássicos de processos onde é observada a inibição pelo produto, pode-se citar a produção de álcoois combustíveis, como o butanol e, principalmente, o etanol, foco do presente estudo.

2.8.1 Formas de remoção do produto inibidor

Dentre as várias técnicas de separação que podem ser utilizadas durante a

fermentação extrativa para remoção do etanol, pode-se citar o uso de vácuo, perstração, extração líquido-líquido, adsorção e arraste gasoso. Na sequência, essas técnicas serão melhor explicadas.

Flash a vácuo: No sistema *flash* a vácuo, o fermentador mantido a pressão atmosférica é conectado a um tanque flash a vácuo. Atala (2004) estudou um sistema de fermentação contínua com extração a vácuo do etanol. Para realizar a remoção do etanol foi empregado um tanque *flash* a vácuo. Quando o caldo rico em etanol entra no tanque *flash*, uma fração do etanol, que é mais volátil, evapora e, posteriormente, é condensado em outro reservatório. Com a remoção do etanol durante a fermentação, foi possível alimentar o fermentador com um mosto mais concentrado em açúcar. A fermentação extrativa com remoção do etanol por *flash* possibilitou manter a concentração de etanol no caldo em até 40 g.L⁻¹, mesmo com alimentações concentradas de melaço, contendo até 330 g.L⁻¹ de açúcar.

Perstração: É um processo de extração com solvente combinado com um processo de separação por membrana. Membranas hidrofóbicas são usadas para realizar separação do etanol em fermentações extrativas. As membranas do tipo fibra oca são mais vantajosas, devido a sua elevada área superficial. A Perstração pode, eventualmente, reduzir os problemas associados com toxicidade do solvente, emulsão e agregação celular na interface líquido-líquido que ocorrerem durante o processo de extração líquido-líquido (PARK e GENG, 1992).

Extração líquido-líquido: Nesta técnica o produto inibidor (etanol) é seletivamente removido por um solvente. Vários solventes têm sido testados por diversos pesquisadores para a remoção do etanol e o grande desafio da extração por solvente tem sido encontrar um solvente adequado. Segundo Slapack; Russel; Stewart (1987), as propriedades para um solvente ideal são ter um alto coeficiente de partição em relação ao produto inibidor, baixa volatilidade em relação ao inibidor, não ser tóxico para a levedura e, além disso, ser relativamente barato. Alguns pesquisadores recomendam o uso de leveduras imobilizadas para a redução da toxicidade do solvente para as células, porém existem problemas associados com o uso de células imobilizadas em processos industriais, como a baixa estabilidade mecânica e o aumento da resistência à transferência de massa (SCHURGERL, 2000).

Adsorção: Esta técnica visa a retirada do produto inibidor da fermentação utilizando um adsorvente seletivo. Como adsorvente seria desejável um material com elevada capacidade de adsorção de etanol, fácil regeneração, sem toxicidade para as células e baixo

custo. A adição direta do adsorvente no fermentador não parece ser adequada, devido aos inúmeros componentes e à suspensão de levedura presentes no meio. Os substratos podem ser absorvidos e as células podem formar um biofilme sobre a superfície das partículas de adsorção. Processos de adsorção razoáveis são realizados a partir de um caldo isento de células obtido por filtração por membrana ou sistemas de centrífugas.

Arraste gasoso

A transferência de massa de um composto de uma fase líquida para uma fase gasosa é conhecida como dessorção ou *stripping*. Outros termos encontrados na literatura para descrever este processo são *air stripping* ou *gas stripping*, traduzidos para o português como “arraste por ar” ou “arraste gasoso”, respectivamente.

Souto (2009) define arraste com gás como qualquer processo de transferência de massa em que a passagem de um determinado composto de uma fase líquida para uma fase gasosa seja acelerada, forçando-se o contato do líquido com um gás que não contenha o composto que se deseja remover ou que, se o contiver, este esteja em concentrações muito baixas para que o processo de transferência não seja prejudicado.

No presente estudo, propõem-se o emprego do dióxido de carbono como gás de arraste (*gas stripping*), injetado diretamente na dorna de fermentação, para realizar o arraste do etanol ao longo da fermentação e assim contornar o efeito da inibição do etanol sobre as células de levedura.

De acordo com Park e Geng (1992) e Lu et al. (2012), o arraste gasoso utilizado durante a fermentação é um método atraente para a produção em larga escala, devido à sua relativa simplicidade e a remoção seletiva de compostos voláteis em formas limpas que não estão contaminados com material não volátil. Não remove os nutrientes do caldo e não prejudica as células durante a fermentação. Além disso, para a produção de etanol por fermentação é possível obter o gás de arraste (dióxido de carbono) a um custo zero.

Além disso, o etanol por ser um composto volátil, pode ser separado do caldo de fermentação por meio do arraste gasoso. Essa técnica apresenta a vantagem de não necessitar fazer a aquisição de produtos caros como membranas ou solventes.

Cabe destacar a grande quantidade de dióxido de carbono produzida durante a

fermentação (1 L de etanol está associado com a geração de cerca de 425 L de CO₂, na temperatura e pressão do processo). Atualmente, o CO₂ gerado nas dornas de fermentação é descartado sem ser utilizado pelas destilarias. Assim, as usinas possuem à disposição durante o período de processamento da cana um grande volume de dióxido de carbono para ser empregado como gás de arraste.

A remoção de compostos orgânicos voláteis a partir de uma solução aquosa pode ser modelada como um processo de primeira ordem, conforme relatado por Truong e Blackburn (1984). Ezeji et al. (2005) e de Vrije et al. (2013) empregaram essa abordagem para realizar a modelagem do arraste gasoso de butanol de acordo com **Equação 2.17**.

$$R_i = -\frac{dC_i}{dt} = k_i \cdot C_i \quad (2.17)$$

onde:

R_i é a velocidade de remoção de i ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$);

C_i é a concentração do componente i (g.L^{-1});

k_i é a constante de velocidade de remoção de i (h^{-1}).

A remoção de compostos voláteis por arraste gasoso é influenciada pelas variáveis vazão do gás de arraste e temperatura da solução que contém o composto a ser removido.

Para a transferência do etanol da fase líquida para a fase gasosa (dióxido de carbono) tem-se, de acordo com a teoria dos dois filmes (LEWIS E WHITMAN, 1924), que a bolha de CO₂ encontra-se coberta por uma película estagnada de líquido. A resistência à transferência de massa é proporcional à espessura dessa película. Assim o aumento na vazão do gás de arraste proporciona uma maior turbulência e, conseqüentemente uma redução na espessura da película estagnada. Com isso a resistência à transferência de massa diminui fazendo com que a velocidade de transferência de massa seja aumentada.

O aumento na vazão do gás de arraste também proporciona um número maior de bolhas de menor diâmetro, aumentando a área interfacial, promovendo uma maior transferência de massa.

Ezeji et al. (2005) estudaram o uso de diferentes vazões do gás de arraste (80 e $43 \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) e foram testados o emprego de um aspersor e um impelidor para formar as bolhas durante os experimentos de remoção de butanol a partir de uma solução modelo. Esses autores verificaram que o uso do aspersor produziu bolhas de menor tamanho. No entanto, o tamanho das bolhas apresentou pouca influência no valor da constante de velocidade de remoção (k_E). Já com relação à vazão de alimentação de gás, esta se mostrou significativa no aumento do valor de k_E . Quando a vazão de gás de $43 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ foi empregada, foram obtidos valores de k_E de $0,023$ e $0,024 \text{ h}^{-1}$ para bolhas formadas com o aspersor e com o impelidor, respectivamente. Já para a vazão de $80 \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, o valor de k_E igual a $0,059 \text{ h}^{-1}$ foi obtido para ambas as formas de produzir bolhas. Dessa forma, fica evidente que a vazão do gás de arraste tem uma influência na velocidade de remoção de compostos orgânicos voláteis tais como etanol, butanol, acetona e isopropanol, entre outros.

A temperatura da solução também apresenta influência na remoção de um composto por arraste gasoso. Esse efeito da temperatura está relacionado com a redução da tensão superficial, o aumento da pressão de vapor e, conseqüentemente, o aumento da velocidade de vaporização.

No entanto, quando se pretende utilizar o arraste gasoso durante a fermentação alcoólica (fermentação extrativa), a temperatura fica vinculada à temperatura ótima da levedura que está sendo empregada no processo.

2.8.2 Estudos relacionados à remoção do produto inibidor por arraste gasoso (*gas stripping*)

Na literatura podem ser encontrados estudos relacionados à produção de etanol e butanol que fizeram o uso do arraste gasoso para remoção do produto inibidor. Na sequência são apresentados alguns destes estudos.

Pham et al. (1989) desenvolveram um processo fermentativo com reciclo de células de levedura e arraste gasoso integrado a uma coluna de retificação recheada com casca de coco. Foi utilizada glicose de milho como fonte de carbono e um fermentador contínuo tipo coluna de bolhas com volume de trabalho de $1,15 \text{ L}$. Com o emprego da vazão de CO_2 de $4 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, foi possível eliminar a inibição pelo etanol e alcançar uma produtividade de $13.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ e um consumo de glicose de até $292 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Taylor et al. (1995) estudaram a utilização do CO₂ gerado durante a fermentação alcoólica extrativa de xarope hidrolisado de amido de milho (glicose) em um biorreator de 1,2 L para remoção de etanol em uma coluna recheada separada. O sistema foi operado durante 150 dias sem a ocorrência de contaminação. O rendimento em células foi menor do que em um fermentador contínuo simples. Com o sistema integrado de fermentação com arraste foi obtida a conversão completa de 200 g.L⁻¹ de glicose e quando 600 g.L⁻¹ de glicose foram empregados uma conversão de 90% foi alcançada.

Posteriormente, Taylor et al. (1996) relataram um problema de incrustação na coluna devido ao crescimento de levedura, o que prejudicou a passagem do gás através da coluna empacotada utilizada para realizar a remoção do etanol. Com o objetivo de solucionar o problema de obstrução, foi realizada a lavagem periódica da coluna empacotada. Com isso, o desempenho do sistema melhorou significativamente, possibilitando a conversão completa de 600 g.L⁻¹ de glicose alimentada e vazão da corrente arrastada de 10 L.dia⁻¹ com quase 50% em volume de etanol. O sistema foi mantido em operação por 60 dias com uma produtividade de 15 g.L⁻¹.h⁻¹.

Em outro trabalho Taylor et al. (1997), também estudaram a produção de etanol por fermentação contínua integrada com a extração por arraste com dióxido de carbono em um fermentador com um volume de trabalho de 12,4 L. O processo de produção de etanol permaneceu estável por mais de 100 dias e produtividades de etanol na faixa de 14-17 g.L⁻¹.h⁻¹ foram obtidas utilizando glicose como substrato. Para evitar problemas de entupimento, devido ao crescimento da levedura na coluna de recheio, esta teve que ser lavada em intervalos de 3 a 4 dias.

Posteriormente, Taylor et al. (1998) operaram por 185 dias um sistema composto por fermentador de 30 L e coluna empacotada separada para esgotamento de etanol. Foram realizadas lavagens *in situ* durante a fermentação com o próprio etanol condensado do processo (45% v.v⁻¹) para controle de incrustações causadas pelo crescimento de células de levedura. Foram observados consumo de glicose de 800 g.h⁻¹, produção de etanol condensado de 26 L.dia⁻¹ e coeficiente de rendimento em etanol de 0,50 g_E.g⁻¹_{glicose}. Mais recentemente, Taylor et al. (2010) avaliaram o desempenho de um fermentador contínuo de 70 L alimentado com xarope hidrolisado de amido de milho com alto teor de sólidos e acoplado a uma coluna de esgotamento de etanol com CO₂. O sistema foi operado durante 60 dias, alcançando uma conversão de 95% de amido e rendimento em etanol de 88% do máximo teórico (estequiométrico).

Ezeji et al. (2003) avaliaram a produção de acetona, butanol e etanol (ABE) por *Clostridium beijerinckii* BA101 em biorreator de 2 L. Foi utilizado um sistema integrado de produção em batelada e recuperação por esgotamento com CO₂ e H₂. No ensaio em que não foi utilizado esgotamento foi reportada produção total de ABE de 17,7 g.L⁻¹, produtividade de 0,29 g.L⁻¹.h⁻¹ e consumo de glicose de 45,4 g.L⁻¹. No processo integrado foram consumidos 161,7 g.L⁻¹ de glicose e a produção total de ABE alcançou 75,9 g.L⁻¹ com uma produtividade de 0,60 g.L⁻¹.h⁻¹.

Ezeji et al. (2004), relataram um aumento na produção ABE pelo *Clostridium beijerinckii* BA101 empregando um processo em batelada alimentada com arraste por H₂ e CO₂, operado durante 200 h. A fim de reduzir a inibição pelo substrato, o processo foi iniciado com uma concentração de glicose de 99,9 g.L⁻¹. Meio de cultura contendo glicose e nutrientes foi adicionado subsequentemente ao caldo de fermentação em quantidades suficientes para que a concentração de glicose não excedesse 90 g.L⁻¹. A concentração máxima de ABE de 232,8 g.L⁻¹ foi alcançada, 13 vezes maior do que para o cultivo em batelada convencional (17,6 g.L⁻¹) e uma produtividade de 1,16 g.L⁻¹.h⁻¹, quatro vezes superior a obtida no cultivo controle (0,29 g.L⁻¹.h⁻¹).

Xue et al. (2012) utilizaram biorreator de leito fibroso para investigar a utilização de esgotamento com gases (CO₂ e H₂) produzidos na fermentação ABE para obtenção de altas concentrações de butanol utilizando *Clostridium acetobutylicum* JB200. Na fermentação em batelada sem esgotamento foi produzido 19,1 g.L⁻¹ de butanol com consumo de 86,4 g.L⁻¹ de glicose em 78 h. A produtividade e o coeficiente de rendimento em butanol alcançados foram de 0,24 g.L⁻¹.h⁻¹ e 0,21 g.g⁻¹, respectivamente. Por outro lado, quando foi aplicado esgotamento em batelada alimentada, 113,3 g.L⁻¹ de butanol foram produzidos com consumo de 474,9 g.L⁻¹ de glicose. Rendimento de 0,24 g.g⁻¹ e produtividade de 0,35 g.L⁻¹.h⁻¹ de etanol foram alcançados. Comparado ao processo convencional, os autores concluíram que o sistema utilizado tem o potencial de reduzir em pelo menos 90% o consumo de energia e água para a produção de etanol a partir de glicose.

Xue et al. (2013) melhoraram o sistema de recuperação de butanol em fermentação ABE adotando um sistema de esgotamento com H₂ e CO₂ de dois estágios. O primeiro estágio resultou em um condensado contendo 175,6 g.L⁻¹ de butanol (227,0 g.L⁻¹ de ABE). Após a separação das fases, a fase orgânica foi coletada e a fase aquosa, contendo 101,3 g.L⁻¹ de butanol, sujeita ao segundo estágio de esgotamento, resultando em um produto final com 420,3 g.L⁻¹ de butanol (532,3 g.L⁻¹ de ABE). Esta concentração foi 20 vezes maior

que a alcançada na fermentação ABE convencional.

de Vrije et al. (2013) estudaram a remoção *in situ* de isopropanol, butanol e etanol do caldo fermentativo de *Clostridium beijerinckii* utilizando arraste com N₂. Como substrato foi utilizado uma mistura de glicose/xilose, simulando hidrolisados lignocelulósicos. Os autores avaliaram a cinética de separação a 37°C, temperatura de crescimento típica do microrganismo e a 70°C, temperatura utilizada para esporulação por choque térmico. Um modelo de primeira ordem para remoção de compostos voláteis por arraste gasoso foi empregado nesse estudo e apresentou um bom ajuste aos dados experimentais.

Diante das informações expostas, fica evidente que a utilização de fermentação extrativa com arraste gasoso possibilita que os compostos inibidores sejam mantidos no caldo de fermentação em concentrações mais baixas, resultando na redução do efeito de inibição.

Com relação à fermentação alcoólica, o processo extrativo mostra-se como uma alternativa promissora para contornar o problema da inibição pelo etanol, resultando em um aumento na produtividade em etanol, possibilitando a utilização de soluções mais concentradas de substratos (sacarose), reduzindo o volume de água inserida no processo. Além disso, o emprego de mostos mais concentrados implica na redução do volume de vinhaça gerado na etapa de destilação. E dependendo do sistema de recuperação do etanol da corrente de CO₂, pode-se ter uma redução no consumo de vapor na etapa de destilação.

Capítulo 3

**ESTUDO DA REMOÇÃO DE ETANOL DE SOLUÇÕES
HIDROALCOÓLICAS POR ARRASTE COM CO₂**

Prefácio

No presente capítulo é apresentado o estudo da remoção de etanol a partir de soluções hidroalcoólicas por arraste (*stripping*) com dióxido de carbono. O objetivo dessa primeira etapa do trabalho foi avaliar os efeitos das variáveis envolvidas no processo de arraste por CO₂ e realizar a modelagem das remoções de etanol e água. Para isso, primeiramente foi realizado um estudo de arraste de etanol de uma solução com concentração de etanol igual a 80 g.L⁻¹, variando a vazão específica de CO₂ e a temperatura. De posse dos resultados foi realizada a modelagem da remoção de etanol e água considerando um modelo de primeira ordem, o que permitiu observar as influências da vazão e da temperatura no processo de arraste. Na sequência, foi avaliada a influência das variáveis envolvidas no processo. Para tal, foi realizado um planejamento composto central rotacional variando a vazão específica de CO₂, a concentração inicial de etanol e a temperatura da solução. A partir dos resultados do estudo do arraste de etanol de uma solução hidroalcoólica foi possível estabelecer as condições de arraste a serem empregadas nas etapas seguintes de fermentação extrativa em batelada e batelada alimentada.

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

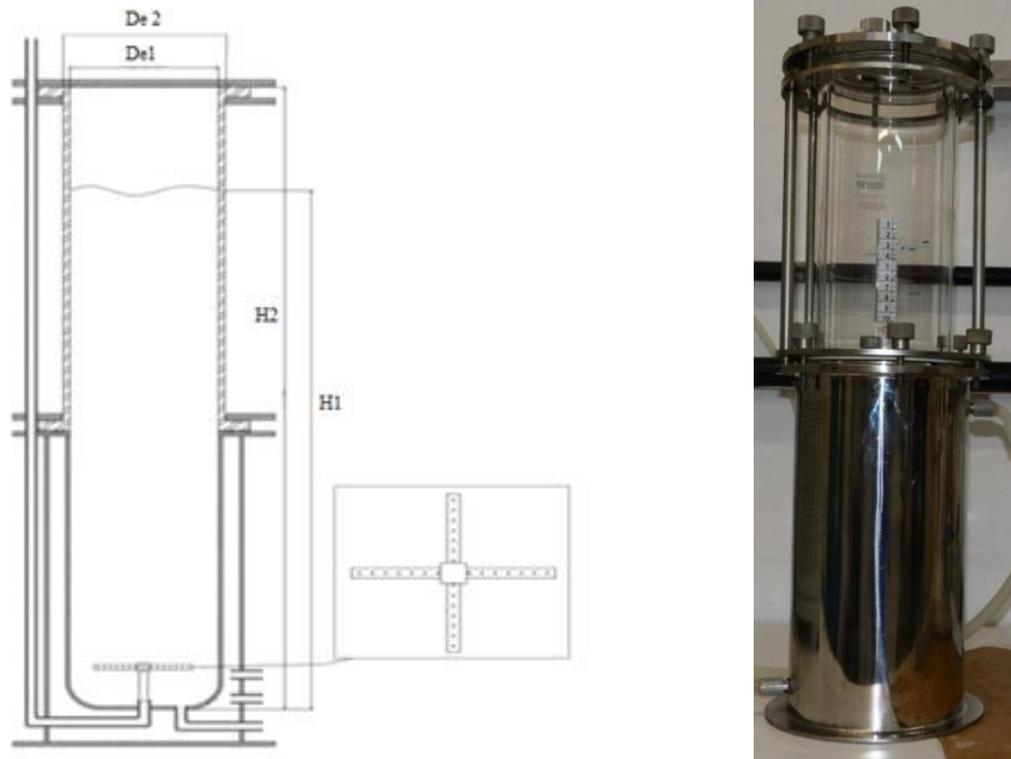
3.1.1 Equipamento empregado nos experimentos

Os experimentos para estudo do arraste de etanol por CO₂ de soluções hidroalcoólicas foram conduzidos em reator pneumático tipo coluna de bolhas encamisado, de volume útil de 5 L (BADINO *et al.*, 2007). A **Tabela 1** apresenta as dimensões e a **Figura 3.1** mostra uma representação do biorreator empregado.

Tabela 3.1 – Dimensões do biorreator

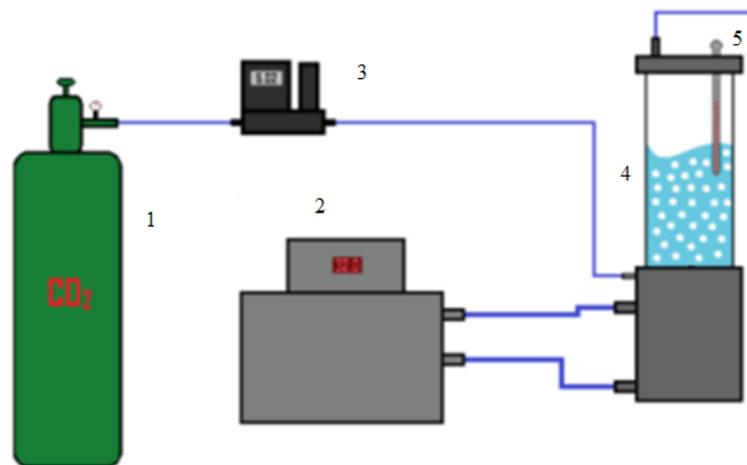
Dimensões	Coluna de Bolhas
H1 (mm)	495
H2 (mm)	750
De1 (mm)	160
De2 (mm)	170

Figura 3.1 – Biorreator pneumático



Na **Figura 3.2** é mostrada a representação esquemática do aparato experimental empregado nos ensaios para o estudo do arraste de etanol por CO_2 .

Figura 3.2 - Esquema representativo do aparato experimental



Fonte: O autor.

Descrição: 1 - Cilindro de CO_2 ; 2 - Banho termostatizado; 3 - Fluxômetro de massa; 4 - Biorreator pneumático; 5- Termômetro.

3.1.2 Estudo preliminar do arraste de etanol a partir de uma solução hidroalcoólica

Foi realizado um estudo preliminar a fim de avaliar a influência das variáveis de processo na remoção de etanol por arraste com dióxido de carbono e realizar a modelagem da remoção de etanol e água durante o processo de arraste. Para a realização dos experimentos de arraste foi utilizada uma solução hidroalcoólica com concentração de 80 g.L^{-1} (10% v.v⁻¹) e as condições de vazão específica de CO₂ (ϕ) e temperatura da solução (T) apresentadas na **Tabela 3.2**.

Tabela 3.2 – Condições experimentais do arraste de etanol a partir de uma solução hidroalcoólica empregando CO₂.

Experimento	Condição	
	ϕ (vvm)	T (°C)
E1	0,5	30,0
E2	0,5	34,0
E3	2,0	30,0
E4	2,0	34,0

Para avaliar o arraste de etanol a partir da solução alcoólica foram empregados os seguintes parâmetros: fator de arraste (F_A), constante de velocidade de remoção de etanol (k_E) e a constante de velocidade de remoção de água (k_W).

O fator de arraste (F_A) é definido como a percentagem de etanol arrastada durante o experimento de *stripping* em relação à condição inicial e foi calculado de acordo com a **Equação (3.1)**.

$$F_A = \frac{C_{E0}.V_0 - C_{EF}.V_F}{C_{E0}.V_0} \cdot 100 \quad (3.1)$$

onde,

C_{E0} é a concentração inicial de etanol na solução hidroalcoólica (g.L^{-1});

V_0 é o volume inicial da solução hidroalcoólica (L);

C_{EF} é a concentração de etanol na solução hidroalcoólica após 6 h de extração (g.L^{-1});

V_F é o volume da solução hidroalcoólica após 6 h de extração (L).

A remoção de etanol por arraste gasoso a partir de uma solução hidroalcoólica segue o mesmo comportamento apresentado por outros solventes orgânicos, podendo a velocidade de remoção ser expressa por um modelo de primeira ordem em relação à concentração de etanol (C_E) de acordo com a **Equação 3.2** (DE VRIJE et al., 2013; EZEJI et al., 2005; TRUONG; BLACKBURN, 1984). Como durante os experimentos de arraste ocorre a remoção de água, a velocidade de remoção de água pode ser expressa pela **Equação 3.3**.

$$R_E = -\frac{dC_E}{dt} = k_E \cdot C_E \quad (3.2)$$

$$R_W = \frac{dC_W}{dt} = k_W \cdot C_W \quad (3.3)$$

onde:

R_E é a velocidade de remoção de etanol ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$);

R_W é a velocidade de remoção de água ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$);

C_E é a concentração de etanol na solução (g.L^{-1});

k_E é constante de velocidade de remoção de etanol (h^{-1});

C_W é a concentração de água na solução (g.L^{-1});

k_W é constante da velocidade de remoção de água (h^{-1}).

As constantes de velocidade de remoção de etanol e água (k_E e k_W) foram determinadas a partir do ajuste das curvas exponenciais dadas pelas **Equações 3.4 e 3.5** aos dados experimentais de C_E e C_W ao longo do tempo (t), obtidos a partir dos ensaios de arraste de etanol.

$$C_E = C_{E0} \cdot e^{-k_E \cdot t} \quad (3.4)$$

$$C_W = C_{W0} \cdot e^{k_W \cdot t} \quad (3.5)$$

onde,

C_{E0} e C_{W0} são as concentrações iniciais de etanol e de água na solução hidroalcoólica (g.L^{-1}).

3.1.3 Caracterização da remoção de etanol por arraste – Influências da vazão de CO_2 , concentração inicial de etanol e da temperatura da solução

No estudo das variáveis mais importantes no processo de arraste gasoso de etanol por CO_2 foi empregado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com

dois níveis, utilizando o software *Statistica 7.0*, tendo 2^3 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 experimentos (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

Na **Tabela 3.3** são mostrados os valores utilizados no planejamento experimental para as três variáveis independentes analisadas.

Tabela 3.3 - Valores reais e codificados das variáveis independentes utilizadas nos experimentos.

Variáveis	Código	Níveis				
		-1,68	-1	0	1	1,68
Vazão Específica de CO ₂ - ϕ (vvm)	X ₁	1,00	1,61	2,5	3,39	4,00
Concentração Inicial de Etanol - C _{E0} (g.L ⁻¹)	X ₂	30,0	36,1	45,0	53,9	60,0
Temperatura da Solução - T ₀ (°C)	X ₃	30,0	30,8	32,0	33,2	34,0

As variáveis respostas do planejamento foram o fator de arraste (F_A), a constante de remoção de etanol (k_E) e a constante de remoção de água (k_W), as quais foram calculadas de acordo com as **Equações 3.1, 3.4 e 3.5**, respectivamente, conforme descrito no item 3.1.2.

3.1.4 Estudo da influência do volume da solução e da concentração de etanol durante a remoção de etanol por arraste com CO₂

Visando o estudo posterior da fermentação extrativa em batelada alimentada, foi estudada a influência do volume da solução (altura da coluna de líquido) no biorreator durante na remoção de etanol por dióxido de carbono. Experimentos de arraste foram realizados utilizando diferentes volumes iniciais de solução (V₀) e concentrações iniciais de etanol (C_{E0}). A temperatura da solução e a vazão específica de CO₂ foram fixadas em 34°C e 2,5 vvm, respectivamente.

Os valores de volume inicial de solução (V₀) e de concentração inicial de etanol (C_{E0}) utilizados nos experimentos de arraste são mostrados na **Tabela 3.4**. Esses valores foram escolhidos com base nos perfis típicos de volume de mosto e concentração de etanol obtidos para uma fermentação convencional em batelada alimentada.

Tabela 3.4 – Condições Experimentais empregadas nos experimentos de arraste de etanol realizados usando soluções hidroalcoólicas a 34°C e vazão específica de CO₂ de 2,5 vvm.

Experimentos	Condições	
	V ₀ (L)	C _{E0} (g.L ⁻¹)
E5	2,0	45,0
E6	3,0	55,0
E7	4,0	65,0
E8	5,0	75,0

3.1.5 Metodologia analítica

A concentração de etanol foi determinada empregando HPLC (Waters) equipado com detector de índice de refração. Foi utilizada coluna Sugar-Pak I (300 x 6,5 mm, 10 µm, Waters) operada a 80°C. Água ultrapura foi usada como eluente a uma vazão de 0,5 mL.min⁻¹. Como padrão foram empregadas soluções de etanol com concentrações de 0,1 a 8,0 g.L⁻¹.

3.1.6 Procedimento experimental empregado nos experimentos de arraste de etanol

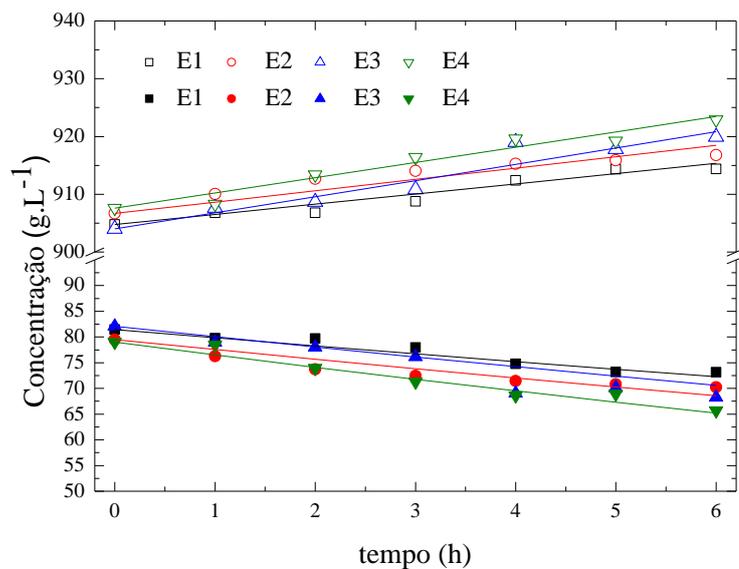
Foi utilizada uma solução hidroalcoólica com concentração inicial de etanol variando de acordo com a condição a ser avaliada. A fase gasosa utilizada em todos os ensaios de arraste gasoso foi dióxido de carbono (CO₂) comercial armazenado em cilindro com capacidade de 25 kg, com pressão de 60 atm quando cheio. O CO₂ vindo do cilindro passava através de um regulador de pressão, o qual foi ajustado para manter uma pressão de 1 atm na alimentação, antes do fluxômetro de massa, assegurando a vazão específica de CO₂ na faixa estudada. Para controlar a vazão de gás, foi empregado um fluxômetro de massa AALBORG, modelo GFC 37. A temperatura do reator foi mantida utilizando banho termostático. Durante a realização dos experimentos foi utilizado um termômetro digital marca Hanna Instruments, modelo HI 147-00 para monitorar a temperatura da solução. Cada experimento de arraste teve a duração de 6 h. O volume da fase líquida (V) foi medido a cada hora, quando amostras de 4,0 mL foram retirados a fim de determinar a concentração de etanol no líquido (C_E) ao longo do tempo.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1 Estudo preliminar do arraste - Efeito das condições operacionais sobre a remoção de etanol por arraste com CO₂

Na sequência, são apresentados os resultados referentes a etapa de estudo preliminar da influência das variáveis vazão específica do gás de arraste e da temperatura da solução no arraste de etanol.

Figura 3.3 – Concentrações de etanol e água no reator ao longo do tempo para os experimentos de arraste por CO₂. Concentração de etanol (C_E): símbolos fechados; concentração de água (C_W) símbolos abertos; linhas valores simulados usando o modelo de primeira ordem.



Na **Figura 3.3** são apresentados os valores das concentrações de etanol (C_E) e água (C_W) ao longo dos experimentos de arraste a partir da solução alcoólica (10% v.v⁻¹), utilizando diferentes condições de vazão específica de CO₂ e temperatura da solução. A partir da **Figura 3.3**, pode-se observar uma diminuição da concentração de etanol e um ligeiro aumento na concentração de água durante os experimentos de arraste. O comportamento do perfil da concentração de água (C_W) está relacionado com o arraste preferencial de etanol a partir da solução contendo apenas etanol e água. O arraste preferencial de etanol se mostra vantajoso, principalmente para utilização do CO₂ para remover etanol durante os processos de fermentação, permitindo uma redução no efeito de inibição e uma corrente arrastada rica em etanol.

As constantes de velocidade de remoção de etanol e água (k_E e k_W) foram determinadas a partir dos ajustes das curvas exponenciais descritas pelas **Equações 3.4 e 3.5** aos dados experimentais do C_E e C_W ao longo do tempo (t). A **Tabela 3.5** apresenta os valores de F_A , k_E e k_W obtidos durante os experimentos de arraste de etanol a partir da solução alcoólica.

Tabela 3.5 - Valores k_E , k_W , e F_A obtidos a partir dos experimentos de arraste de etanol.

Experimentos	k_E (h^{-1})	k_W (h^{-1})	F_A (%)
E1	0,0188±0,0012	0,00194±0,00021	12,5
E2	0,0247±0,0019	0,00215±0,00038	13,5
E3	0,0301±0,0023	0,00307±0,00041	20,4
E4	0,0390±0,0017	0,00289±0,00028	21,0

Os resultados mostrados na **Tabela 3.5** indicam que os valores de F_A , k_E e k_W aumentam com o aumento da vazão específica de CO_2 e da temperatura da solução, dentro da faixa avaliada. No experimento E4 ($\phi=2,0$ vvm e $T=34,0^\circ C$), os valores de k_E e k_W foram cerca de 2 vezes mais elevadas do que os valores obtidos no experimento E1 ($\phi=0,5$ vvm e $T=30,0^\circ C$). De Vrije et al. (2013) também observaram um aumento no valor da constante de remoção de etanol com o aumento da temperatura, durante a remoção de butanol por arraste com nitrogênio. O efeito da temperatura sobre a remoção de etanol pode ser explicado pelo fato de que a pressão de vapor é altamente dependente da temperatura, assim temperaturas mais elevadas favorecem a vaporização do etanol.

A partir dos resultados apresentados na **Tabela 3.5**, pode ser observado que a vazão específica de CO_2 teve uma forte influência sobre a remoção do etanol, dentro do intervalo estudado. A influência da temperatura sobre os valores de k_E obtidos nos experimentos de arraste realizados a 2,0 vvm foi avaliada por meio da comparação dos resultados utilizando o teste de Tukey a um nível de significância de 10%. Os resultados mostraram que houve uma influência estatisticamente significativa da temperatura sobre os valores das constantes k_E .

3.2.2 Influências da vazão de CO₂, concentração inicial de etanol e da temperatura da solução no arraste de etanol por CO₂

O processo de arraste de etanol por CO₂ foi estudado utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR) de modo a analisar o sinergismo entre as variáveis independentes, assim como suas influências no processo de remoção de etanol de soluções hidroalcoólicas por arraste com CO₂. A **Tabela 3.6** apresenta a matriz do planejamento juntamente com os valores das respostas avaliadas. Os valores das variáveis respostas foram obtidos a partir das **Equações 3.1, 3.4 e 3.5**.

Pode-se verificar que os valores dos três ensaios na condição do ponto central (**Tabela 3.6**) apresentam uma pequena variação para todas as respostas obtidas, indicando uma boa reprodutibilidade do processo.

Observando as respostas da **Tabela 3.6**, constata-se que as mesmas variaram dentro da faixa avaliada no planejamento, de 14,5 a 49,5% para o fator de arraste (F_A), de 0,022 a 0,0962 h⁻¹ para o k_E e de 0,00119 a 0,00514 h⁻¹ para a resposta k_W , demonstrando a influência das variáveis independentes nas respostas avaliadas.

A partir dos valores da **Tabela 3.6**, verificou-se que o maior valor para a resposta F_A ($F_A=49,5\%$) foi obtido no ensaio 10 ($\phi=4,0$ vvm; $C_{E0}=45,0$ g.L⁻¹ e $T_0=32,0^\circ\text{C}$). Nesse mesmo ensaio também foi obtido o maior valor para a resposta k_E ($k_E=0,0962$ h⁻¹), indicando que vazões elevadas favorecem a remoção do etanol presente na solução hidroalcoólica. Porém, quando a vazão de CO₂ de 4 vvm foi empregada ocorreu um maior arraste de água juntamente com o etanol, resultando em um valor de $k_W=0,00423$ h⁻¹ (ensaio 10).

Tabela 3.6 - Matriz do planejamento DCCR e valores numéricos das variáveis respostas.

Ensaio	X_1 (ϕ)	X_2 (C_{E0})	X_3 (T_0)	F_A (%)	k_E (h^{-1})	k_W (h^{-1})
1	-1	-1	-1	20,3	0,0329	0,00135
2	-1	-1	1	21,9	0,0335	0,00136
3	-1	1	-1	20,4	0,0333	0,00210
4	-1	1	1	23,3	0,0377	0,00236
5	1	-1	-1	41,2	0,0757	0,00292
6	1	-1	1	44,7	0,0841	0,00308
7	1	1	-1	40,8	0,0766	0,00446
8	1	1	1	45,2	0,0911	0,00514
9	-1,68	0	0	14,5	0,0220	0,00119
10	1,68	0	0	49,5	0,0962	0,00423
11	0	-1,68	0	30,0	0,0498	0,00162
12	0	1,68	0	41,0	0,0692	0,00450
13	0	0	-1,68	30,4	0,0554	0,00275
14	0	0	1,68	38,7	0,0730	0,00362
15	0	0	0	32,8	0,0573	0,00279
16	0	0	0	33,1	0,0544	0,00261
17	0	0	0	32,5	0,0540	0,00266

No ensaio 8, conduzido com $\phi=3,39$ vvm, $C_{E0}=53,9$ g.L⁻¹ e $T_0=33,2^\circ\text{C}$, foi obtido um valor de $F_A=45,2\%$ e $k_E=0,0911$ h⁻¹. Assim, pode-se constatar que aumentos na concentração inicial de etanol e na temperatura da solução proporcionaram valores de F_A e k_E mais elevados, mesmo com uma redução na vazão de CO₂ empregada nesse experimento. Isto evidencia que a realização do arraste empregando soluções alcoólicas mais concentradas e em temperaturas mais elevadas favorecem a remoção do etanol com um menor consumo do gás de arraste. No entanto, quando o arraste foi conduzido nas condições do ensaio 8, foi obtido também um alto valor de k_W igual a 0,00514 h⁻¹.

Assim, com base nos valores de F_A , k_E e k_W da **Tabela 3.6** pode-se verificar que a operação de arraste gasoso (*stripping*) remove boa parte do etanol contido em uma solução alcoólica. Desta forma, essa técnica se mostra promissora para ser empregada durante

uma fermentação alcoólica, visando remover parte do etanol formado e assim, minimizar o efeito de inibição do etanol sobre as células de levedura.

Na sequência foi realizada a análise estatística do planejamento experimental. Para tal foi adotado um nível de significância de 90%, ou seja, foram considerados significativos os parâmetros em que $p < 0.1$. Com os resultados apresentados na **Tabela 3.6** foi possível analisar estatisticamente o comportamento de cada resposta, empregando o *software Statistica 7.0* (StatSoft, Tulsa, OK, EUA). Na sequência, será apresentado o tratamento estatístico para cada uma das respostas avaliadas.

3.2.2.1 Análise dos resultados obtidos para a resposta fator de arraste (F_A)

A partir dos resultados obtidos (**Tabela 3.6**), analisou-se estatisticamente o comportamento da resposta fator de arraste (F_A). Assim, foi possível determinar os coeficientes de regressão das variáveis e interações com parâmetros significativos e não significativos, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos coeficientes (**Tabela 3.7**).

Tabela 3.7 - Resultados da regressão múltipla para resposta fator de arraste (F_A) com todas as variáveis com seus respectivos parâmetros e níveis de significância.

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	Nível de significância p-valor
Termo independente	32,920	0,000
X₁ (L)	10,607	0,000
X₁ (Q)	-0,697	0,390
X₂ (L)	1,472	0,071
X₂ (Q)	0,540	0,501
X₃ (L)	1,930	0,027
X₃ (Q)	0,204	0,796
X₁X₂	-0,175	0,852
X₁X₃	0,425	0,652
X₂X₃	0,275	0,770
	R²=0,97	

A partir dos coeficientes de regressão apresentados na **Tabela 3.7**, obtém-se a **Equação 3.6** na forma completa com todos os parâmetros significativos e não significativos.

$$Y_{FA} = 32,920 + 10,607X_1 - 0,697X_1^2 + 1,472X_2 + 0,540X_2^2 + 1,930X_3 + 0,204X_3^2 - 0,175X_1X_2 + 0,425X_1X_3 + 0,275X_2X_3 \quad (3.6)$$

Pelos dados da **Tabela 3.7**, pode-se observar que as variáveis significativas do modelo foram vazão do gás de arraste em seu termo linear X_1 (L), concentração inicial de etanol na solução em seu termo linear X_2 (L) e a temperatura da solução em seu termo linear X_3 (L). Após eliminar os parâmetros não significativos ($p > 0.1$), vazão de alimentação do gás de arraste X_1 (Q), concentração de etanol na solução X_2 (Q), temperatura da solução X_3 (Q) em seus termos quadráticos e das interações vazão de alimentação de gás /concentração de etanol (X_1X_2), vazão de alimentação de gás/temperatura (X_1X_3) e concentração de etanol/temperatura da solução (X_2X_3), foram obtidos os parâmetros mostrados na **Tabela 3.8**.

Tabela 3.8 - Resultados da regressão múltipla para a resposta fator de arraste, apenas com as variáveis significativas e seus respectivos parâmetros e níveis de significância.

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	Nível de significância p-valor
Termo independente	32,959	0,000000
X_1 (L)	10,607	0,000000
X_2 (L)	1,472	0,026169
X_3 (L)	1,930	0,005864
$R^2=0,96$		

O modelo ajustado com as variáveis significativas codificadas está apresentado na **Equação 3.7**.

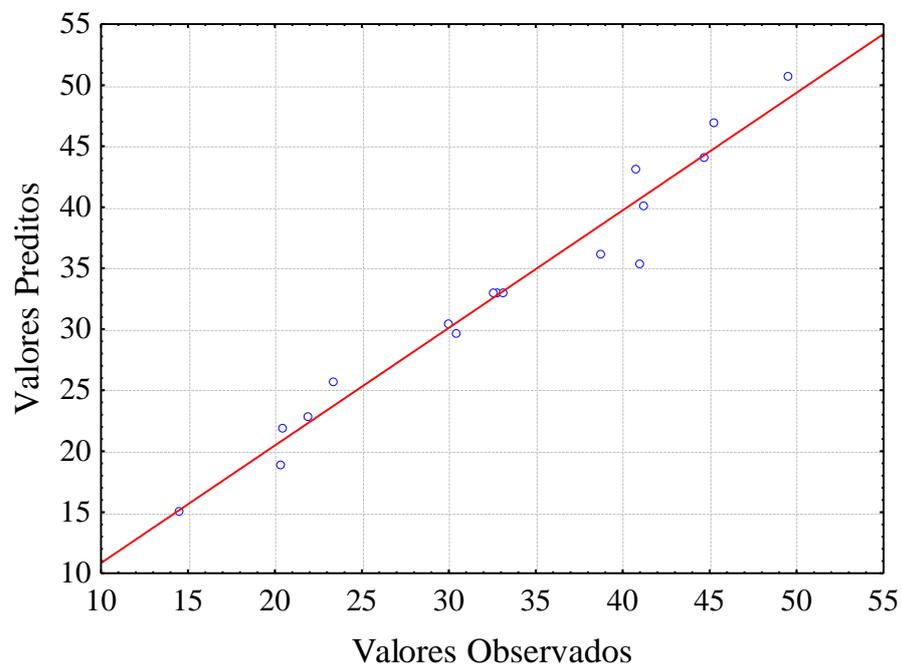
$$Y_{FA} = 32,959 + 10,607X_1 + 1,472X_2 + 1,930X_3 \quad (3.7)$$

Analisando-se a **Equação 3.7**, observa-se uma maior influência da variável X_1 , seguida da variável X_3 no aumento do fator de arraste, indicando que o emprego de vazões de CO_2 e temperaturas elevadas proporcionam aumentos no fator de arraste (F_A). A variável X_2 também contribui para o aumento do fator de arraste, porém com um menor efeito.

O coeficiente de correlação (R^2) obtido após o ajuste foi de 0,96, indicando um ajuste adequado aos dados experimentais do fator de arraste, mostrando que 96% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica proposta.

A **Figura 3.4** ilustra os valores preditos em função dos observados. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo.

Figura 3.4 - Valores preditos em função dos observados em relação ao fator de arraste (FA).



O resultado da análise de variância (ANOVA) para a resposta fator de arraste (F_A) está apresentado na **Tabela 3.9**.

Tabela 3.9 - Análise de variância para o fator de arraste.

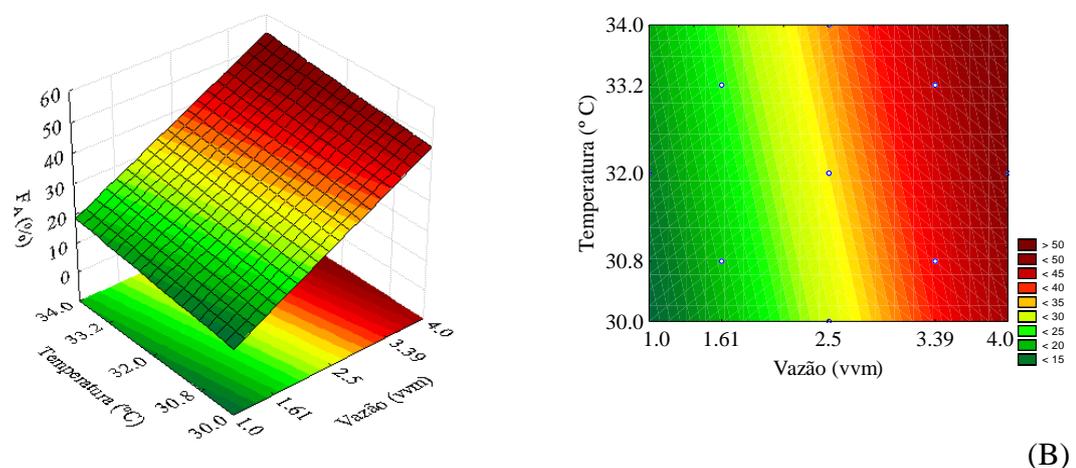
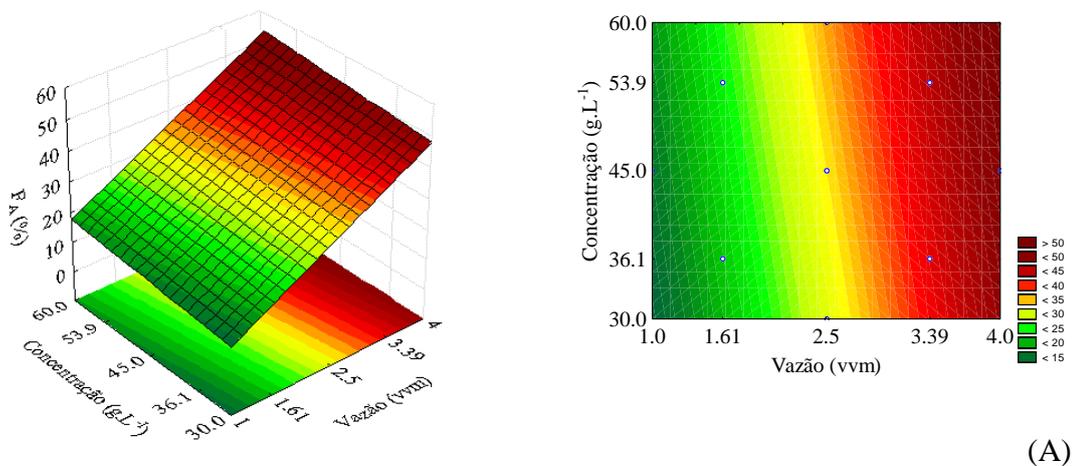
Fontes de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	1617,06	3	539,02	114,69
Resíduos	61,12	13	4,70	
Total	1678,18	16		

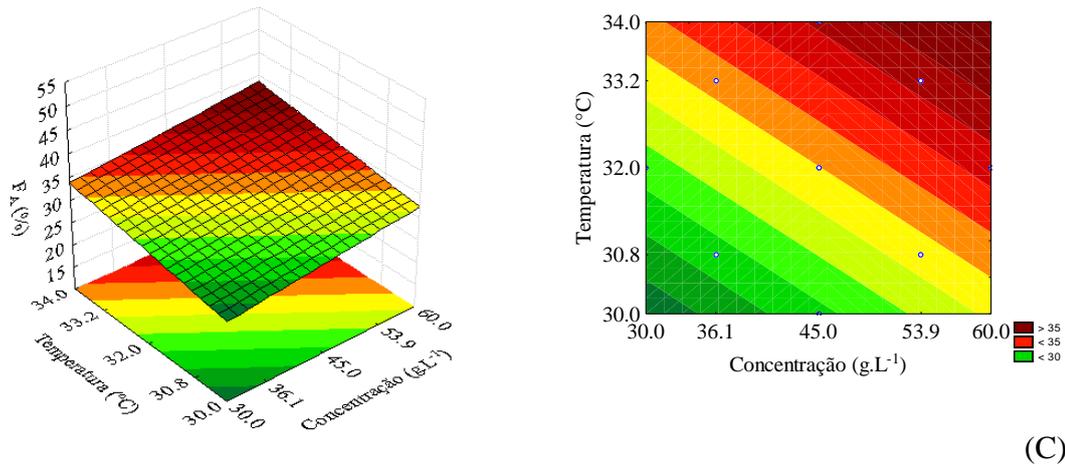
% variação explicada (R^2) = 96; $F_{\text{tab.}(3;13;0,1)} = 2,56$

A ANOVA da **Tabela 3.9** revela que o modelo que descreve a resposta fator de arraste (F_A) em função das variáveis investigadas com os parâmetros estatisticamente significativos, foi adequado. O valor do R^2 assegura que 96% dos resultados gerados são explicados pelo modelo matemático. O valor de F calculado foi aproximadamente quarenta e cinco vezes superior ao valor do F tabelado, o que satisfaz os requisitos para a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno apresentadas na sequência.

A partir do modelo obtido (**Equação 3.7**), foram construídas as superfícies de respostas e curvas de contorno para a resposta fator de arraste. A **Figura 3.5** ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno para a resposta fator de arraste (F_A).

Figura 3.5 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta fator de arraste (F_A): (A) em função da vazão de gás de arraste (X_1) e concentração de etanol na solução (X_2); (B) Superfície de resposta e curva de contorno em função da vazão de gás de arraste (X_1) e temperatura da solução (X_3) e (C) Superfície de resposta e curva de contorno em função da concentração de etanol na solução (X_2) e temperatura da solução (X_3).





A partir da **Figura 3.5-A** observa-se que os maiores valores de F_A foram obtidos nas faixas mais altas de vazão de alimentação de gás (3,4 e 4,0 vvm) e concentração. Porém, a variável concentração de etanol na solução apresentou menor influência na resposta fator de arraste (F_A). A **Figura 3.5-B** ilustra a curva de contorno em função de X_1 e X_3 para o F_A , onde pode ser observado um aumento do fator de arraste em função do aumento da vazão específica de CO_2 . A **Figura 3.5-C** apresenta a curva de contorno em função de X_2 e X_3 para a resposta fator de arraste (F_A). Pode-se observar que o aumento no valor de F_A foi obtido nos maiores valores de concentração (50 e 60 g.L^{-1}) de etanol e de temperatura da solução hidroalcoólica (33,2 e 34 $^{\circ}\text{C}$). Comparando as **Figura 3.5- A, B e C**, pode-se verificar que o F_A foi mais influenciado pela vazão específica de CO_2 do que pela concentração inicial de etanol e temperatura inicial da solução. Porém, a concentração e a temperatura da solução também apresentaram uma pequena influência no fator de arraste, conforme indicado pela **Equação 3.7**.

O efeito da vazão específica do gás de arraste sobre a variável F_A pode ser explicado devido que para altas vazões de dióxido de carbono ocorre uma maior fragmentação das bolhas de gás gerando uma maior quantidade de bolhas de menor diâmetro, proporcionando um aumento na área de contato entre as bolhas e a solução hidroalcoólica, resultando em um aumento no arraste de etanol.

O aumento da concentração de etanol na solução hidroalcoólica resulta em uma diminuição da tensão superficial da solução. De acordo com Vazquez et al. (1995), a tensão superficial da água pura a 30 $^{\circ}\text{C}$ é de 71,21 mN.m^{-1} e a do etanol puro é de 21,41 mN.m^{-1} . A 35 $^{\circ}\text{C}$ a tensão superficial para a água pura e o etanol puro é de 70,21 e 21,04 mN.m^{-1} , respectivamente. Já para uma mistura etanol-água (50% massa; 35 $^{\circ}\text{C}$) a tensão superficial é

de $27,11 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Assim, quanto maior a porcentagem de etanol, menor será a sua tensão superficial. Observa-se que a intensidade das forças de tensão superficial decresce com o aumento da temperatura, pois com a maior energia cinética, as moléculas passam menos tempo próximas umas das outras e as forças intermoleculares ficam menos efetivas.

De acordo com Borges (2009), quanto maior a temperatura do meio e menor a tensão superficial de um líquido, maior será a sua taxa de vaporização e, portanto, maior a pressão de vapor. Logo, com o aumento da temperatura da solução hidroalcoólica e, conseqüentemente redução da tensão superficial ocorre uma elevação da pressão de saturação do etanol, resultando em uma maior vaporização do etanol e, conseqüentemente uma maior quantidade de etanol é arrastada. Assim, o aumento da temperatura da solução favorece tanto o aumento da pressão de saturação quanto a redução da tensão superficial, contribuindo para uma maior remoção de etanol durante o processo de arrastre com dióxido de carbono.

As influências positivas das variáveis temperatura e vazão específica de dióxido de carbono, no F_A também foram verificadas por Silva-Pinto (2014) ao estudar a remoção de etanol do vinho fermentado empregando arraste com CO_2 , variando a temperatura do vinho e a vazão do gás de arraste nas faixas de 0,5 a 1,0 vvm e 33 a 65 °C, respectivamente. Porém, no estudo de Silva-Pinto (2014), a temperatura do vinho mostrou-se mais determinante do que a vazão específica de dióxido de carbono, em razão da maior faixa de temperatura avaliada.

3.2.2.2 Análise dos resultados obtidos para a resposta constante de velocidade de remoção de etanol (k_E)

A partir dos resultados da velocidade de remoção de etanol obtidos (**Tabela 3.6**), analisou-se estatisticamente o comportamento da resposta constante de velocidade de remoção de etanol. Assim, foi possível determinar os coeficientes de regressão das variáveis e interações, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos coeficientes (**Tabela 3.10**).

Tabela 3.10 - Resultados da regressão múltipla para resposta constante de velocidade de remoção de etanol com todas as variáveis com seus respectivos parâmetros e níveis de significância.

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	Nível de significância p-valor
Termo independente	0,0554	0,0000
X₁ (L)	0,0230	0,0000
X₁ (Q)	0,0007	0,6030
X₂ (L)	0,0033	0,0204
X₂ (Q)	0,0008	0,5301
X₃ (L)	0,0042	0,0067
X₃ (Q)	0,0025	0,0828
X₁X₂	0,0004	0,7840
X₁X₃	0,0022	0,1662
X₂X₃	0,0012	0,4210
R² = 0,99		

A partir dos coeficientes de regressão apresentados na **Tabela 3.10**, obtém-se a **Equação 3.8** na forma completa com todos os parâmetros significativos e não significativos.

$$Y_{kE} = 0,0554 + 0,0230X_1 + 0,0007X_1^2 + 0,0033X_2 + 0,0008X_2^2 + 0,0042X_3 + 0,0025X_3^2 - 0,0004X_1X_2 + 0,0022X_1X_3 + 0,0012X_2X_3 \quad (3.8)$$

A partir da **Tabela 3.10**, pode-se observar que as variáveis significativas do modelo foram vazão do gás de arraste em seu termo linear X₁ (L), a concentração inicial de etanol na solução em seu termo linear X₂ (L), a temperatura da solução em seu termo linear X₃ (L) e quadrático X₃ (Q). Após eliminar os parâmetros não significativos (p>0.1), vazão do gás de arraste X₁ (Q), concentração de etanol na solução X₂ (Q), e das interações vazão do gás de arraste/concentração de etanol (X₁X₂), vazão dos gás/temperatura (X₁X₃) e concentração de etanol/temperatura da solução (X₂X₃), foram obtidos os parâmetros mostrados na **Tabela 3.11**.

Tabela 3.11 - Resultados da regressão múltipla para a resposta constante de velocidade de remoção de etanol, apenas com as variáveis significativas e seus respectivos parâmetros e níveis de significância.

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	Nível de significância p-valor
Termo independente	0.0569	0.0000
X₁ (L)	0.0231	0.0000
X₂ (L)	0.0033	0.0084
X₃ (L)	0.0042	0.0017
X₃ (Q)	0.0021	0.0707
R²=0,98		

O modelo ajustado com as variáveis significativas codificadas está representado pela **Equação 3.9**.

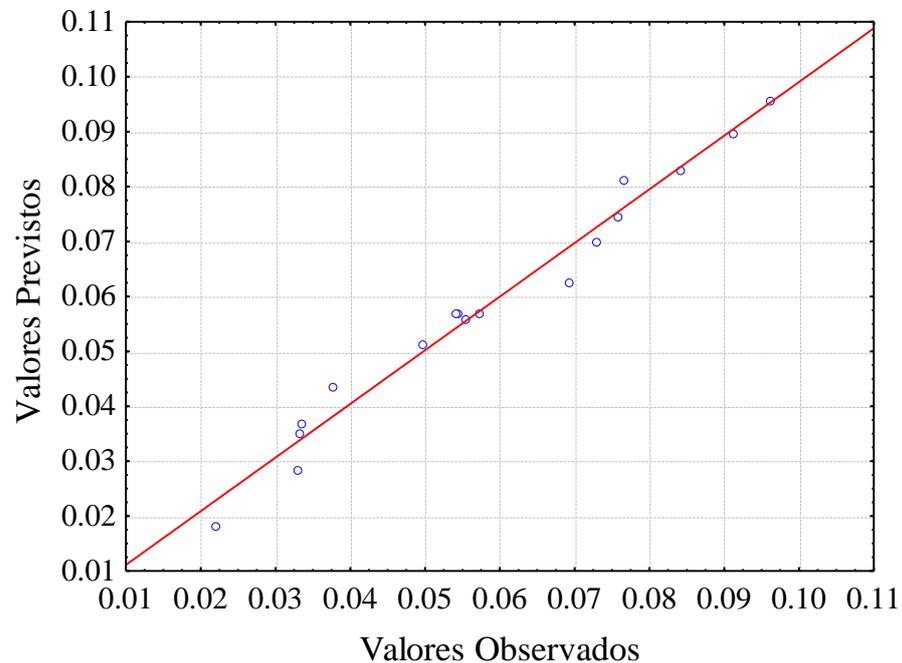
$$Y_{k_E} = 0.0569 + 0.0231X_1 + 0.0033X_2 + 0.0042X_3 + 0.0021X_3^2 \quad (3.9)$$

A partir **Equação 3.9** pode-se notar uma maior influência da variável X_1 no aumento da constante de velocidade de remoção de etanol, indicando que o emprego de elevadas vazões do gás de arraste proporcionam aumentos no valor de k_E . As variáveis X_2 e X_3 também contribuem para o aumento de k_E , porém com um menor efeito.

O coeficiente de correlação (R^2) obtido após o ajuste foi de 0,98, indicando um ajuste adequado aos dados experimentais da constante de velocidade de remoção de etanol (k_E), mostrando que 98% da variabilidade dos dados foram explicados pela equação empírica proposta.

A **Figura 3.6** ilustra os valores preditos em função dos observados. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo.

Figura 3.6 - Valores preditos em função dos observados em relação a constante de velocidade de remoção de etanol (k_E)



O resultado da análise de variância (ANOVA) para a resposta k_E está apresentado na **Tabela 3.12**.

Tabela 3.12 - Análise de variância para a constante de velocidade de remoção de etanol (k_E).

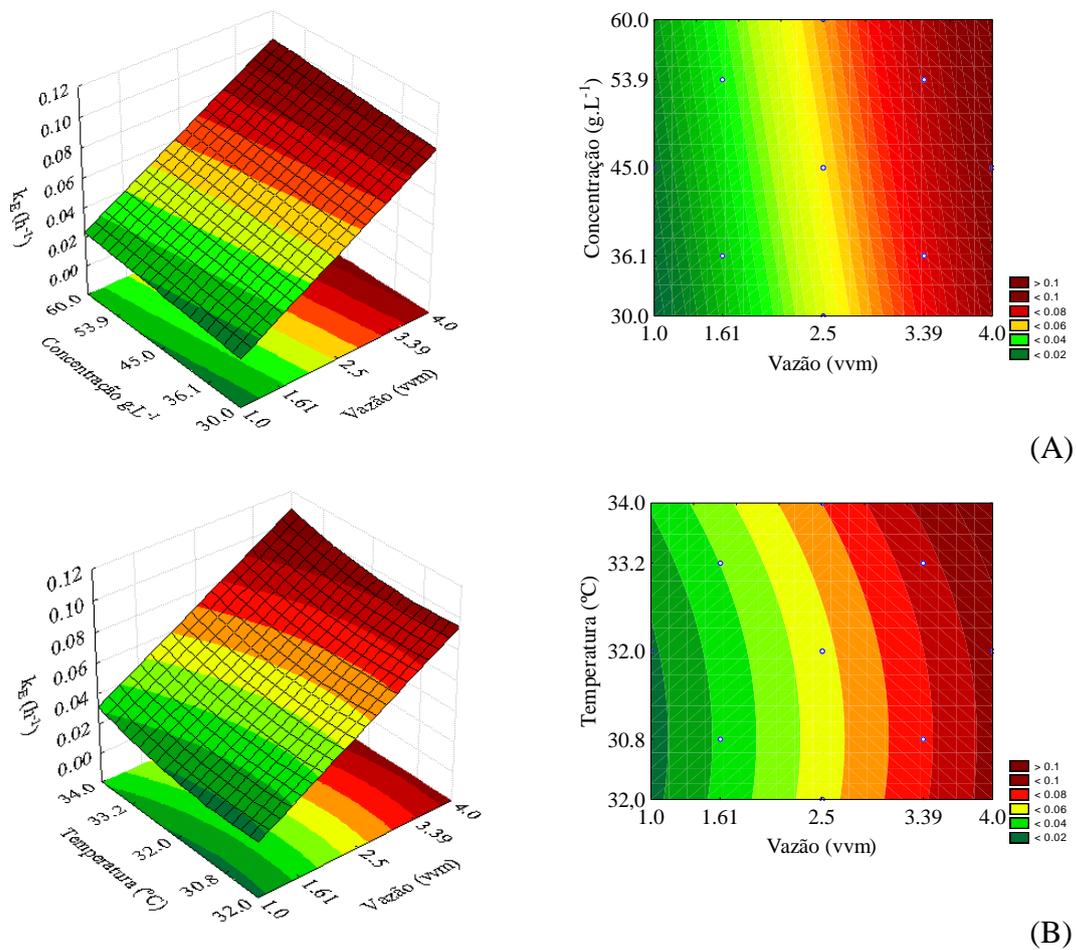
Fontes de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	$F_{\text{calculado}}$
Regressão	0,007711	4	0,001928	127,82
Resíduos	0,000181	12	0,0000151	
Total	0,007892	16		

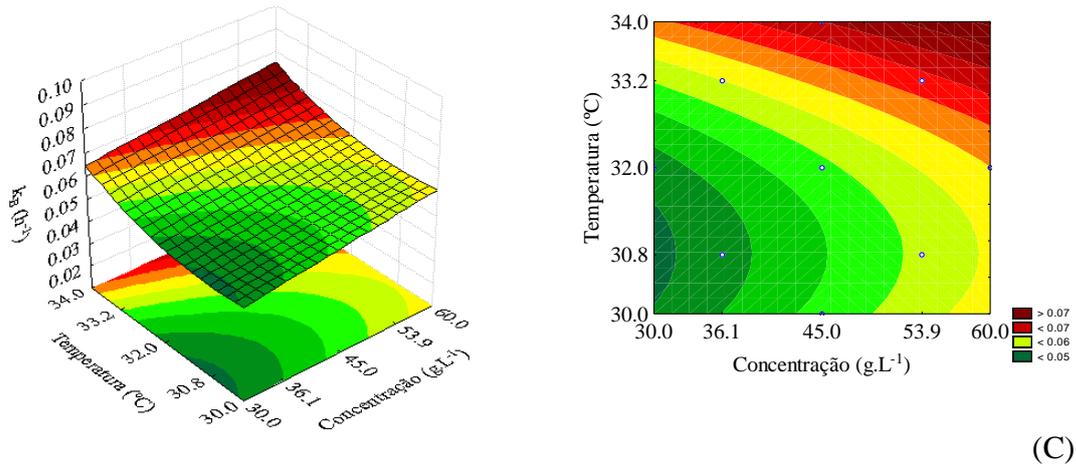
% variação explicada (R^2)=98; $F_{\text{tab.}(4;12;0,1)}=2,48$

A ANOVA da **Tabela 3.12** revela que o modelo que descreve a resposta constante de velocidade de remoção de etanol (k_E) em função das variáveis investigadas, com os parâmetros estatisticamente significativos, foi adequado. O valor do R^2 assegura que 98% dos resultados gerados são explicados pelo modelo matemático. O valor de F calculado foi aproximadamente cinquenta vezes superior ao valor do F tabelado, o que satisfaz os requisitos para a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno.

A partir do modelo obtido (**Equação 3.9**), foram construídas as superfícies de respostas e curvas de contorno para a resposta constante de velocidade de remoção de etanol (k_E). A **Figura 3.7** ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno para a resposta (k_E).

Figura 3.7 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta k_E : (A) em função da vazão de gás de arraste (X_1) e concentração de etanol na solução (X_2); (B) Superfície de resposta e curva de contorno em função da vazão de gás de arraste (X_1) e temperatura da solução (X_3) e (C) Superfície de resposta e curva de contorno em função da concentração de etanol na solução (X_2) e temperatura da solução (X_3).





A partir dos gráficos da **Figura 3.7 B e C**, pode-se observar que a resposta k_E segue o mesmo comportamento obtido para a resposta F_A . Assim, os valores de k_E aumentaram com o aumento da vazão, com os maiores valores de k_E nas faixas mais altas de vazão (3,4 e 4,0 vvm). A concentração inicial de etanol e a temperatura da solução também apresentaram efeito positivo na resposta k_E , porém com menor intensidade. No entanto, esse menor efeito da temperatura no arraste de etanol se mostra promissor para a aplicação da remoção do etanol por arraste com CO_2 ao longo da fermentação. Uma vez que a fermentação alcoólica pode ser conduzida no máximo à temperatura de 34 °C, nesse caso o arraste de etanol seria favorecido, possibilitando inclusive realizar o processo extrativo empregando baixas vazões de CO_2 .

3.2.2.3 Análise dos resultados obtidos para a resposta constante da velocidade de remoção de água (k_W)

A partir dos resultados de k_W obtidos (**Tabela 3.6**), analisou-se estatisticamente o comportamento da resposta constante de velocidade de remoção de água. Assim, foi possível determinar os coeficientes de regressão das variáveis e interações, bem como os valores dos níveis de significância relacionados aos coeficientes (**Tabela 3.13**).

Tabela 3.13 - Resultados da regressão múltipla para resposta constante de velocidade de remoção de água (k_w) com todas as variáveis com seus respectivos parâmetros e níveis de significância.

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	Nível de significância p-valor
Termo independente	0,002697	0,000000
X₁ (L)	0,000992	0,000001
X₁ (Q)	-0,000027	0,699121
X₂ (L)	0,000746	0,000005
X₂ (Q)	0,000097	0,184232
X₃ (L)	0,000188	0,016297
X₃ (Q)	0,000141	0,069331
X₁X₂	0,000231	0,021316
X₁X₃	0,000071	0,393153
X₂X₃	0,000096	0,258748
R² = 0,98		

A partir dos coeficientes de regressão apresentados na **Tabela 3.13**, obtem-se a **Equação 3.10** na forma completa com todos os parâmetros significativos e não significativos.

$$Y_{k_w} = 0,002697 + 0,00099X_1 - 0,000027X_1^2 + 0,000746X_2 + 0,000097X_2^2 + 0,000188X_3 + 0,000141X_3^2 - 0,000231X_1X_2 + 0,000071X_1X_3 + 0,000096X_2X_3 \quad (3.10)$$

A partir da **Tabela 3.13**, pode-se observar que as variáveis significativas do modelo foram a vazão de alimentação do gás de arraste em seu termo linear X_1 (L), a concentração inicial de etanol na solução em seu termo linear X_2 (L), a temperatura da solução em seus termos linear X_3 (L) e quadrático X_3 (Q) e a interação vazão do gás de arraste/concentração de etanol (X_1X_2). Após eliminar os parâmetros não significativos ($p > 0.1$), foram obtidos os parâmetros mostrados na **Tabela 3.14**.

Tabela 3.14 - Resultados da regressão múltipla para a resposta constante de velocidade de remoção de água (k_w), apenas com as variáveis significativas e seus respectivos parâmetros e níveis de significância.

Variáveis e interações	Coefficiente de regressão	Nível de significância p-valor
Termo independente	0.002766	0.000000
X₁ (L)	0.000992	0.000000
X₂ (L)	0.000746	0.000000
X₃ (L)	0.000188	0.012619
X₃ (Q)	0.000125	0.079480
X₁X₂	0.000231	0.017425
R²=0,97		

O modelo ajustado com as variáveis significativas codificadas está apresentado na **Equação 3.11**.

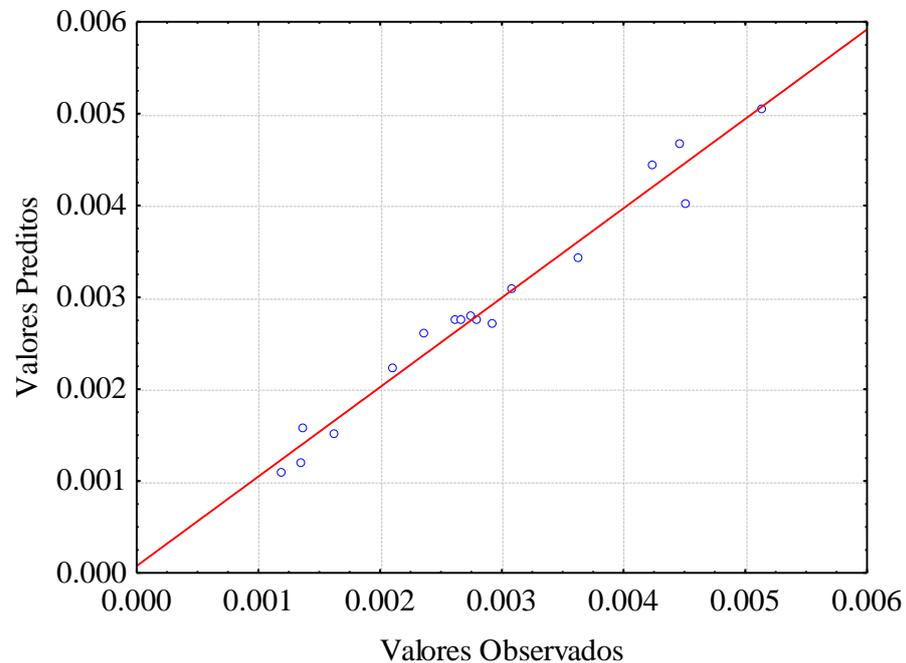
$$Y_{k_w} = 0.002766 + 0.000992X_1 + 0.000746X_2 + 0.000188X_3 + 0.000125X_3^2 + 0.000231X_1X_2 \quad (3.11)$$

A partir **Equação 3.11** pode-se observar uma maior influência da variável X_1 no aumento da constante de velocidade de remoção de água (k_w), seguida pela variável X_2 , indicando que o emprego de elevadas vazões do gás de arraste e soluções mais concentradas proporcionam aumentos nos valores de k_w . A variável X_3 apresentou pequeno efeito na resposta k_w .

O coeficiente de correlação (R^2) obtido após o ajuste foi de 0,97 indica um ajuste adequado aos dados experimentais do fator de arraste. Isto mostra que 97% da variabilidade dos dados foi explicada pela equação empírica proposta.

A **Figura 3.8** ilustra os valores preditos em função dos observados. Esses resultados indicam uma boa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo.

Figura 3.8 - Valores preditos em função dos observados em relação a constante de velocidade de remoção de água (k_w).



O resultado da ANOVA para a resposta constante da velocidade de remoção de água está apresentado na **Tabela 3.15**.

Tabela 3.15 – Análise de variância para a constante de velocidade de remoção de água.

Fontes de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	F _{calculado}
Regressão	0,000022	5	0,0000044	48
Resíduos	0,000001	11	0,00000009	
Total	0,000023	16		

% variação explicada (R^2)= 97; $F_{\text{tab.}(5;11;0,1)}=2,45$

A ANOVA da **Tabela 3.15** revela que o modelo que descreve a resposta constante de velocidade de remoção de água em função das variáveis investigadas, com os parâmetros estatisticamente significativos, foi adequado. O valor do R^2 assegura que 97% dos resultados gerados são explicados pelo modelo matemático. O valor de F calculado foi aproximadamente vinte vezes superior ao valor do F tabelado, o que satisfaz os requisitos para a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno.

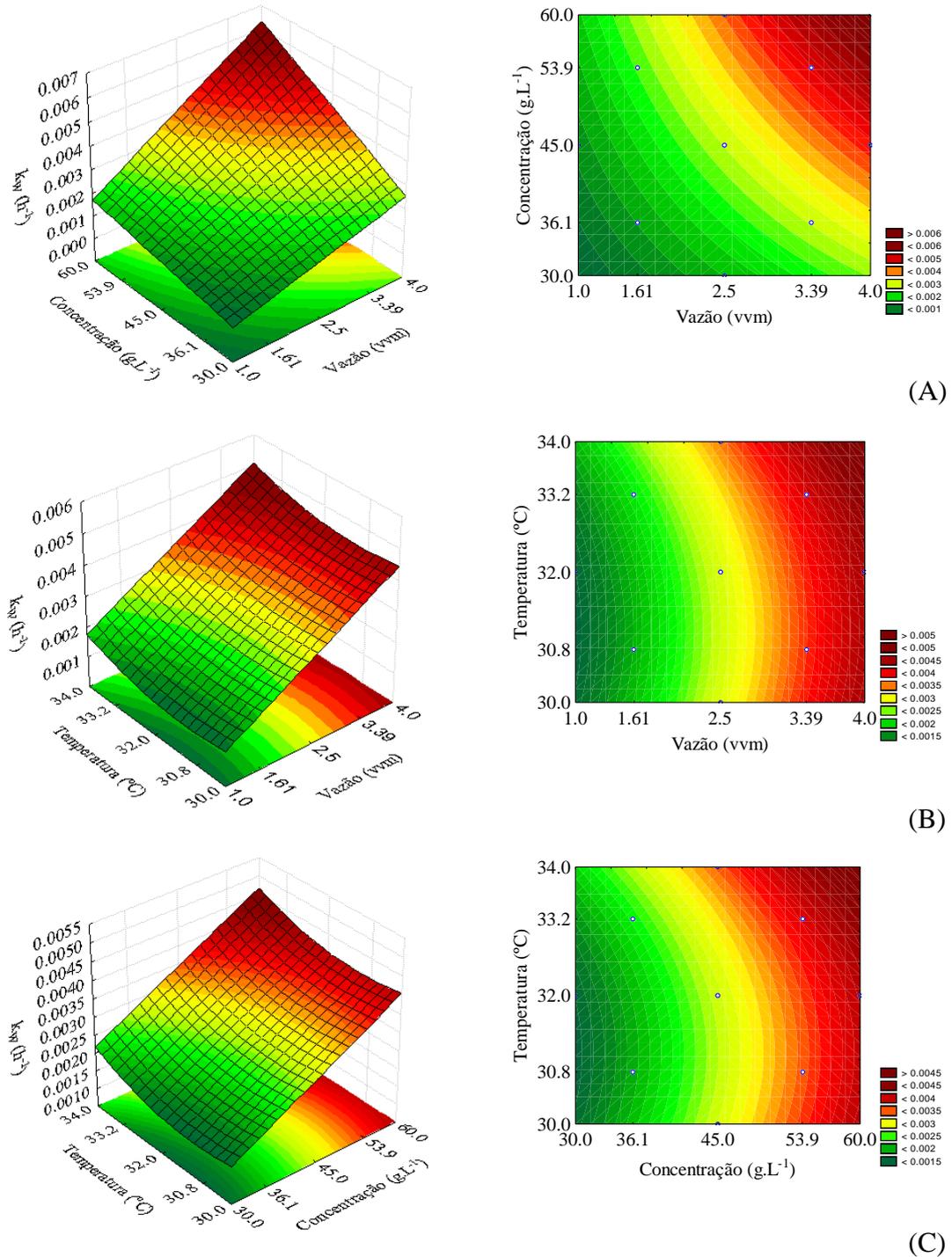
A **Figura 3.9** ilustra a superfície de resposta e a curva de contorno para a resposta constante de velocidade de remoção de água (k_w). A partir desta Figura foi observado que os valores mais elevados de vazão específica de CO_2 e de concentração de etanol favorecem o arraste de água juntamente com o etanol. Assim, vazões de CO_2 elevadas resultam em uma corrente na saída do reator diluída, em razão da maior quantidade de água arrastada, principalmente quando a concentração de etanol na solução inicial for superior a 45 g.L^{-1} . O aumento da temperatura inicial da solução também resultou em aumento em k_w .

Silva-Pinto (2014) estudou a remoção de etanol do vinho fermentado empregando arraste com CO_2 , variando a temperatura do vinho e a vazão do gás de arraste nas faixas de 0,5 a 1,0 vvm em 33 a 65 °C, respectivamente. A fim de avaliar o arraste, no estudo de Silva-Pinto (2014) foi calculado o parâmetro fator de arraste (F_C), o qual é definido como a razão entre a concentração de etanol no volume arrastado pela concentração inicial. Tal medida é importante pela possibilidade de se poder verificar por quantas vezes foi multiplicada a concentração de etanol em relação à inicial. Em seu estudo, Silva-Pinto (2014) observou que o F_C diminuiu com o aumento da temperatura do vinho e com o aumento da vazão específica de alimentação de CO_2 o que demonstra o arraste de uma maior quantidade de água quando as maiores vazões foram empregadas.

Os maiores valores de k_w verificados para os maiores valores de concentração de etanol e de temperatura foram possivelmente devido à diminuição da tensão superficial da solução. Como já mencionado anteriormente, aumentos na quantidade de etanol e na temperatura da solução promovem uma redução da tensão superficial da solução, favorecendo o arraste da água juntamente com o etanol.

Uma elevada remoção de água juntamente com o etanol não é desejável para o processo, pois resulta em uma diluição da corrente de arraste (CO_2 + etanol + água) na saída do reator. Para o caso da aplicação da técnica de arraste por CO_2 durante a fermentação alcoólica, além de uma corrente de arraste diluída, um grande arraste de água iria provocar uma diminuição significativa no volume do meio e, conseqüentemente, poderia resultar em um aumento na concentração do substrato ao longo da fermentação, interferindo no desempenho da fermentação.

Figura 3.9 - Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta k_w : (A) em função da vazão de gás de arraste (X_1) e concentração de etanol na solução (X_2); (B) Superfície de resposta e curva de contorno em função da vazão de gás de arraste (X_1) e temperatura da solução (X_3) e (C) Superfície de resposta e curva de contorno em função da concentração de etanol na solução (X_2) e temperatura da solução (X_3).



Na sequência, foi realizada uma análise das variáveis independentes através da função de desejabilidade. Tal técnica de otimização simultânea foi introduzida por Derringer e

Suich (1980) e consiste em encontrar os valores dos fatores que otimizem uma ou mais respostas ou, então, as mantenha em faixas desejáveis, utilizando métodos de programação não-lineares.

Inicialmente, essa função converte cada resposta em uma função individual de desejabilidade (d_i) que varia de 0 a 1. Se a resposta for o valor mais desejável, $d_i = 1$, caso contrário, $d_i = 0$ e a resposta está fora da região aceitável. Assim, as variáveis independentes são escolhidas de modo a maximizar a desejabilidade global (D).

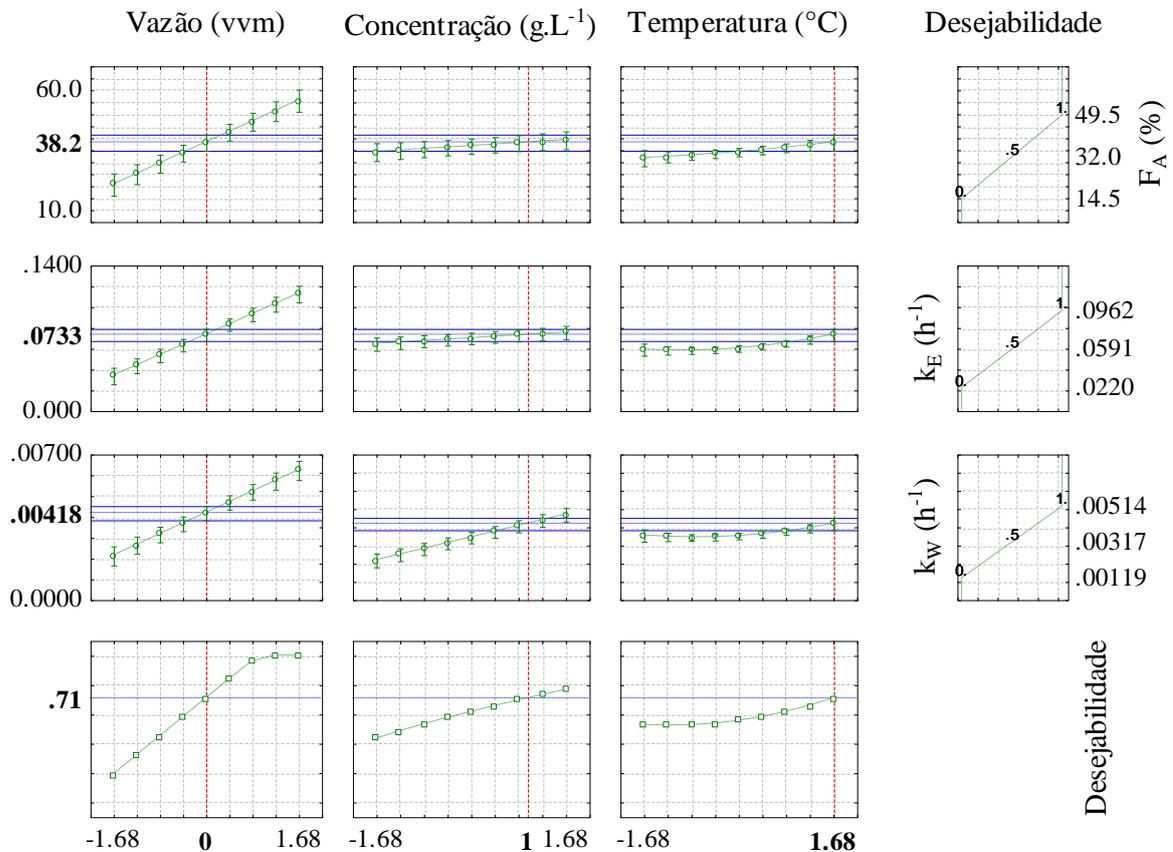
A **Figura 3.10** apresenta os resultados obtidos para a função desejabilidade, onde pode-se verificar o valor máximo da função global e as condições operacionais das variáveis independentes avaliadas.

A partir da **Figura 3.10**, obtém-se os valores desejáveis para as três variáveis respostas, sendo eles: $F_A=38,2\%$, $k_E=0,0733 \text{ h}^{-1}$ e $k_W=0,00418 \text{ h}^{-1}$. Desta forma, estas respostas determinam uma condição ótima (desejável) das variáveis vazão de alimentação de CO_2 , concentração inicial de etanol e temperatura, definidas por $\phi=2,5 \text{ vvm}$, $C_E=53,9 \text{ g.L}^{-1}$ e $T=34,0 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Para essas condições, o valor da desejabilidade global foi igual a 0,71, como mostra a última linha de gráficos da **Figura 3.10**.

Assim, com base nos resultados obtidos nos estudos de arraste de etanol de soluções alcoólicas por CO_2 foram definidas condições experimentais para serem usadas nos ensaios de fermentação extrativas em batelada e em batelada alimentada com arraste por CO_2 desenvolvidas nas etapas seguintes do trabalho.

Com relação à temperatura, os resultados indicaram um aumento no arraste de etanol com o aumento da temperatura na faixa estudada (30 a 34 $^\circ\text{C}$). De acordo com Wheals et al. (1999), as fermentações empregando *S. cerevisiae* são conduzidas na faixa de temperatura de 32-35 $^\circ\text{C}$. Com base nessa informação foi definida a condição de temperatura de 34 $^\circ\text{C}$ para a realização das fermentações extrativas com arraste por CO_2 , visando uma maior remoção de etanol durante o processo.

Figura 3.10 - Perfis de desejabilidade para o arraste de etanol por CO₂.



Os resultados obtidos nos estudos anteriores indicaram que um aumento na concentração de etanol favoreceu o seu arraste, porém mais água foi removida. A literatura menciona que para concentrações de etanol superiores a 40 g.L⁻¹, a inibição pelo etanol passa a afetar o desempenho do processo fermentativo (AIBA; SHODA; NAGATANI, 1968). A partir dessas informações foi definido iniciar o arraste por CO₂ quando a concentração de etanol atingisse esse valor.

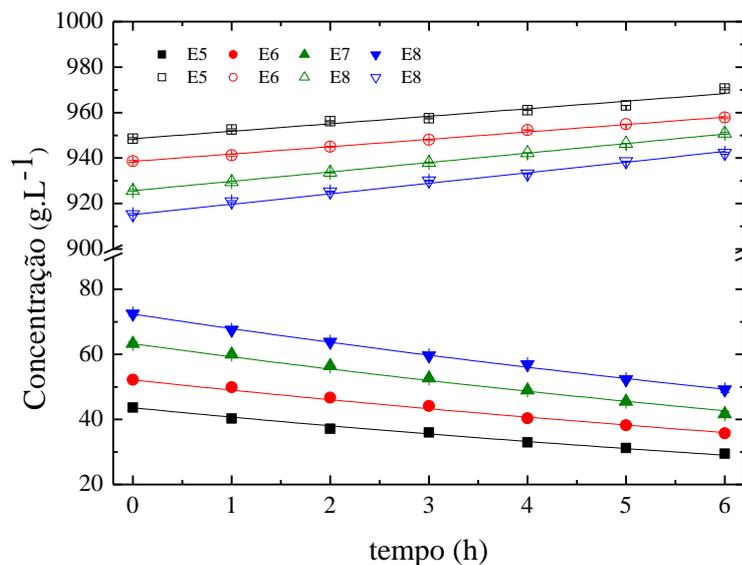
Quanto à vazão específica de CO₂, os resultados indicaram maiores valores de etanol arrastado quando as maiores vazões foram empregadas. Considerando que o objetivo maior deste estudo visa reduzir o efeito de inibição do produto sobre as leveduras, não existe a necessidade de esgotar o etanol do caldo de fermentação. Com isso, uma vazão intermediária (em torno de 2,0 a 2,5 vvm) pode ser empregada para a remoção do etanol durante as fermentações extrativas, evitando um maior arraste de água.

3.2.3 Efeito do volume da solução e concentração de etanol durante o arraste por CO₂

Experimentos de arraste foram realizados para avaliar a remoção de etanol por CO₂ a partir de uma solução hidroalcoólica com vazão de 2,5 vvm e temperatura de 34,0 °C, normalmente empregada na fermentação alcoólica por de *S. cerevisiae*.

Na **Figura 3.11** são mostradas as concentrações de etanol (C_E) e água (C_W) para os experimentos de arraste de etanol, utilizando diferentes volumes iniciais (V_0) e concentrações iniciais de etanol (C_{E0}). O comportamento dos perfis de concentração de etanol (C_E) e da água (C_W) foram os mesmos apresentados para os experimentos de arraste realizados no item 3.2.1.

Figura 3.11 – Concentrações de etanol e água ao longo do tempo para os experimentos de arraste de etanol por CO₂. Concentração de etanol (C_E): símbolos fechados; concentração de água (C_W): símbolos abertos; linhas: valores simulados obtidos usando o modelo de primeira ordem.



As constantes de velocidade de remoção de etanol e água (k_E e k_W) foram determinadas pelo ajuste das curvas exponenciais (**Equações 3.4 e 3.5**) aos dados experimentais de C_E e C_W ao longo do tempo. Na **Tabela 3.16** são apresentados os valores de k_E , k_W e F_A obtidos nos experimentos de arraste de etanol com vazão específica de CO₂ de 2,5 vvm e temperatura da solução de 34,0 °C.

Os resultados apresentados na **Tabela 3.16** demonstram que os valores de k_E , k_W , e F_A não foram significativamente afetados por alterações na altura da coluna de solução ou na concentração inicial de etanol da solução hidroalcoólica.

Tabela 3.16 - Valores de k_E , k_W , e F_A obtidos nos experimentos de arraste gasoso com vazão de 2,5 vvm e temperatura de 34 °C.

Experimento	k_E (h^{-1})	k_W (h^{-1})	F_A (%)
E5	0.0678±0.0018	0.00345±0.00015	37.6
E6	0.0618±0.0015	0.00342±0.00005	35.0
E7	0.0656±0.0016	0.00443±0.00002	39.1
E8	0.0640±0.0008	0.00498±0.00009	37.3

A pequena variação nos valores (**Tabela 3.16**) foi possivelmente devido ao fato de que, durante todos os experimentos de arraste a vazão específica de CO_2 foi mantida fixa em 2,5 vvm. Assim, o tempo médio de residência das bolhas na fase líquida foi o mesmo em todos os experimentos.

Os resultados de k_E , k_W e F_A (**Tabela 3.16**) apresentam a mesma tendência dos perfis de k_E , k_W e F_A apresentados na **Figura 3.10**, ou seja, os valores de k_E , F_A permaneceram praticamente constantes, enquanto os valores de k_W aumentaram quando a concentração de etanol na solução hidroalcoólica passou de 45 para 75 $g.L^{-1}$.

Capítulo 4

**PRODUÇÃO DE ETANOL POR FERMENTAÇÃO
EXTRATIVA EM BATELADA COM ARRASTE DE
ETANOL POR CO₂: MODELAGEM E VALIDAÇÃO
EXPERIMENTAL**

Prefácio

Neste capítulo é apresentado o estudo da fermentação extrativa em batelada. O objetivo dessa etapa do trabalho foi avaliar a produção de etanol por fermentação extrativa em batelada empregando CO_2 como gás de arraste. Para isso, foi utilizada uma configuração experimental simplificada com a operação de extração sendo realizada no próprio fermentador, evitando os problemas de incrustação que ocorrem nos processos de fermentação que utilizam colunas recheadas ou sistemas com membranas. Foi realizada a modelagem da fermentação alcoólica convencional e a partir dos dados experimentais da fermentação em batelada o modelo cinético foi ajustado e os parâmetros cinéticos estimados. Na sequência foi realizada a modelagem da fermentação alcoólica extrativa, com remoção do etanol e da água a partir do meio de fermentação descrita pelo modelo de primeira ordem definido no **Capítulo 3**. Para finalizar foram realizados ensaios de fermentação extrativa para validar experimentalmente as diferentes condições simuladas de início do arraste de etanol por CO_2 .

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Equipamento

As fermentações, convencionais e extrativas, em batelada foram realizadas usando o mesmo biorreator pneumático descrito no item 3.1.1. Para as fermentações o biorreator foi modificado com um sistema de agitação mecânica para assegurar a mistura adequada do meio durante o processo antes do início do arraste por CO_2 . Na **Figura 4.1** é mostrado o biorreator com o sistema de agitação operando em batelada.

Figura 4.1 – Foto da parte superior do biorreator com detalhe do sistema de agitação.



Fonte: O autor

4.1.2 Microrganismo

Levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischmann) na forma liofilizada com concentração inicial de 15 g.L⁻¹ foi o microrganismo empregado neste estudo.

4.1.3 Meio de cultura

As características do meio de cultura utilizado nas fermentações foram semelhantes às do mosto de cana-de-açúcar utilizado nas destilarias brasileiras. O meio foi preparado com reagentes contendo fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, magnésio, potássio de modo a simular a composição do melão de cana-de-açúcar diluído utilizado em destilarias e fornecer os requisitos nutricionais necessários à levedura. A composição do meio de cultura empregado nos ensaios de fermentação é apresentada na **Tabela 4.1**. O pH inicial do meio foi ajustado em 4,6 com a adição de ácido clorídrico 1 M.

Tabela 4.1 – Composição do meio de cultura empregado nos experimentos de fermentação.

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)
Sacarose	180,0
Extrato de levedura	6,8
Ureia	5,32
KH ₂ PO ₄	5,6
MgSO ₄	1,4

4.1.4 Procedimento experimental empregado nas fermentações convencionais e extrativas

Nos ensaios de fermentação convencional em batelada, a levedura foi inoculada na forma seca, na concentração inicial de 15 g.L⁻¹. Nesse momento foi utilizada uma frequência de agitação de 800 rpm a fim de facilitar a completa dissolução dos flocos de levedura e promover sua mistura no meio de cultura. No início do cultivo foi feito uso de antiespumante (Qualifoam, diluído 1:10) para impedir a formação excessiva de espuma. Foi adotado um tempo de aclimação da levedura de 15 min, antes de ser retirada a primeira

amostra. Após o início do processo fermentativo, a frequência de agitação foi mantida em 250 rpm até o final da batelada convencional. Para a fermentação extrativa em batelada a agitação foi usada apenas nas horas antes do início do arraste por CO₂. Amostras de 30 mL foram retiradas a cada 1 h para acompanhar a evolução do processo fermentativo.

A temperatura da fermentação foi mantida em 34 °C, fazendo-se circular água, proveniente de um banho termostático, através da camisa do biorreator. O pH foi monitorado durante as fermentações utilizando um medidor de pH (QX1500, Qualxtron).

Nos ensaios de fermentação extrativa em batelada foi utilizado o mesmo procedimento descrito para a fermentação convencional em batelada, porém, na fermentação extrativa ocorreu a alimentação de dióxido de carbono. O sistema de agitação foi empregado somente nas horas iniciais do processo, quando ainda não estava sendo alimentado o gás de arraste.

Nas fermentações extrativas em batelada, a vazão específica de CO₂ utilizada foi de 2 vvm. Três fermentações extrativas foram realizadas com a remoção do etanol por CO₂ iniciada após 5 h (FE1), 4 h (FE2) e 3 h (FE3) de fermentação. As fermentações alcoólicas convencionais e extrativas foram realizadas em duplicata.

4.1.5 Metodologias Analíticas

A concentração celular foi estimada pelo método da massa seca. Amostras do caldo fermentativo foram centrifugadas a 10.000 rpm e 4 °C por 10 minutos. O corpo de fundo foi lavado por duas vezes com água destilada e colocado em estufa a 80 °C por 24 h para secagem.

As concentrações de sacarose, glicose, frutose e etanol no sobrenadante foram determinadas por HPLC (Waters, USA), equipado com detector de índice de refração e coluna Sugar-Pak I (300 x 6,5 mm, 10 µm, Waters) mantida a 80 °C. Como eluente foi utilizada água ultrapura, a uma vazão de 0,5 mL.min⁻¹.

4.1.6 Modelagem matemática da fermentação convencional em batelada

Para a fermentação convencional em batelada assumindo a geração do produto (etanol) associada ao crescimento celular, as equações de balanço de massa para células (X),

substrato (S) e produto (E) resultam em um sistema de equações diferenciais ordinárias conforme mostrado nas **Equações de 4.1 a 4.3**.

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu \cdot C_X \quad (4.1)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot C_X \quad (4.2)$$

$$\frac{dC_E}{dt} = \frac{Y_{E/S}}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot C_X \quad (4.3)$$

onde:

C_X é a concentração celular (g.L^{-1});

C_S é a concentração de substrato limitante (g.L^{-1});

$Y_{X/S}$ é o coeficiente de rendimento de substrato a células ($\text{g}_X/\text{g}_S^{-1}$);

$Y_{P/S}$ é o coeficiente de rendimento de substrato a etanol ($\text{g}_P/\text{g}_S^{-1}$);

μ é a velocidade específica de crescimento celular (h^{-1});

C_E é a concentração de etanol (g.L^{-1}).

O modelo cinético híbrido de Andrews-Levenspiel (ANDREWS, 1968 e LEVENSPIEL, 1980) foi utilizado para representar o crescimento celular, considerando as inibições pelo substrato e produto (**Equação 4.4**).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_S}{\left(K_S + C_S + \frac{C_S^2}{K_{IS}}\right)} \cdot \left(1 - \frac{C_E}{C_{E_{\max}}}\right)^n \quad (4.4)$$

onde:

μ_{\max} é a velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1});

K_S é a constante de saturação (g.L^{-1});

K_{IS} é a constante de inibição pelo substrato (g.L^{-1});

$C_{E_{\max}}$ é a concentração máxima de etanol a partir da qual cessa o crescimento celular (g.L^{-1});

n é constante adimensional.

Os coeficientes de rendimento de substrato a células e a produto (etanol), $Y_{X/S}$ e $Y_{E/S}$ foram obtidos pelas **Equações 4.5 e 4.6**.

$$Y_{X/S} = \frac{C_X \cdot V - C_{X_0} \cdot V_0}{C_{S_0} \cdot V_0 - C_S \cdot V} \quad (4.5)$$

$$Y_{E/S} = \frac{C_E \cdot V - C_{E_0} \cdot V_0}{C_{S_0} \cdot V_0 - C_S \cdot V} \quad (4.6)$$

onde o subscrito “0” se refere ao tempo inicial.

4.1.7 Ajuste do modelo cinético

Após a determinação dos coeficientes de rendimento $Y_{X/S}$ e $Y_{E/S}$, os outros parâmetros cinéticos foram estimados utilizando o método de regressão não-linear de Nelder e Mead (NELDER e MEAD, 1965), juntamente com o algoritmo de Runge-Kutta para solução numérica das equações diferenciais que representavam o modelo. O critério utilizado para a melhor otimização e ajuste de parâmetros foi a minimização da soma dos quadrados dos resíduos.

4.1.8 Modelagem matemática da fermentação extrativa em batelada com arraste por CO_2

Na modelagem matemática da fermentação extrativa foi realizado balanço de massa para as células (X), substrato (S) e etanol (E), bem como foram consideradas as remoções de etanol (E) e água (W), bem como as alterações do volume de caldo (V) devido ao arraste por CO_2 . O modelo de primeira ordem descrito no item 3.1.2, foi utilizado para representar a remoção do etanol e da água do caldo de fermentação. As **Equações** usadas para descrever o modelo foram as que seguem:

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu \cdot C_X - C_X \cdot \frac{1}{V} \cdot \frac{dV}{dt} \quad (4.7)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot C_X - C_S \cdot \frac{1}{V} \cdot \frac{dV}{dt} \quad (4.8)$$

$$\frac{dC_E}{dt} = \frac{Y_{E/S}}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot C_X - C_E \cdot \frac{1}{V} \cdot \frac{dV}{dt} - k_E \cdot C_E \quad (4.9)$$

$$\frac{dV}{dt} = -\frac{(k_E \cdot C_E + k_W \cdot (\rho_W - C_E)) \cdot V}{\rho_W} \quad (4.10)$$

onde:

V é o volume de caldo (L),

k_E é a constante da velocidade de remoção do etanol (h^{-1});

k_W é a constante de velocidade de remoção da água (h^{-1});

ρ_W é a massa específica da água ($g.L^{-1}$).

Dada a faixa de concentração de etanol aplicada neste estudo (40 to 80 $g.L^{-1}$), o valor da massa específica foi considerado como sendo o da água a 34 °C ($\rho_W=994 g.L^{-1}$) (PERRY; GREEN; MALONEY, 1997).

A resolução numérica do conjunto de equações diferenciais (**Equações 4.7 a 4.10**) foi realizada através da aplicação do algoritmo de Runge-Kutta usando software Scilab 5.4.1.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Fermentação alcoólica convencional em batelada – Ajuste do modelo cinético e estimativa dos parâmetros

Os coeficientes de rendimento celular e de etanol, $Y_{X/S}$ e $Y_{E/S}$, foram calculados através das **Equações 4.5 e 4.6**, usando os dados experimentais de célula (C_X), substrato (C_S) e etanol (C_E), obtidos nas fermentações convencionais em batelada. Após a determinação de $Y_{X/S}$ e $Y_{E/S}$, os outros parâmetros cinéticos do modelo foram determinados através da utilização do algoritmo de Nelder Mead, para realizar a otimização e o método de Runge-Kutta para solução numérica do conjunto de equações diferenciais. Os parâmetros foram obtidos com base no melhor ajuste entre os valores calculados e experimentais de C_X , C_S e C_E .

A **Tabela 4.2** apresenta os valores estimados para os parâmetros para a fermentação convencional em batelada, onde pode-se observar que os parâmetros estão próximos à faixa de valores encontrados na literatura (GHOSE e TYAGI, 1979).

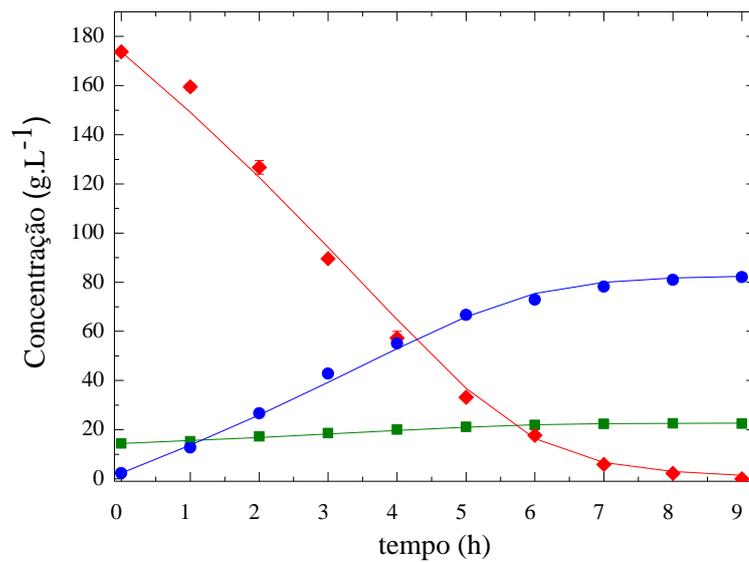
A **Figura 4.2** ilustra a comparação entre os valores calculados e experimentais para as concentrações de células (C_X), substrato (C_S) e etanol (C_E) ao longo do tempo de fermentação. Pode ser observado que o modelo cinético adotado apresentou um excelente

ajuste aos dados experimentais. Para todas as fermentações, o desvio-padrão dos dados experimentais foi muito pequeno. O modelo híbrido de Andrews-Levenspiel foi, portanto, adequado para descrever a cinética do processo de fermentação convencional.

Tabela 4.2 – Valores estimados dos parâmetros cinéticos da fermentação convencional (intervalo de confiança de 95%).

Parâmetro	Valor
$Y_{X/S}$ ($g_x \cdot g_s^{-1}$)	$0,0461 \pm 0,0004$
$Y_{E/S}$ ($g_E \cdot g_s^{-1}$)	$0,46 \pm 0,02$
μ_{max} (h^{-1})	$0,55 \pm 0,01$
K_S ($g \cdot L^{-1}$)	$24,6 \pm 5,5$
K_{IS} ($g \cdot L^{-1}$)	$30,7 \pm 0,7$
$C_{E_{max}}$ ($g \cdot L^{-1}$)	$85,2 \pm 1,4$
n (-)	$0,89 \pm 0,02$
R^2	0,990

Figura 4.2 - Gráfico comparativo entre os valores simulados (—) e experimentais de C_X (■), C_S (◆) e C_E (●) para a fermentação convencional em batelada ($C_{S_0}=180$ $g \cdot L^{-1}$).



4.2.2 Fermentação extrativa em batelada - Simulação do processo e validação experimental

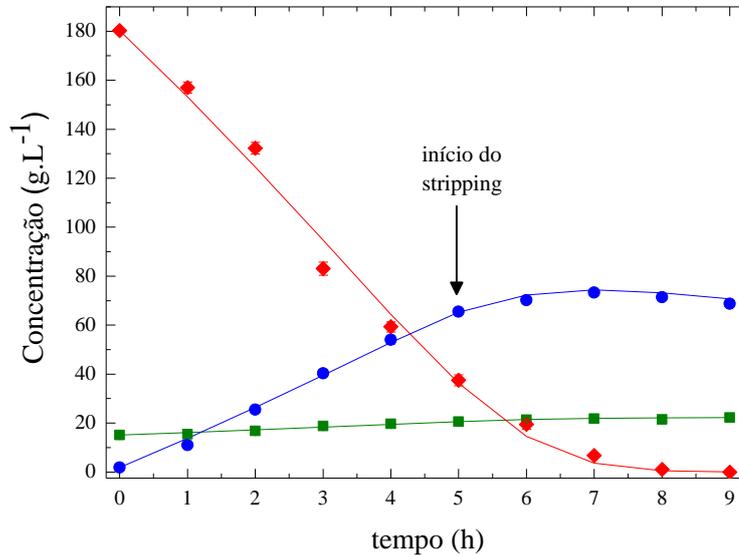
O modelo matemático para fermentação extrativa (**Equações 4.7 a 4.10**), os parâmetros de arraste (*stripping*) (**Tabela 3.5**) e os parâmetros cinéticos (**Tabela 4.2**) foram utilizados em conjunto para avaliar o efeito da remoção de etanol na dinâmica da fermentação extrativa com arraste de etanol por CO₂.

Foram realizadas três fermentações extrativas em batelada à temperatura de 34,0 °C e vazão específica de CO₂ de 2,0 vvm. A remoção de etanol por arraste com CO₂ foi iniciada após 5 (FE1), 4 (FE2), e 3 (FE3) horas de fermentação. As concentrações de etanol no caldo de fermentação no início da operação de arraste foram iguais a 65,5 (FE1), 58,4 (FE2) e 43,3 g.L⁻¹ (FE3), respectivamente.

As **Figuras 4.3, 4.4 e 4.5** fornecem as comparações entre os valores simulados e experimentais das fermentações extrativas conduzidas com concentração inicial de substrato de 180 g.L⁻¹. Pode ser observado nas figuras que o modelo proposto foi capaz de prever com precisão o comportamento da fermentação extrativa. Observe que nesses casos não há ajuste de modelo, mas a simulação de valores de C_x, C_s e C_e ao longo do tempo utilizando os modelos cinéticos da fermentação alcoólica convencional e o de remoção de etanol por arraste por CO₂.

A **Figura 4.3** apresenta os valores de C_x, C_s e C_e para a fermentação extrativa com concentração inicial de substrato de 180 g.L⁻¹ e arraste de etanol iniciado após 5 h de fermentação. Pode-se observar que para essa condição, a concentração de etanol no caldo no início do arraste era de 65,5 g.L⁻¹. Com o completo consumo de substrato em aproximadamente 8 h, para essa condição experimental a concentração máxima de etanol no caldo de fermentação foi de 73,4 g.L⁻¹.

Figura 4.3 – Comparação entre os valores experimentais de C_X (■), C_S (◆) e C_E (●) e simulados (—) para a fermentação extrativa com arraste por CO_2 iniciado após 5 h (FE1; $C_E=65,5 \text{ g.L}^{-1}$).



Os valores de C_X , C_S e C_E ao longo do tempo para a fermentação extrativa FE2 (**Figura 4.4**) com concentração inicial de substrato de 180 g.L^{-1} e arraste de etanol iniciado após 4 h de fermentação. Para essa condição, a concentração de etanol no caldo no início do arraste era de $58,4 \text{ g.L}^{-1}$ e a máxima concentração de etanol no caldo de fermentação de $70,4 \text{ g.L}^{-1}$ com completo consumo de substrato antes de 8 h de fermentação.

A **Figura 4.5** apresenta os valores de C_X , C_S e C_E para a fermentação extrativa (FE3) com concentração inicial de substrato de 180 g.L^{-1} e arraste de etanol iniciado após 3 h de fermentação. Pode-se observar que, para essa condição, a concentração de etanol no caldo no início do arraste era de $43,3 \text{ g.L}^{-1}$. O completo consumo de substrato ocorreu em aproximadamente 7 h de fermentação e a concentração máxima de etanol no caldo nesta condição foi de $68,0 \text{ g.L}^{-1}$.

Figura 4.4 - Comparação entre os valores experimentais de C_x (■), C_s (◆) e C_E (●) e simulados (—) para a fermentação extrativa com arraste por CO_2 iniciado após 4 h (FE2; $C_E=58,4 \text{ g.L}^{-1}$).

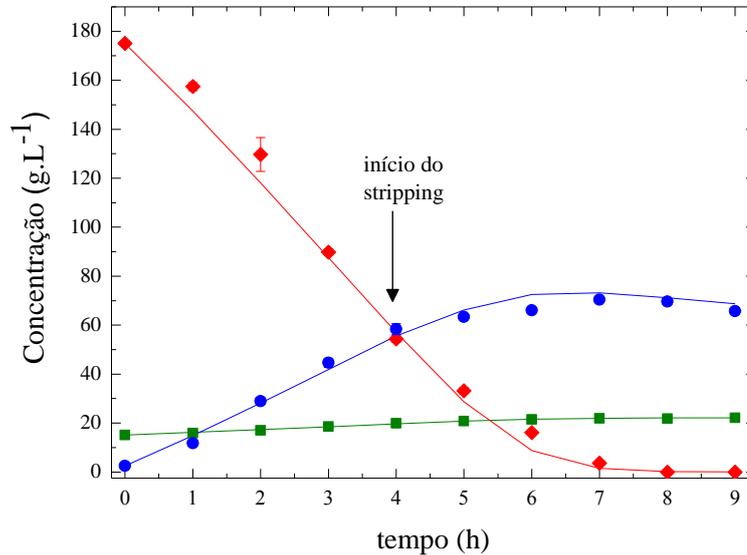
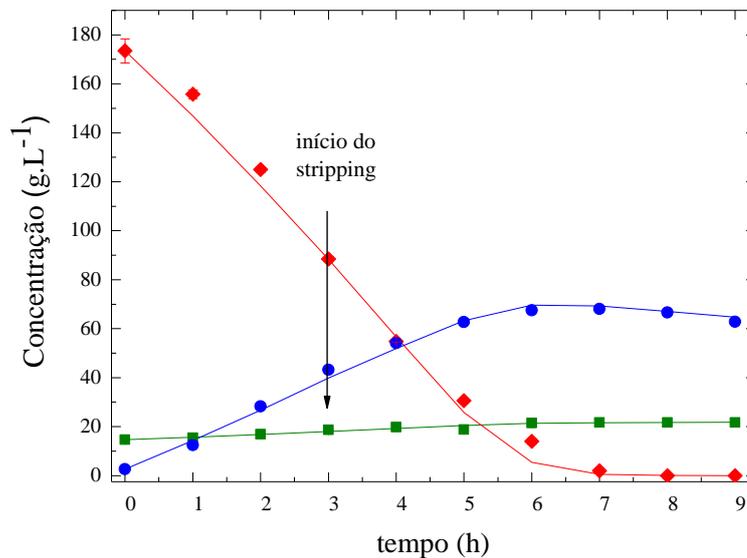


Figura 4.5 - Comparação entre os valores experimentais de C_x (■), C_s (◆) e C_E (●) e simulados (—) para a fermentação extrativa com arraste por CO_2 iniciado após 3 h (FE3; $C_E = 43,3 \text{ g.L}^{-1}$).



A fermentação extrativa em batelada com início do arraste quando a concentração de etanol no caldo era de $43,3 \text{ g.L}^{-1}$ (EF3; **Figura 4.5**) apresentou o maior aumento na produtividade em etanol, em comparação com a fermentação convencional. A remoção do etanol a partir do caldo de fermentação possibilitou uma redução do efeito

inibitório do etanol sobre a levedura, resultando em uma maior velocidade de consumo de substrato ($r_s = -dC_s/dt$) e uma baixa concentração de substrato residual (C_s) de $1,9 \text{ g.L}^{-1}$ (cerca de 1% do valor inicial) após 7 h de fermentação.

Isto indica que a partir de $43,3 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol o efeito de inibição no crescimento celular e conseqüentemente na produção de etanol passa a ser significativo, ficando mais intenso conforme a concentração de etanol no caldo vai aumentando. Estes resultados corroboram com os resultados obtidos por Aiba; Shoda; Nagatani (1968), que mencionam que uma concentração de etanol acima de 40 g.L^{-1} reduz significativamente o crescimento celular e a produção de etanol, afetando, portanto, a produtividade global do processo.

No entanto, os resultados obtidos nas fermentações extrativas demonstram que o efeito inibidor se torna mais forte para concentrações de etanol acima de 60 g.L^{-1} , como mostrado pelos resultados obtidos na fermentação extrativa FE1, em que a remoção do etanol foi iniciada com a concentração de etanol no caldo igual a $65,5 \text{ g.L}^{-1}$. Sendo esta a fermentação que apresentou o menor aumento na produtividade em etanol em comparação à fermentação convencional. Isto demonstra que em fermentações extrativas em batelada não é vantajoso iniciar a remoção do etanol por arraste com CO_2 em uma fase muito avançada da fermentação. Estes resultados estão de acordo com os de Taylor et al. (1996), que observaram que o efeito adverso de etanol em células de levedura se tornou mais forte em concentrações de etanol superiores a 60 g.L^{-1} .

Pode ser observado nas **Figuras 4.3, 4.4 e 4.5** que as fermentações extrativas apresentaram um comportamento diferente com relação ao consumo do substrato, quando comparadas com a fermentação convencional. Em todas as fermentações extrativas, a velocidade de consumo do substrato ($r_s = -dC_s/dt$) aumentou após o início da extração do etanol, resultando no consumo total do substrato num tempo menor, devido à redução da inibição do etanol sobre a levedura. Este efeito foi mais evidente para a fermentação extrativa FE3 (**Figura 4.5**), a qual terminou cerca de 2 h antes que a fermentação convencional. Além disso, as fermentações extrativas FE1, FE2 e FE3 resultaram em aumentos na produtividade de etanol de 11,6, 21,4, e 24,8%, em comparação com a fermentação convencional (**Tabela 4.3**).

O emprego da remoção do etanol por arraste com CO₂ resultou em aumento na produtividade do processo fermentativo em batelada, no entanto, os valores de produtividade obtidos neste estudo ficaram em uma faixa inferior em relação aos valores de produtividade encontrados na literatura (TAYLOR et al., 1997). Isto pode ser explicado pelo fato de que, no presente estudo, todas as fermentações foram iniciadas com a mesma concentração de substrato ($C_{s0}=180 \text{ g.L}^{-1}$) e não foi realizado o reciclo das células de levedura durante as fermentações extrativas em batelada. Taylor et al. (1997), realizaram o estudo da fermentação extrativa contínua com arraste de etanol, empregando glicose como substrato em altas concentrações e reciclo das células de levedura.

Assim, caso o processo de fermentação extrativa empregando sacarose como substrato e arraste de etanol por CO₂ realizado na própria dorna, conforme abordado neste estudo, seja conduzido em batelada alimentada ou em modo contínuo e com reciclo das células de levedura há a possibilidade de se obter maiores valores de produtividade.

As concentrações máximas de etanol obtidas nas fermentações extrativas foram iguais a 73,4 (FE1), 70,4 (FE2), e 68,0 g.L⁻¹ (FE3), valores esses bem abaixo do valor obtido na fermentação convencional (82,1 g.L⁻¹) (**Tabela 4.3**), evidenciando que houve remoção significativa do etanol produzido.

Vale a pena mencionar que a remoção contínua de etanol por arraste com CO₂ já constitui uma etapa de recuperação e concentração do etanol produzido. Em um processo de fermentação contínua empregando esta técnica, haveria geração de uma corrente de gás rica em etanol, o que ajuda a minimizar os custos com energia necessários para a etapa de destilação.

Embora não tenha sido o foco do presente estudo, o etanol removido na corrente de CO₂ pode ser recuperado por absorção em uma coluna de lavagem, como realizado em instalações industriais brasileiras, ou por adsorção utilizando uma fase sólida adequada (HASHI; TEZEL; THIBAUT, 2010).

No processo convencional, a concentração de etanol aumenta até o final da fermentação (9 h), devido à disponibilidade de substrato no caldo. Nas fermentações extrativas, a concentração de etanol começou a diminuir após 7 h de processo, devido ao esgotamento do substrato no caldo, com o consequente encerramento da produção de etanol, combinado com a remoção contínua de etanol por arraste com CO₂. As concentrações finais

de etanol obtidas nas fermentações extrativas confirmam que o dióxido de carbono injetado diretamente na dorna de fermentação removeu parte do etanol formado ao longo do processo (**Tabela 4.3**).

Tabela 4.3 – Comparação entre a fermentação convencional e extrativa.

Variáveis	Unidade	Fermentação			
		Convencional	FE1	FE2	FE3
C_{s0}	g.L^{-1}	173.7	180.3	175.1	173.5
$Y_{x/s}$	$\text{g}_x \cdot \text{g}_s^{-1}$	0.046	0.040	0.040	0.043
C_E total de etanol	g.L^{-1}	82.1	84.8*	83.0*	82.5*
C_E máxima no caldo	g.L^{-1}	82.1	73.4	70.4	68.0
Produtividade volumétrica em etanol	$\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	9.1	10.2*	11.1*	11.4*

*Valores calculados considerando $C_{s0} = 180 \text{ g.L}^{-1}$ nas fermentação extrativas e $Y_{E/S} = 0.46 \text{ g}_E \cdot \text{g}_S^{-1}$.

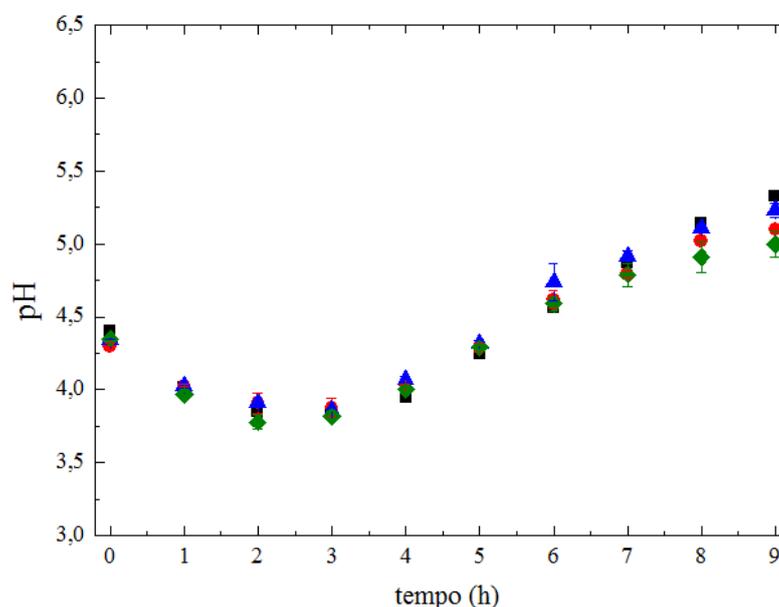
4.2.3 Efeito do CO_2 no pH da fermentação

Um possível efeito negativo da remoção do etanol por borbulhamento de CO_2 seria uma redução do pH do meio de fermentação devido à formação de ácido carbônico. O pH do caldo foi, portanto, monitorado durante as fermentações, a fim de avaliar o efeito do CO_2 sobre a fisiologia das leveduras e cinética do processo. Na **Figura 4.6** são apresentados os perfis de pH ao longo do tempo para as fermentações em batelada.

Analisando a **Figura 4.6** pode ser observado que o uso de CO_2 como gás arraste não causou alterações significativas no pH do caldo durante a fermentação extrativa em relação à fermentação convencional. Em todas as fermentações com remoção de etanol por CO_2 , pequenas alterações no pH só foram observadas após 7 h. Cabendo destacar que para tempos superiores a 7 h durante a fermentação extrativa a concentração substrato no caldo já estava próxima de zero. De acordo com o Norton e Krauss (1972), a inibição do crescimento da levedura *S. cerevisiae* torna-se mais intensa a altas pressões de CO_2 (cerca de 2,7 atm). Dixon e Kell (1989) concluíram que alta pressão de dióxido de carbono leva à inibição da divisão e da produção de novas células (brotamento) em *S. cerevisiae*, porém sem alterar a velocidade de produção de CO_2 . Nas fermentações extrativas descritas no presente estudo, o

arraste do etanol por dióxido de carbono teve início após a 3^a (FE3), 4^a (FE2), e 5^a (FE1) hora de fermentação. Assim, um possível efeito no crescimento celular pode ser descartado em razão de que durante as primeiras horas de fermentação não foi feito o uso de CO₂. Desta forma o crescimento celular ocorreu normalmente permitindo o desenvolvimento da fermentação.

Figura 4.6 – Comparativo entre os perfis de pH ao longo do tempo para as fermentações convencional e extrativa. (■) fermentação convencional, (●) fermentação extrativa FE1, (▲) fermentação extrativa FE2 e (◆) fermentação extrativa FE3.



Uma consideração adicional é que o fermentador não foi pressurizado durante a fermentação extrativa, de modo que o uso de CO₂ como um gás de arraste não afetou as células de levedura durante o processo. Ademais, o efeito positivo da redução do efeito inibitório do etanol sobre a levedura, resultou no aumento da produtividade das fermentações extrativas, evidenciando que as células de levedura não foram afetadas pelo processo de arraste com CO₂.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a utilização da remoção do etanol por arraste com CO₂ realizado na própria dorna durante o processo de fermentação pode diminuir significativamente o efeito inibitório de etanol sobre as células de levedura.

O modelo matemático proposto para a fermentação extrativa em batelada, considerando a remoção do etanol e da água devido ao arraste por CO₂ foi capaz de prever o

comportamento da fermentação extrativa ao longo do tempo. Esta mesma abordagem pode ser aplicada para realizar a modelagem de processos fermentativos em outros modos de operação, como a batelada alimentada e o modo contínuo, os quais são realmente empregados para produção de etanol nas indústrias do setor sucroalcooleiro.

Capítulo 5

**PRODUÇÃO DE ETANOL POR FERMENTAÇÃO
EXTRATIVA EM BATELADA ALIMENTADA COM
ARRASTE DE ETANOL POR CO₂: MODELAGEM E
VALIDAÇÃO EXPERIMENTAL**

Prefácio

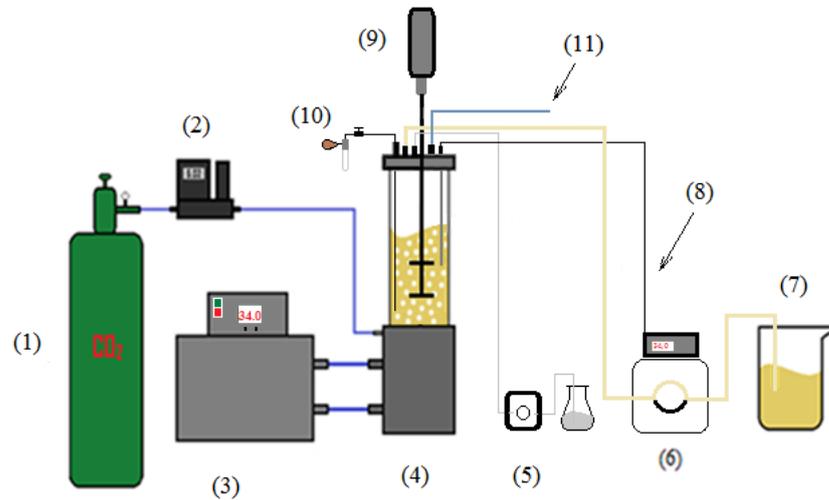
Neste capítulo é apresentado o estudo da fermentação extrativa em batelada alimentada. O objetivo dessa etapa do trabalho foi avaliar a produção de etanol por fermentação extrativa em batelada alimentada empregando CO₂ como gás de arraste. Para isso, foi utilizada uma adaptação da configuração experimental empregada no estudo da fermentação extrativa em batelada. Inicialmente, foi realizada a modelagem da fermentação alcoólica convencional em batelada alimentada e a partir dos dados experimentais da fermentação em batelada alimentada o modelo cinético foi ajustado e os parâmetros estimados. Na sequência, foi realizada a modelagem da fermentação alcoólica extrativa em batelada alimentada com remoção do etanol e da água a partir do meio de fermentação pelo modelo de primeira ordem definido no **Capítulo 3**. Foram realizados ensaios de fermentação extrativa com tempos de enchimento da dorna de 3 e 5 h e início do arraste de etanol por CO₂ com 3 e 5 h de fermentação. Com tempo de enchimento da dorna de 5 h e o início do arraste com 3 h de processo foi possível realizar fermentações extrativas com concentrações de sacarose na alimentação de até 240 g.L⁻¹.

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 Equipamento

As fermentações convencionais e extrativas em batelada alimentada foram realizadas usando o mesmo biorreator pneumático descrito no item 4.1.1. Na **Figura 5.1** está ilustrado um esquema do aparato experimental empregado nos experimentos de fermentação em batelada alimentada. Na **Figura 5.2** é apresentada uma imagem da bancada de trabalho empregada nos experimentos de fermentação em batelada alimentada.

Figura 5.1 – Esquema representativo do aparato experimental empregado nos experimentos de fermentação em batelada alimentada. Descrição: (1) Cilindro de CO₂; (2) Fluxômetro de massa; (3) Banho termostatizado; (4) Biorreator; (5) Antiespumante; (6) Bomba peristáltica; (7) Meio de cultura; (8) Termômetro; (9) Rotor; (10) Retirada de amostra; (11) Exaustão (CO₂ + etanol + água).



Fonte: O autor.

Figura 5.2 – Imagem da bancada de trabalho empregada nos experimentos de fermentação em batelada alimentada.



Fonte: O autor.

5.1.2 Microrganismo e meio de cultura

Para realização desta etapa da tese foi utilizado o microrganismo descrito no item 4.1.2. O meio de cultura empregado apresentou os mesmos constituintes descritos anteriormente (item 4.1.3). Nos experimentos com concentrações iniciais de substrato (C_{S0}) iguais a 220 e 240 g.L^{-1} , as quantidades de KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, extrato de levedura e ureia foram aumentadas em 20%, de forma a se evitar limitações nutricionais.

5.1.3 Procedimento experimental batelada alimentada convencional e extrativa

Nos experimentos em batelada alimentada o volume do inóculo foi de 1,5 L, o qual continha 75 g de levedura (massa seca) hidratada previamente por 30 min em 500 mL de água. Na composição do inóculo não havia presença de substrato e produto ($C_{S0}=0 \text{ g.L}^{-1}$ e $C_{E0}=0 \text{ g.L}^{-1}$). Ao volume inicial do inóculo foram alimentados em cada ensaio 3,5 L de meio de cultura (substrato) com diferentes vazões de alimentação. No início do cultivo foi feito o uso de antiespumante (Qualifoam, diluído 1:10) para impedir formação excessiva de espuma. Após o início do processo fermentativo, a agitação foi mantida em 250 rpm até final da fermentação. A temperatura foi mantida em 34 °C fazendo circular água proveniente de um banho termostatzado pela camisa do biorreator. Amostras de 30 mL foram retiradas a cada 1 h. O volume do meio aumentou linearmente com o tempo, segundo a **Equação 5.1**.

$$V = V_0 + F \cdot t \quad (5.1)$$

onde:

V_0 é o volume inicial (L).

F é a vazão de alimentação do substrato (L.h^{-1}).

Nos ensaios de fermentação extrativa em batelada alimentada seguiu-se o mesmo procedimento descrito para a fermentação convencional, sendo que no momento do início do arraste gasoso foi desligada a agitação mecânica e a vazão do gás de arraste foi controlada empregando-se um fluxômetro de massa AALBORG, modelo GFC 37. A vazão específica de CO_2 empregada nas fermentações extrativas foi de 2,5 vvm, definida a partir do estudo de arraste de etanol de soluções alcoólicas descrito no **Capítulo 3**.

5.1.4 Determinações analíticas

As concentrações de células, sacarose, glicose, frutose e etanol foram determinadas conforme descrito no item 4.2.4.

No final das fermentações em batelada alimentada, foram recolhidas amostras para avaliar a viabilidade celular da levedura. A contagem de células viáveis foi realizada utilizando um microscópio óptico (Olympus, BX50F-3), empregando o método de coloração com azul de metileno (LEE; ROBINSON; WANG, 1981).

5.1.5 Modelagens matemáticas das fermentações convencional e extrativa

Durante a fase de enchimento da dorna em um processo fermentativo operando em batelada alimentada convencional com geração do produto (etanol) associada ao crescimento celular, os balanços de massa para células (X), substrato (S) e etanol (E), considerando a variação do volume devido à vazão de alimentação (F), podem ser representadas pelo conjunto de equações diferenciais ordinárias que segue:

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu \cdot C_X - C_X \cdot \frac{1}{V} \cdot F \quad (5.2)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = (C_{S_F} - C_S) \cdot \frac{1}{V} \cdot F - \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot C_X \quad (5.3)$$

$$\frac{dC_E}{dt} = \frac{Y_{E/S}}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot C_X - C_E \cdot \frac{1}{V} \cdot F \quad (5.4)$$

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (5.5)$$

onde:

C_X é a concentração celular ($g \cdot L^{-1}$).

μ é a velocidade específica de crescimento celular (h^{-1}).

C_S é a concentração de substrato limitante ($g \cdot L^{-1}$).

C_{S_F} é a concentração de substrato na alimentação ($g \cdot L^{-1}$).

C_E é a concentração de etanol ($g \cdot L^{-1}$).

$Y_{X/S}$ e $Y_{E/S}$ são os coeficientes de rendimento de substrato a células ($g_X \cdot g_S^{-1}$) e a etanol ($g_E \cdot g_S^{-1}$), respectivamente.

Após a etapa de alimentação do mosto, o processo fermentativo continua em modo batelada até que o substrato seja esgotado. Nesta fase da fermentação, as equações de balanço de massa a volume constante ($F=0$) para as células (X), substrato (S) e etanol (E) são dadas pelo conjunto de equações que seguem (**Equações 5.6 a 5.8**).

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu \cdot C_X \quad (5.6)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot C_X \quad (5.7)$$

$$\frac{dC_E}{dt} = \frac{Y_{E/S}}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot C_X \quad (5.8)$$

O modelo de crescimento utilizado neste estudo foi o modelo cinético híbrido de Andrews-Levenspiel, considerando as inibições de substrato e produto dado pela **Equação 5.9**.

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_S}{\left(K_S + C_S + \frac{C_S^2}{K_{IS}}\right)} \cdot \left(1 - \frac{C_E}{C_{E\max}}\right)^n \quad (5.9)$$

onde:

μ_{\max} é a velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1}).

K_S é a constante de saturação ($g.L^{-1}$).

K_{IS} é a constante de inibição pelo substrato ($g.L^{-1}$).

$C_{E\max}$ é a concentração máxima de etanol a partir da qual cessa o crescimento celular ($g.L^{-1}$).

n é uma constante adimensional (-).

Os coeficientes de rendimento de substrato a células e a produto (etanol), $Y_{X/S}$ e $Y_{E/S}$, são obtidos pelas Equações 5.10 e 5.11.

$$Y_{X/S} = \frac{C_{Xf} \cdot V_f - C_{X0} \cdot V_0}{(V_f - V_0) \cdot C_{Sf} - C_{S0} \cdot V_0} \quad (5.10)$$

$$Y_{E/S} = \frac{C_{Ef} \cdot V_f}{(V_f - V_0) \cdot C_{Sf} - C_{S0} \cdot V_0} \quad (5.11)$$

onde:

Os subscritos "0" e "f" referem-se aos tempos iniciais e finais, respectivamente.

O subscrito "F" refere-se à alimentação.

5.1.6 Ajuste do modelo cinético

Conforme descrito no item 4.1.7, os parâmetros cinéticos foram estimados utilizando o método de regressão não-linear de Nelder e Mead (1965), juntamente com o algoritmo de Runge-Kutta para solução numérica das equações diferenciais que representavam o modelo. O critério utilizado para a melhor otimização e ajuste de parâmetros foi a minimização da soma dos quadrados dos resíduos.

5.1.7 Modelagem matemática da fermentação extrativa em batelada alimentada com arraste de etanol por CO₂

Na modelagem matemática da fermentação extrativa em batelada alimentada, foi considerada a remoção de etanol e água e também a variação do volume do meio durante o arraste com CO₂. O modelo utilizado encontra-se descrito pelas **Equações de 5.12 a 5.19**.

Durante a fase de alimentação do mosto (etapa em batelada alimentada):

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu \cdot C_X - C_X \cdot \frac{1}{V} \cdot F \quad (5.12)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = (C_{S_F} - C_S) \cdot \frac{1}{V} \cdot F - \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot C_X \quad (5.13)$$

$$\frac{dC_E}{dt} = \frac{Y_{E/S}}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot C_X - C_E \cdot \frac{1}{V} \cdot F - k_E \cdot C_E \quad (5.14)$$

$$\frac{dV}{dt} = F - \frac{(k_E \cdot C_E + k_W \cdot (\rho_W - C_E)) \cdot V}{\rho_W} \quad (5.15)$$

onde:

k_E é a constante de velocidade de remoção de etanol (h⁻¹).

k_W é a constante de velocidade de remoção de água (h⁻¹).

ρ_W é a densidade da água (g.L⁻¹).

Após a fase de enchimento (Fase em batelada):

$$\frac{dC_X}{dt} = \mu \cdot C_X - C_X \cdot \frac{1}{V} \cdot \frac{dV}{dt} \quad (5.16)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot C_X - C_S \cdot \frac{1}{V} \cdot \frac{dV}{dt} \quad (5.17)$$

$$\frac{dC_E}{dt} = \frac{Y_{E/S}}{Y_{X/S}} \cdot \mu \cdot C_X - C_E \cdot \frac{1}{V} \cdot \frac{dV}{dt} - C_E \cdot k_E \quad (5.18)$$

$$\frac{dV}{dt} = -\frac{(k_E \cdot C_E + k_W \cdot (\rho_w - C_E)) \cdot V}{\rho_w} \quad (5.19)$$

Dada a faixa de concentração de etanol aplicada neste estudo (40 to 80 g.L⁻¹), o valor da massa específica foi considerado como sendo o da água a 34 °C (ρ_w=994 g.L⁻¹) (PERRY; GREEN; MALONEY, 1997).

Para o cálculo de C_X, C_S e C_E durante o curso da fermentação foi realizada a solução numérica do conjunto equações diferenciais **Equações (5.12 a 5.19)**. Para isso, foi utilizado o algoritmo de Runge-Kutta, implementado em ambiente Scilab v. 5.4.1.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Fermentação alcoólica convencional em batelada alimentada com diferentes tempos de enchimento: Ajuste do Modelo e estimativa de parâmetros cinéticos

Durante a fermentação alcoólica, a levedura sofre efeitos inibitórios causados pelo substrato, bem como pelo etanol formado e acumulado na dorna durante o processo. O uso de fermentação em batelada alimentada (*fed-batch*) permite regular a concentração de substrato na dorna, a fim de minimizar os efeitos da inibição do substrato. Por isso, o tempo de enchimento da dorna (te) tem uma influência importante sobre a fermentação em modo batelada alimentada. A fim de avaliar o efeito do tempo de enchimento e para realizar a modelagem matemática da fermentação convencional em batelada alimentada, foram conduzidos experimentos com tempos de enchimento (te) de 3 e 5 horas com uma concentração de sacarose na alimentação (C_{FS}) de 180 g.L⁻¹.

Para determinar os parâmetros do modelo cinético híbrido, primeiramente os coeficientes de rendimento em células e etanol (Y_{X/S} e Y_{E/S}) foram calculados utilizando as **Equações 5.10 e 5.11**. Na sequência, os parâmetros cinéticos μ_{max}, K_S, K_{IS}, C_{Emax} e n foram estimados utilizando o algoritmo de Nelder e Mead (1965) para realizar a otimização e o

método de Runge-Kutta para a resolução numérica do sistema de equações diferenciais. Valores dos parâmetros cinéticos foram obtidos com base nos melhores ajustes entre os valores calculados e experimentais de C_X , C_S e C_E das fermentações alcoólicas convencionais em batelada alimentada sem remoção de etanol realizadas em duplicata (FC1 e FC2).

Na **Tabela 5.1** são mostrados os valores estimados dos parâmetros cinéticos relativos às fermentações convencionais FC1 e FC2. Os valores dos parâmetros estimados estão próximos de valores encontrados na literatura (GUIDINI et al., 2014).

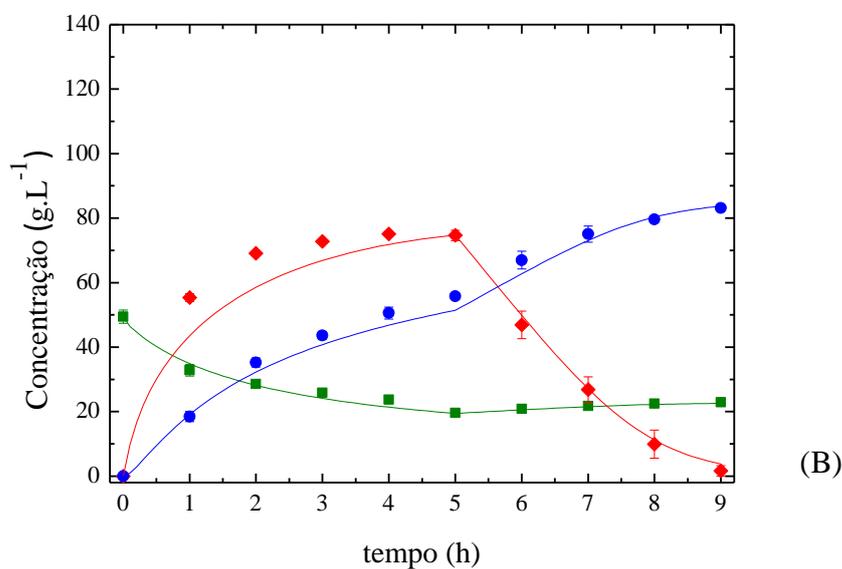
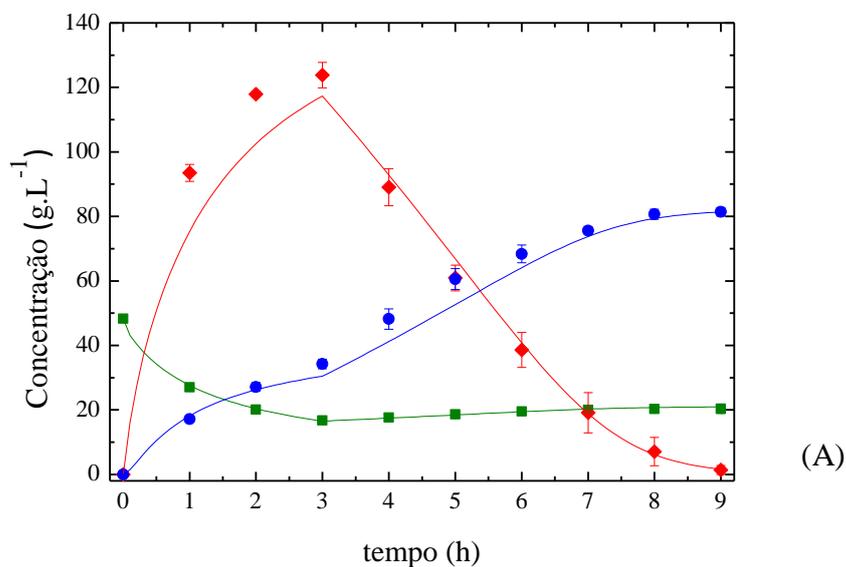
Tabela 5.1 - Valores estimados dos parâmetros cinéticos para a fermentação convencional em batelada alimentada (duplicatas FC1 e FC2).

Parâmetros	Valores
$Y_{X/S}$ ($g_X \cdot g_S^{-1}$)	0,0441±0,0007
$Y_{E/S}$ ($g_E \cdot g_S^{-1}$)	0,454±0,015
μ_{max}^* (h^{-1})	0,127±0,002
K_S^* ($g \cdot L^{-1}$)	25,1±1,8
K_{IS}^* ($g \cdot L^{-1}$)	131,8±9,3
$C_{E_{max}}^*$ ($g \cdot L^{-1}$)	86,1±1,7
n^* (-)	0,22±0,03

*: intervalo de confiança de 95%.

A **Figura 5.3** apresenta a comparação entre os valores simulados e experimentais para as concentrações de células (C_X), substrato (C_S) e etanol (C_E), ao decurso das fermentações convencionais em batelada alimentada com tempos de enchimento (t_e) de 3 e 5 h. Pode ser observado um excelente ajuste dos dados simulados aos dados experimentais, mostrando que o modelo cinético híbrido de Andrews-Levenspiel foi adequado para descrever o comportamento da fermentação alcoólica convencional em batelada alimentada.

Figura 5.3 - Gráfico Comparativo entre os valores simulados (—) e experimentais de C_X (■), C_S (◆) e C_E (●) para a fermentação convencional em batelada alimentada com concentração de substrato na alimentação de 180 g.L^{-1} . (A) FC1 – tempo de enchimento (t_e) de 3 h; (B) FC2 - tempo de enchimento (t_e) de 5 h.



Pode-se observar pela **Figura 5.3** diferenças significativas entre os perfis de C_S e de C_E obtidos utilizando tempos de enchimento de 3 e 5 h. Na fermentação com $t_e=3$ h (**Figura 5.3A**), a concentração de substrato acumulado na dorna atingiu um valor de cerca de 120 g.L^{-1} no final do enchimento, enquanto que com $t_e=5$ h (**Figura 5.3B**), a concentração

acumulada foi em torno 75 g.L^{-1} . No entanto, o esgotamento do substrato ocorreu em 9 h em ambas as fermentações convencionais.

5.2.2 Fermentação extrativa em batelada alimentada utilizando diferentes tempos de início do arraste e diferentes concentrações de substrato no mosto

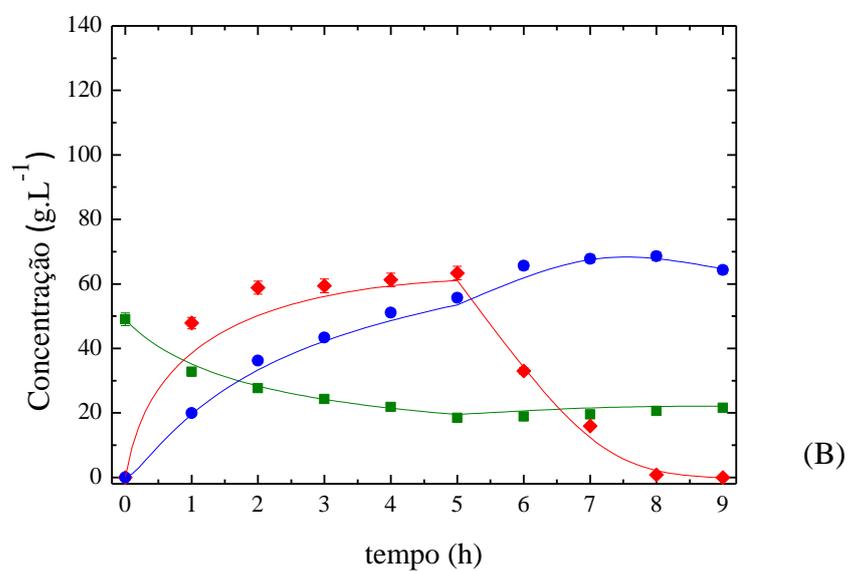
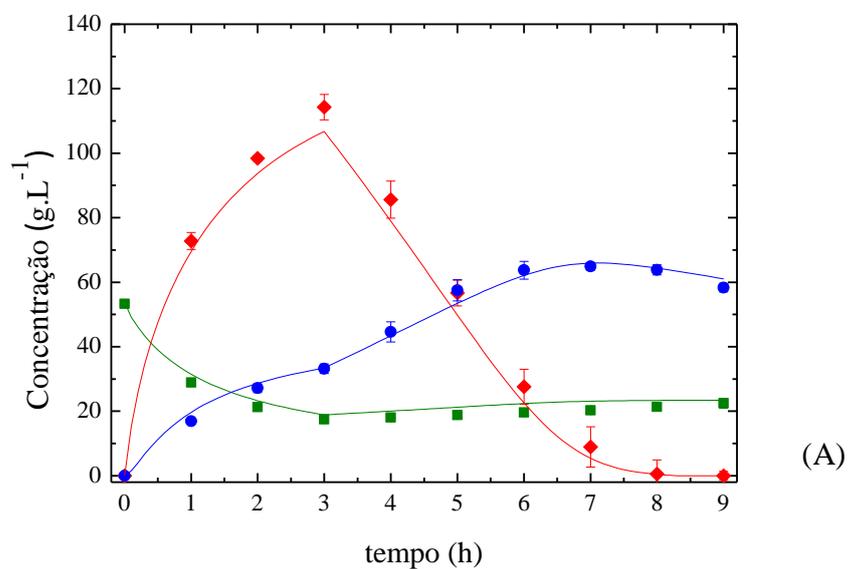
Os valores calculados dos parâmetros de arraste k_E e k_W (**Tabela 3.16**) e o modelo para a fermentação extrativa em batelada alimentada (**Equações 5.12-5.19**) foram utilizados em conjunto com os valores dos parâmetros cinéticos (**Tabela 5.1**) para avaliar o efeito da remoção do etanol sobre a dinâmica da fermentação alcoólica em batelada alimentada com arraste por CO_2 .

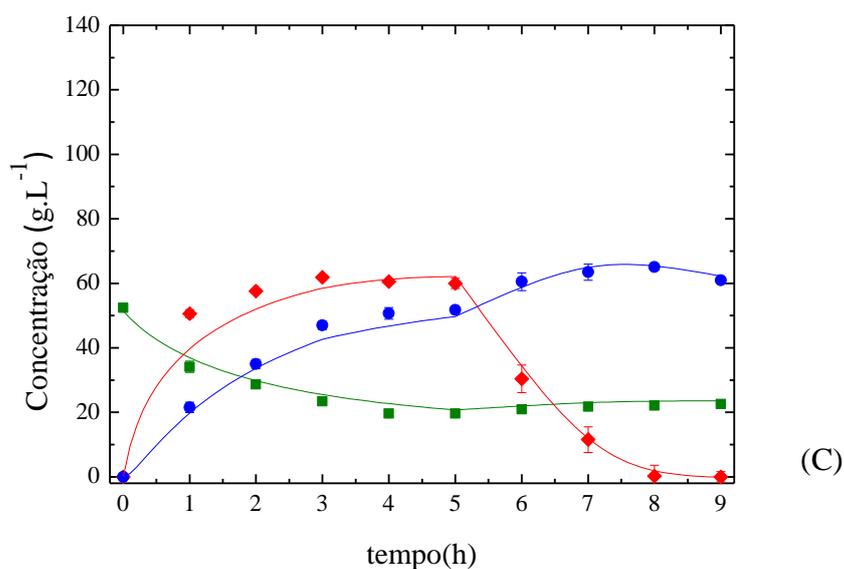
Foram avaliados os efeitos do substrato e etanol acumulados em fermentações extrativas em batelada alimentada realizados com uma concentração de substrato de alimentação (C_{SF}) de 180 g.L^{-1} , temperatura de $34,0 \text{ }^\circ\text{C}$, com vazão específica de CO_2 (ϕ) de 2,5 vvm, tempo de enchimento (t_e) de 3 e 5 h, com o início do arraste de etanol após 3 e 5 h de fermentação.

A **Figura 5.4** apresenta os valores simulados e experimentais de C_s , C_x e C_E ao decorrer das fermentações. Pode-se observar que o modelo proposto foi adequado para prever o comportamento da fermentação extrativa com alta precisão. Também pode ser observado um comportamento diferente das fermentações extrativas em relação à fermentação convencional.

O perfil de concentração de substrato na fermentação extrativa FE1 com tempo de enchimento e início da extração fixados em 3 h (**Figura 5.4A**) mostrou o mesmo comportamento que o da fermentação convencional em batelada alimentada da **Figura 5.3A**, com uma concentração de açúcar de cerca de 120 g.L^{-1} ao final do tempo de enchimento (t_e).

Figura 5.4 – Gráficos comparando os valores simulados (—) e experimentais para as concentrações de células C_x (■), substrato C_s (◆) e etanol C_E (●) nas fermentações extrativas em batelada alimentada: (A) FE1 - te e início do arraste na 3 h; (B) FE2 - te e início do arraste na 5 h; (C) FE3 - te de 5 h e início do arraste na 3 h.





No entanto, a velocidade de consumo de substrato (r_s , em $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) aumentou após o início da remoção do etanol por arraste com CO_2 . Conseqüentemente, o consumo total do substrato ocorreu antes na fermentação extrativa (FE1) em relação à fermentação convencional (FC1), devido à redução da inibição pelo etanol. O consumo total do substrato ocorreu aproximadamente 1 h antes em FE1 em comparação com FC1, com uma produtividade volumétrica de etanol igual a $10,0 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, o que representa um ganho de 11,1% em relação à fermentação convencional sem remoção de etanol (**Tabela 5.2**).

Na fermentação extrativa FE2 realizada com tempo de enchimento de 5 h observa-se um menor acúmulo de substrato ao final da fase de enchimento (**Figura 5.4B**). No entanto, o consumo total do substrato ocorreu em 8 h. Esse comportamento foi devido ao arraste por CO_2 ter sido iniciado depois de 5 h de fermentação, quando a concentração de etanol no caldo era aproximadamente de 55 g.L^{-1} . Mesmo depois de iniciado o arraste com CO_2 , a concentração de etanol no caldo continuou aumentando, atingindo um valor máximo de $68,6 \text{ g.L}^{-1}$ após 8 h de fermentação, com uma produtividade volumétrica de $10,2 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Novamente, a remoção de etanol durante a fermentação diminuiu seu efeito inibitório, resultando em aumento da produtividade de etanol quando comparada à fermentação convencional (**Tabela 5.2**).

A **Figura 5.4C** ilustra os resultados para fermentação extrativa FE3, com tempo de enchimento de 5 h e o início do arraste após 3 h, quando a concentração de etanol no caldo era

de 46,9 g.L⁻¹. Observa-se novamente que a velocidade de consumo de substrato (r_s) aumentou após o início da remoção do etanol por arraste com CO₂, devido à redução da inibição pelo etanol. Isto resultou no consumo total do substrato aproximadamente 1 h antes do que na fermentação convencional (FC2), obtendo-se uma produtividade volumétrica em etanol de 10,3 g.L⁻¹.h⁻¹ (**Tabela 5.2**).

Tabela 5.2 - Comparativo entre as fermentações convencionais (FC) e extrativas (FE) realizadas com tempos de enchimento de 3 e 5 h e início do arraste de etanol por CO₂ após 3 e 5 h.

Variáveis	Unidade	Fermentação				
		FC1	FC2	FE1	FE2	FE3
C _{S0} ou C _{SF}	g.L ⁻¹	182,4	183,9	178,1	180,6	182,7
C _s ao final do tempo de enchimento	g.L ⁻¹	123,8	74,6	114,3	63,3	60,0
C _E no início do arraste de etanol	g.L ⁻¹	-	-	33,2	55,7	46,9
C _E total calculada ^a	g.L ⁻¹	81,4	83,1	80,1	81,3	82,2
C _E máxima no caldo de fermentação	g.L ⁻¹	81,4	83,1	64,8	68,6	65,0
Produtividade volumétrica de etanol ^b	g.L ⁻¹ .h ⁻¹	9,0	9,1	10,0	10,2	10,3

^aCalculado considerando C_{S0} de cada fermentação e Y_{E/S} = 0,45 g_E.g_S⁻¹.

^bCalculado com base no C_E total no processo.

Fica evidente que a utilização da remoção de etanol por arraste com CO₂ proporcionou valores mais elevados de produtividade para as fermentações extrativas FE1, FE2, e FE3 (**Tabela 5.2**).

Para uma concentração de substrato de 180 g.L⁻¹, o tempo de enchimento (t_e) de 3 h (FE1) fornece uma concentração de substrato mais elevada (114,3 g.L⁻¹) ao final do enchimento (**Tabela 5.2**). Quando t_e de 5 h foi empregado (FE2 e FE3), a concentração do substrato no final do enchimento da dorna foi em torno de 60 g.L⁻¹. Assim, tempo de enchimento de 5 h e o início do arraste por CO₂ em 3 h (C_E~40 g.L⁻¹) resultaram em uma menor concentração de etanol no caldo ao longo da fermentação e, conseqüentemente, na diminuição da inibição pelo etanol. O tempo de enchimento (t_e) de 5 h também contribuiu para controlar a concentração do substrato no caldo de fermentação, minimizando a inibição pelo substrato durante as primeiras horas da fermentação.

Com base nos resultados apresentados na **Tabela 5.2**, o tempo de enchimento de 5 h foi estabelecido para utilização nas fermentações subsequentes com elevadas concentrações de substrato na alimentação da dorna. Foram realizadas fermentações extrativas com as seguintes concentrações de substrato na alimentação (C_{SF}): 200, 220 e 240 g.L⁻¹.

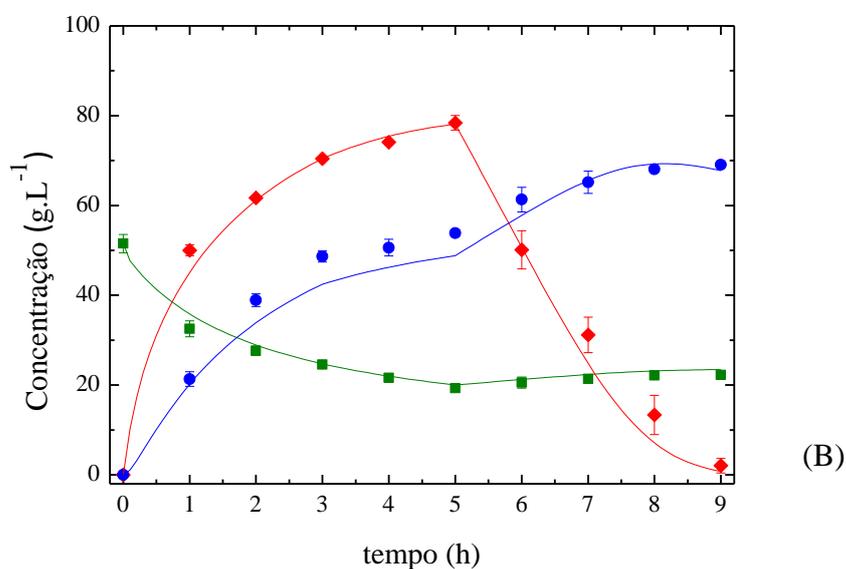
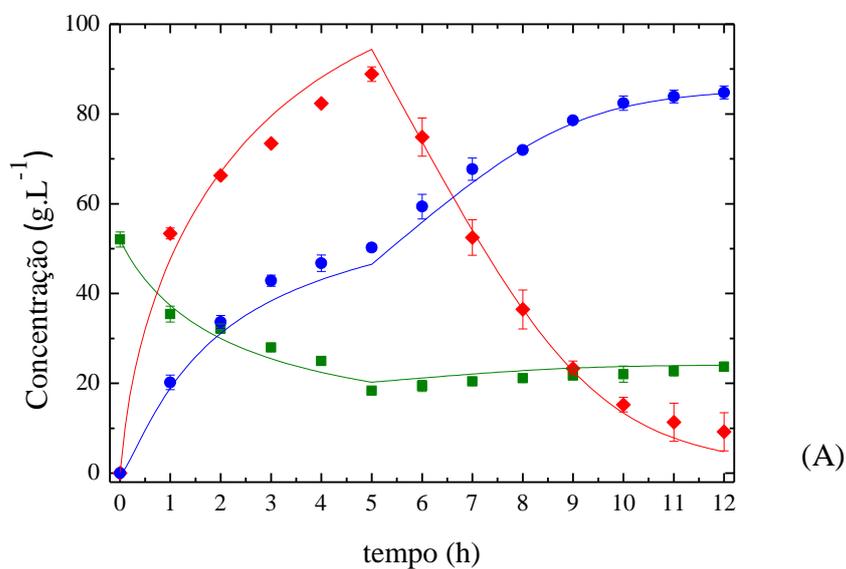
Além dos resultados mostrados na **Tabela 5.2**, simulações foram realizadas com as concentrações de substrato de 200, 220 e 240 g.L⁻¹ empregando tempo de enchimento de 3 h. As simulações mostraram que com $t_e=3$ h, altos valores de C_s ocorreram no caldo de fermentação (até 180 g.L⁻¹) ao final da fase de enchimento, o que poderia comprometer o processo nas horas iniciais devido a uma possível inibição pelos altos valores de concentração de substrato acumulado. O início do arraste após 3 h de fermentação ($C_E \sim 40$ g.L⁻¹) foi definido com base nos valores de concentração de etanol no caldo de fermentação (**Tabela 5.2**) e nos resultados obtidos no **Capítulo 3**. Assim, as fermentações a seguir foram realizadas empregando tempo de enchimento de 5 h e o início do arraste de etanol por CO₂ após 3 h de fermentação.

As Figuras **5.5**, **5.6** e **5.7** apresentam as comparações entre os valores simulados e experimentais de C_x , C_s e C_E para as fermentações alcoólicas convencionais e extrativas em modo batelada alimentada, empregando concentrações de substrato na alimentação de 200, 220 e 240 g.L⁻¹. Mais uma vez foi obtida uma excelente concordância entre os valores experimentais e simulados de C_x , C_s , e C_E para as fermentações em batelada alimentada.

Os resultados para a fermentação convencional FC3 (**Figura 5.5A**) mostrou que, com tempo de enchimento da dorna (t_e) de 5 h, a concentração máxima de substrato no caldo foi de 90 g.L⁻¹ quando a concentração do substrato na alimentação foi de 200 g.L⁻¹. No entanto, esta concentração de substrato resultou em uma fermentação incompleta, com 9,2 g.L⁻¹ de açúcar residual e uma concentração de etanol acumulada de 84,8 g.L⁻¹ após 12 h de fermentação.

A **Figura 5.5B** apresenta os resultados para a fermentação extrativa FE4, com o arraste por CO₂ iniciado após 3 h ($C_E=48,6$ g.L⁻¹). Devido à remoção parcial do etanol por arraste a concentração máxima de etanol no caldo de fermentação foi de 69,1 g.L⁻¹. Assim, houve uma diminuição da inibição pelo etanol, o que resultou no consumo completo do substrato em 9 h de fermentação.

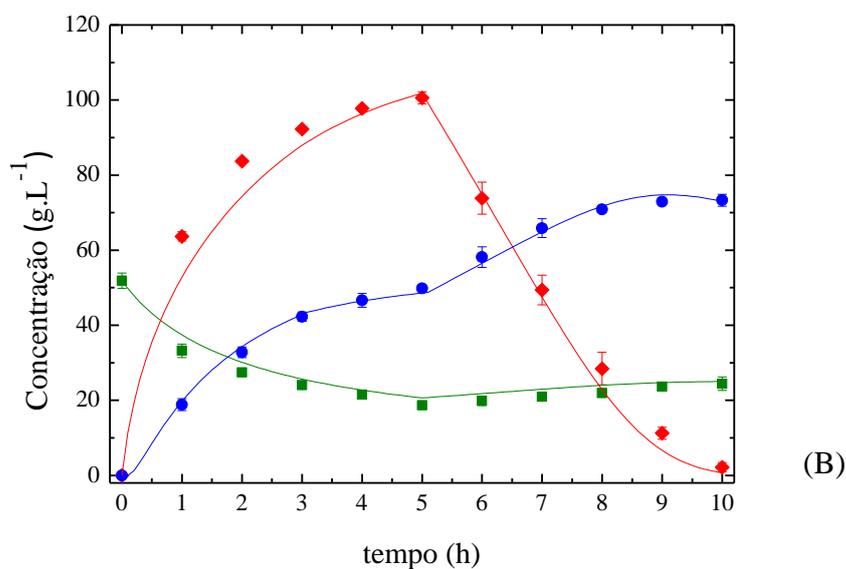
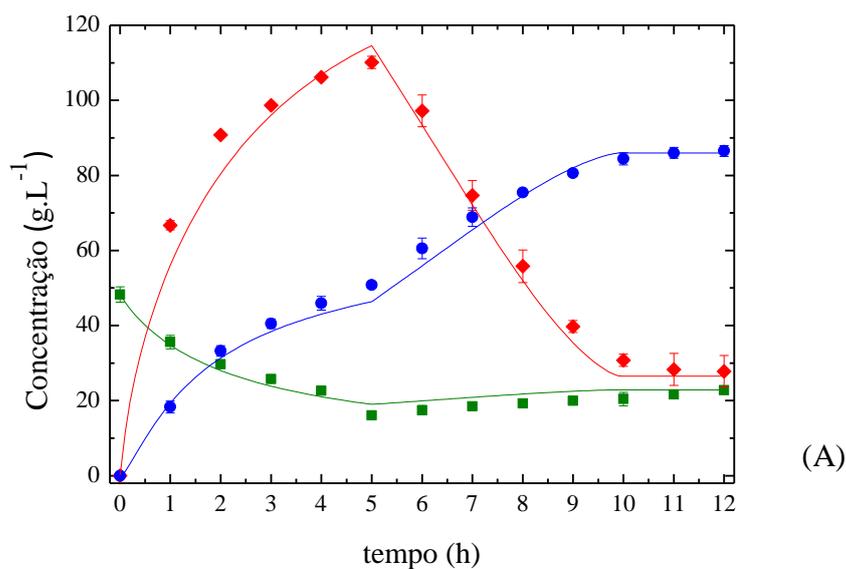
Figura 5.5 - Gráficos comparativos entre os valores de concentração simulados (—) e experimentais de C_x (■), C_s (♦) e C_E (●) para fermentação alcoólica em batelada alimentada com $C_{S_F}=200 \text{ g.L}^{-1}$ e $t_e=5 \text{ h}$. (A) fermentação convencional (FC3); (B) fermentação extrativa (FE4).



A **Figura 5.6A** apresenta os resultados para a fermentação convencional FC4, realizada com uma concentração de substrato na alimentação de 220 g.L^{-1} e $t_e=5 \text{ h}$. Estas condições resultaram em uma concentração máxima de substrato no caldo fermentação de 110 g.L^{-1} . No entanto, após 8 h de fermentação a concentração de etanol no caldo era 75 g.L^{-1} , assim, um forte efeito de inibição devido ao etanol acumulado provocou uma diminuição da velocidade de consumo do substrato, resultando em uma fermentação incompleta com 27,8

$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de açúcar residual e uma concentração de etanol $86,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ao final de 12 h de fermentação.

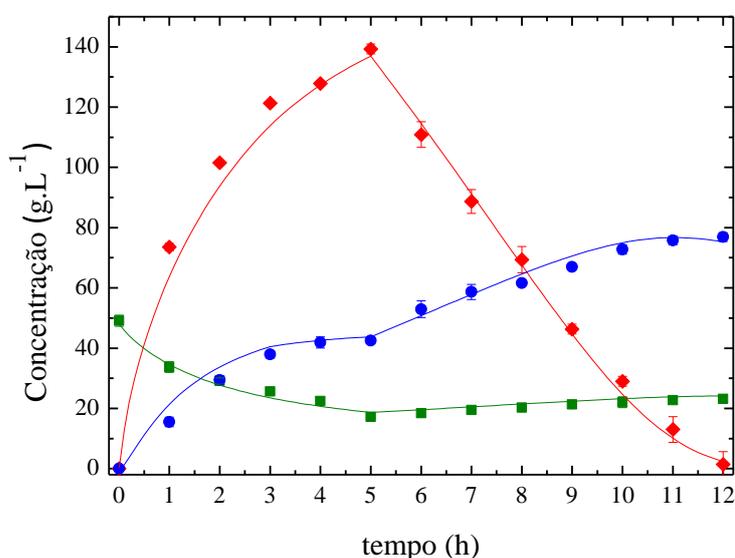
Figura 5.6 - Gráficos comparativos entre os valores de concentração simulados (—) e experimentais de C_X (■), C_S (◆) e C_E (●) para fermentação alcoólica em batelada alimentada com $C_{S_F}=220 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $t_e=5 \text{ h}$. (A) fermentação convencional (FC4); (B) fermentação extrativa (FE5).



A **Figura 5.6B** ilustra os resultados obtidos para fermentação extrativa em batelada alimentada FE5 conduzida com concentração de substrato na alimentação de $220 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e início do arraste com 3 h de fermentação, quando a concentração de etanol era $42,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A concentração máxima de etanol no caldo de fermentação foi de $75,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e consumo

total do substrato ocorreu em 10 h de fermentação, demonstrando a redução da inibição pelo etanol devido à técnica de arraste com CO_2 . A concentração máxima de etanol obtido na fermentação FE5 ($C_E=75,3 \text{ g.L}^{-1}$) foi inferior à concentração máxima de etanol que cessa o crescimento celular ($C_{E_{\text{max}}}=86,1 \text{ g.L}^{-1}$), indicando que haveria a possibilidade de realizar uma fermentação com concentração de substrato na alimentação de 240 g.L^{-1} .

Figura 5.7 - Gráficos comparativos entre os valores de concentração simulados (—) e experimentais de C_x (■), C_s (◆) e C_E (●) para fermentação alcoólica extrativa em batelada alimentada (FE6) com $C_{S_F}=240 \text{ g.L}^{-1}$ e $t_e=5 \text{ h}$.



A **Figura 5.7** apresenta os resultados obtidos para fermentação extrativa FE6, realizada com uma concentração de substrato na alimentação de $C_{S_F}=240 \text{ g.L}^{-1}$, tempo de enchimento de $t_e=5 \text{ h}$ e com início do processo de arraste por CO_2 com 3 h de fermentação, quando a concentração de etanol era de $37,9 \text{ g.L}^{-1}$. Sob estas condições, a concentração máxima de substrato no caldo de fermentação foi de $139,3 \text{ g.L}^{-1}$ e a concentração máxima de etanol foi de $76,9 \text{ g.L}^{-1}$. O tempo de enchimento de 5 h e o início do arraste de etanol com 3 h resultaram em uma fermentação com consumo total do substrato alimentado em 12 h. De acordo com Thatipamala; Rohani; Hill (1992), a inibição pelo substrato sobre as células de levedura ocorre em concentrações superiores a 150 g.L^{-1} . No presente estudo, o tempo de enchimento da dorna de 5 h, foi capaz de manter a concentração de substrato do caldo de fermentação em valores inferiores a 150 g.L^{-1} . Assim, foi possível conduzir a fermentação alcoólica em batelada alimentada com remoção do etanol por arraste com CO_2 com concentrações de substrato na alimentação de até 240 g.L^{-1} .

Os resultados apresentados nas **Figuras 5.5A e 5.6A** mostram que ocorreu uma diminuição da velocidade de consumo de substrato e de formação de etanol após 8 h de fermentação, isso devido ao forte efeito de inibição causado pela elevada concentração de etanol presente meio fermentativo ($>70 \text{ g.L}^{-1}$), resultando em menor produtividade volumétrica de etanol. Um efeito similar foi reportado por Taylor et al. (1996), que mencionam que a inibição do etanol sobre a levedura foi maior em concentrações de etanol superiores a 60 g.L^{-1} . Além disso, vale ressaltar que uma concentração de etanol acima de $85,0 \text{ g.L}^{-1}$ praticamente interrompeu a produção de etanol, concordando com Maiorella et al. (1983), os quais mostraram que uma concentração de cerca de 95 g.L^{-1} inibiu completamente o crescimento celular de leveduras.

Neste estudo, utilizando a fermentação extrativa em batelada alimentada, foi possível alimentar a dorna com um mosto 11,1% mais concentrado em termos de açúcar (FE4; $C_{SF}=200 \text{ g.L}^{-1}$), resultando numa produtividade em etanol de $9,7 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (**Tabela 5.3**). Quando foi empregado um mosto 22,2% mais concentrado em açúcar (FE5; $C_{SF}=220 \text{ g.L}^{-1}$), a produtividade em etanol foi de $10,1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (**Tabela 5.3**). Foi possível ainda realizar uma fermentação extrativa com mosto 33,3% mais concentrado em açúcar (FE6; $C_{SF}=240 \text{ g.L}^{-1}$), com uma concentração final de etanol no caldo de $76,9 \text{ g.L}^{-1}$ (**Tabela 5.3**).

Tabela 5.3 - Comparativo entre as fermentações convencionais (FC3, $C_{SF}=200 \text{ g.L}^{-1}$ e FC4, $C_{SF}=220 \text{ g.L}^{-1}$) e extrativas (FE4, $C_{SF}=200 \text{ g.L}^{-1}$; FE5, $C_{SF}=220 \text{ g.L}^{-1}$ e FE6, $C_{SF}=240 \text{ g.L}^{-1}$) em batelada alimentada realizadas com $t_e = 5 \text{ h}$ e início do arraste de etanol por CO_2 com 3 h de fermentação.

Variáveis	Unidade	Fermentação				
		FC3	FC4	FE4	FE5	FE6
C_{S0} ou C_{SF}	g.L^{-1}	194,4	214,1	195,1	223,6	245,0
Residual C_s no final da fermentação	g.L^{-1}	9,2	27,8	0,0	0,0	0,0
C_E total no processo ^a	g.L^{-1}	87,5	96,3	87,8	100,6	110,0
C_E final no caldo de fermentação	g.L^{-1}	84,8	86,5	69,1	73,3	76,9
Produtividade volumétrica de etanol ^b	$\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$	7,1	7,2	9,7	10,1	9,2
C_E total ^c	$^{\circ}\text{GL}$	11,1	12,2	11,1	12,8	14,0

^aCalculado considerando C_{S0} para cada fermentação e $Y_{E/S}=0,45 \text{ g}_E.\text{g}_S^{-1}$.

^bCalculado com base na C_E total de etanol no processo.

^cCalculado a partir da concentração total de etanol no processo e considerando a densidade do etanol.

Estudos da literatura relacionados ao uso de arraste gasoso relataram aumentos na utilização do substrato e na quantidade de produto (n-butanol) formado em fermentações em batelada alimentada com remoção do produto por arraste gasoso (EZEJI et al., 2005; LU et al., 2012; XUE et al., 2012). Isto demonstra que a fermentação extrativa em batelada alimentada pode ser empregada para minimizar a inibição pelo substrato que pode ocorrer nas primeiras horas do processo e ao mesmo tempo reduzir a inibição de etanol devido à remoção do produto a partir do caldo de fermentação por arraste com CO₂, permitindo que a fermentação prossiga até o esgotamento do substrato.

As concentrações de etanol no caldo ao final das fermentações extrativas FE4, FE5 e FE6 foram 69,1, 73,3 e 76,9 g.L⁻¹ (8,8, 9,3 e 9,7 °GL), respectivamente. Estes valores estão muito próximos aos valores obtidos nas destilarias brasileiras empregando fermentação alcoólica convencional (8-10 °GL). Isto significa que o vinho obtido a partir das fermentações extrativas realizadas com substrato concentrado pode ser enviado para a etapa de destilação, sem comprometer a eficácia do processo. Um ponto importante é que na fermentação FE6, com concentração de substrato na alimentação de 240 g.L⁻¹ resultou em uma concentração total de etanol no processo (considerando o etanol no vinho mais etanol arrastado pelo CO₂) de 110,3 g.L⁻¹ (14 °GL) (**Tabela 5.3**). Este valor é muito superior às concentrações típicas de etanol no vinho encontrados em destilarias brasileiras.

Na fermentação alcoólica convencional em condições industriais, as células de levedura são expostas à inibição por substrato e produto (etanol). Em razão desses efeitos, as usinas brasileiras utilizam baixas concentrações de substrato e, conseqüentemente, produzem vinhos finais com baixas concentrações de etanol, resultando na geração de grandes volumes de vinhaça e no alto consumo de vapor para se obter etanol combustível com concentração de 96 °GL (v.v⁻¹). O uso de fermentação extrativa em batelada alimentada com arraste de etanol por CO₂ pode ser uma excelente forma de reduzir os efeitos inibitórios tanto do substrato quanto do etanol sobre as células de levedura e, assim, proporcionar um melhor desempenho do processo comparado com o processo fermentativo convencional. Além disso, a utilização de mosto mais concentrado em sacarose resulta no aumento da produção de etanol na mesma instalação industrial.

5.2.3 Estudo da viabilidade celular durante as fermentações extrativas em batelada alimentada

Ao final das fermentações em batelada alimentada, amostras foram analisadas usando um microscópio óptico para determinação da viabilidade celular. Nas fermentações convencionais em batelada alimentada FC1 e FC2 ($C_{S0}=180 \text{ g.L}^{-1}$), a viabilidade celular média foi de 55% (com 9 h de fermentação). Nas fermentações convencionais com concentrações de substrato de $C_{S0}=200 \text{ g.L}^{-1}$ e $C_{S0}=220 \text{ g.L}^{-1}$ (FC3 e FC4), a viabilidade celular média foi de 49% (com 12 h de fermentação). As fermentações extrativas em batelada alimentada realizadas com concentrações de substrato de 180 g.L^{-1} (FE1, FE2 e FE3) apresentaram viabilidade celular média de 64%. Nas fermentações extrativas com maiores concentrações de substrato (EF4, EF5, e EF6) a viabilidade média foi de 59%. Os valores de viabilidade obtidos para fermentações extrativas FE1, FE2 e FE3 podem ser explicados pelo fato de que ao final destas fermentações as concentrações de etanol no caldo foram menores do que os valores obtidos em fermentações convencionais FC1 e FC2. Estes resultados confirmam que elevadas concentrações de etanol ($80 > \text{g.L}^{-1}$) apresentam efeito negativo sobre as células de levedura reduzindo sua viabilidade.

Capítulo 6

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR
FERMENTAÇÃO EXTRATIVA EM BATELADA
ALIMENTADA UTILIZANDO CO₂ COMO GÁS DE
ARRASTE**

Prefácio

Neste capítulo é apresentado o estudo da otimização da fermentação extrativa, baseado na modelagem matemática do processo fermentativo em batelada alimentada empregando CO₂ como gás de arraste desenvolvida no **Capítulo 5**. Um algoritmo genético foi empregado para realizar a otimização da fermentação convencional em batelada alimentada (sem arraste), visando obter a vazão ótima de alimentação do mosto. Na sequência, esse algoritmo foi usado para otimizar simultaneamente a vazão de alimentação e a concentração de etanol para iniciar o arraste por CO₂ das fermentações extrativas em batelada alimentada, de modo a obter a máxima produtividade em etanol. De forma a validar as condições definidas na etapa de otimização, foram realizadas fermentações extrativas em batelada alimentada com altas concentrações de açúcar no substrato.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Equipamento

Os ensaios de fermentação alcoólica em batelada alimentada convencional e extrativa foram conduzidos no mesmo aparato experimental descrito no item 5.2.1.

6.2.2 Microrganismo e meio de cultura

Para realização desta etapa da tese foi utilizado o microrganismo descrito no item 5.2.2. O meio de cultura empregado apresentou os mesmos constituintes descritos anteriormente (item 5.2.2). Nos experimentos com concentrações iniciais de substrato (C_{S0}) iguais a 260, 280 e 300 g.L⁻¹, as quantidades de KH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O, extrato de levedura e ureia foram aumentadas em 20%, de forma a se evitar limitações nutricionais.

6.2.3 Procedimento experimental das fermentações em batelada alimentada convencional e extrativa

Nos ensaios de fermentação convencional e extrativa em batelada alimentada seguiu-se o mesmo procedimento descrito no item 5.2.3. Foram realizadas três fermentações extrativas em batelada alimentada com a vazão de enchimento e o início do arraste gasoso

definidos a partir da otimização, com concentrações de substrato alimentado de 260 (FE1), 280 (FE2) e 300 (FE3) g.L⁻¹, respectivamente.

6.2.4 Determinações analíticas

As concentrações de células, sacarose, glicose, frutose e etanol foram determinadas conforme descrito no item 4.2.4.

6.2.5 Otimização das fermentações convencional e extrativa em batelada alimentada

Nas modelagens matemáticas das fermentações convencional e extrativa, considerou-se a etapa de alimentação do mosto (fase de enchimento da dorna) e a etapa em batelada (até o esgotamento do substrato), conforme descrito no item 5.2.5.

A estratégia de otimização empregada consistiu em encontrar a vazão ótima de alimentação do mosto (F) e o valor da concentração de etanol no caldo de fermentação a partir da qual deu-se o início do arraste de etanol por CO₂, maximizando a Função Objetivo (J) definida como sendo a produtividade em etanol ($P_E = C_{Et}/t_f$).

Nas fermentações extrativas onde parte do etanol formado foi arrastado da dorna durante a fermentação, a produtividade foi calculada considerando a concentração total de etanol no processo (etanol no vinho mais etanol arrastado pela corrente gasosa).

Assim, a função objetivo a ser maximizada é dada pela Equação (6.1).

$$J = \max\left(\frac{C_{Et}}{t_f}\right) \quad (6.1)$$

O método de otimização empregado foi o algoritmo genético implementado em ambiente Scilab 5.5.2. Para realizar a otimização, esse método interage com a função objetivo ajustando vazão de alimentação de mosto “F” (**Equação 5.1**) e a concentração de etanol “C_{E0}” para iniciar o arraste de etanol por CO₂.

Os parâmetros do algoritmo genético utilizado na solução do problema de otimização são apresentados na **Tabela 6.1**.

Tabela 6.1 - Parâmetros do algoritmo genético empregado na otimização.

Parâmetros do algoritmo	Valor
Número de indivíduos da população	100
Probabilidade de cruzamento	0,7
Probabilidade de mutação	0,1
Número de gerações	10

Os coeficientes de rendimento ($Y_{X/S}$ e $Y_{E/S}$), os parâmetros cinéticos (μ_{\max} , K_S , K_{IS} , $C_{E\max}$ e n) e parâmetros de arraste gasoso (k_E e k_W) empregados nesta etapa do trabalho foram os mesmos descritos no **Capítulo 5** e estão apresentados na **Tabela 6.2**.

Tabela 6.2 - Valores dos coeficientes de rendimento e parâmetros cinéticos empregados na etapa de otimização.

Coefficientes de rendimento	Valor
$Y_{X/S}$ ($g_X \cdot g_S^{-1}$)	0,0441
$Y_{E/S}$ ($g_E \cdot g_S^{-1}$)	0,454
Parâmetros cinéticos	
μ_{\max} (h^{-1})	0,127
K_S ($g \cdot L^{-1}$)	25,1
K_{IS} ($g \cdot L^{-1}$)	131,8
$C_{E\max}$ ($g \cdot L^{-1}$)	86,1
n (-)	0,22
Parâmetros de arraste	
k_E (h^{-1})	0,066
k_W (h^{-1})	0,0044

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

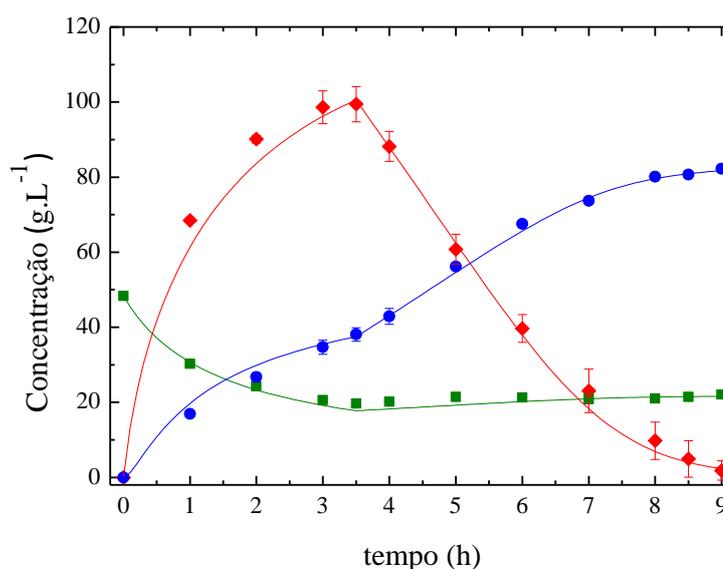
6.3.1 Otimização da fermentação convencional em batelada alimentada

O modelo matemático para a fermentação convencional em batelada alimentada juntamente com os parâmetros cinéticos do modelo de crescimento adotado (**Tabela 6.2**) e os coeficientes de rendimento $Y_{X/S}$ e $Y_{E/S}$ foram utilizados em conjunto com o

algoritmo genético para determinar a vazão ótima de alimentação de mosto (F). A otimização indicou a vazão de alimentação de mosto de $1,0 \text{ L.h}^{-1}$ de forma a atingir a máxima produtividade em etanol. Com o propósito de validar a condição definida pela otimização, foi realizado um ensaio de fermentação convencional em batelada alimentada, com concentração de substrato de 180 g.L^{-1} .

A **Figura 6.1** apresenta a comparação entre os valores experimentais e simulados das concentrações de célula (C_X), substrato (C_S) e etanol (C_E) para a fermentação convencional. Pode-se observar que modelo adotado mostrou-se adequado para descrever o comportamento da fermentação convencional em batelada alimentada.

Figura 6.1 - Comparação entre os valores simulados (—) e experimentais de C_X (■), C_S (◆), e C_E (●) para a fermentação convencional (FC; $C_{S_F}=180 \text{ g.L}^{-1}$) para a vazão de alimentação de mosto de $F=1,0 \text{ L.h}^{-1}$.



A concentração máxima de substrato no caldo ao final da etapa de enchimento da dorna foi de $99,4 \text{ g.L}^{-1}$ e o consumo total do substrato ocorreu em 9 h de fermentação quando a concentração de etanol no caldo era de $82,2 \text{ g.L}^{-1}$, resultando em uma produtividade de $9,1 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Para a concentração de substrato $C_{S_F}=180 \text{ g.L}^{-1}$, a otimização da vazão de enchimento foi adequada para contornar a inibição pelo substrato. No entanto, não proporcionou aumento na produtividade do processo devido ao etanol permanecer no caldo durante a fermentação. No **Capítulo 5** foram obtidos valores de produtividade de 9,0 e 9,1

$\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para a fermentação convencional em batelada alimentada com vazões de alimentação de substrato de 1,166 e 0,7 L.h^{-1} com concentração de substrato na alimentação de 180 g.L^{-1} . Assim, pode-se observar que otimizar somente a vazão de alimentação do substrato permite contornar apenas a inibição relacionada ao substrato. Porém, não permite empregar um mosto mais concentrado em razão da inibição pelo etanol acumulado na dorna.

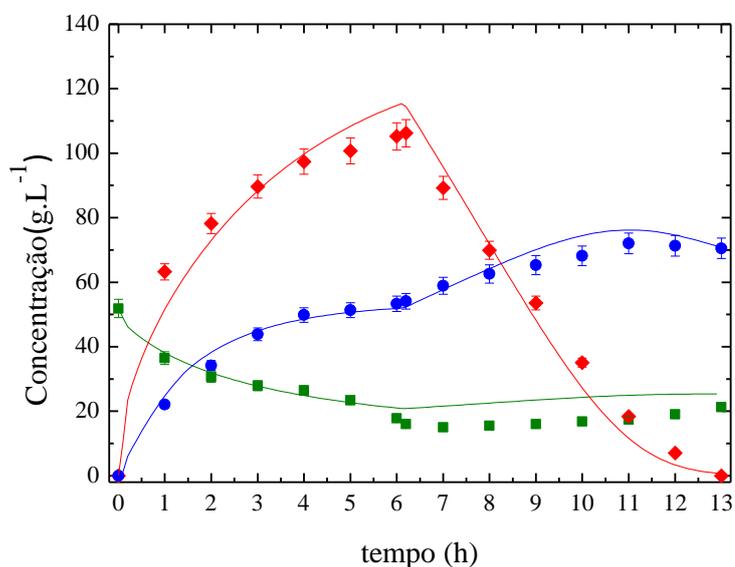
6.3.2 Otimização da fermentação extrativa em batelada alimentada

O modelo da fermentação extrativa com arraste e os parâmetros cinéticos e de arraste (**Tabela 6.2**) foram empregados juntamente com o algoritmo de otimização para determinar as vazões de alimentação (F) de mosto e a concentração de etanol (C_{E0}) para iniciar o arraste com CO_2 .

As condições otimizadas foram avaliadas experimentalmente a partir da realização de fermentações extrativas (FE) com arraste de etanol por CO_2 nas seguintes condições: FE1 ($C_{SF}=260 \text{ g.L}^{-1}$, $F=0,56 \text{ L.h}^{-1}$ e $C_{E0}=34,18 \text{ g.L}^{-1}$), FE2 ($C_{SF}=280 \text{ g.L}^{-1}$, $F=0,51 \text{ L.h}^{-1}$ e $C_{E0}=35,24 \text{ g.L}^{-1}$) e FE3 ($C_{SF}=300 \text{ g.L}^{-1}$, $F=0,44 \text{ L.h}^{-1}$ e $C_{E0}=34,48 \text{ g.L}^{-1}$). Nas **Figuras 6.2, 6.3 e 6.4** são mostradas as comparações entre os valores simulados e experimentais obtidos nas fermentações extrativas avaliadas. Pode ser visto que o modelo descrito no **Capítulo 5** foi capaz de prever adequadamente o comportamento da fermentação extrativa.

A **Figura 6.2** mostra os resultados da otimização da fermentação extrativa FE1. Com a vazão de alimentação de 0,56 L.h^{-1} e concentração de etanol no início do arraste de $C_E=34,18 \text{ g.L}^{-1}$, a concentração máxima do substrato no caldo de fermentação foi de 105,2 g.L^{-1} ao final da fase de enchimento, para a concentração de substrato na alimentação de 260 g.L^{-1} . A concentração máxima de etanol no caldo de fermentação foi de 72,0 g.L^{-1} . O consumo completo do substrato ocorreu em 13 horas de fermentação, resultando em uma produtividade de 9,0 $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (**Tabela 6.3**).

Figura 6.2 - Comparação entre os valores simulados (—) e experimentais de C_x (■), C_s (◆), e C_E (●) para a fermentação extrativa FE1 ($C_{SF}=260 \text{ g.L}^{-1}$) com vazão de alimentação de mosto de $0,56 \text{ L.h}^{-1}$ e início do arraste de etanol quando $C_{E0}=34,18 \text{ g.L}^{-1}$.



A **Figura 6.3** apresenta os resultados da otimização da fermentação extrativa FE2 realizada com concentração de substrato na alimentação de 280 g.L^{-1} . Nesse ensaio a vazão de alimentação do mosto e a concentração de etanol no início do arraste foram $F=0,51 \text{ L.h}^{-1}$ e $C_E=35,24 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Pode-se observar que nesta condição a concentração máxima do substrato no caldo alcançou o valor de $122,7 \text{ g.L}^{-1}$ ao final da alimentação de mosto. Com o completo consumo do substrato ocorrendo em 14 horas, obteve-se uma produtividade volumétrica de etanol de $8,9 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (**Tabela 6.3**).

Figura 6.3 - Comparação entre os valores simulados (—) e experimentais de C_x (■), C_s (◆), e C_E (●) para a fermentação extrativa FE 2 ($C_{sF}=280 \text{ g.L}^{-1}$), vazão de alimentação de mosto de $0,51 \text{ L.h}^{-1}$ e início do arraste de etanol quando $C_{E0}=35,24 \text{ g.L}^{-1}$.

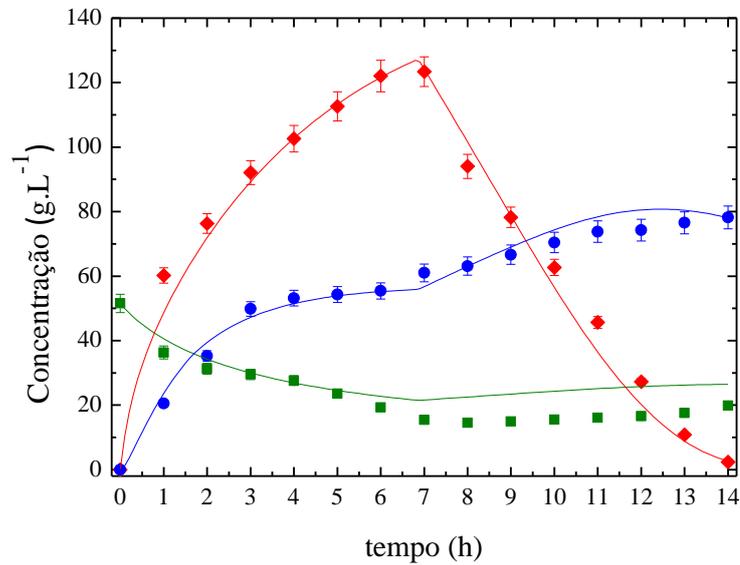
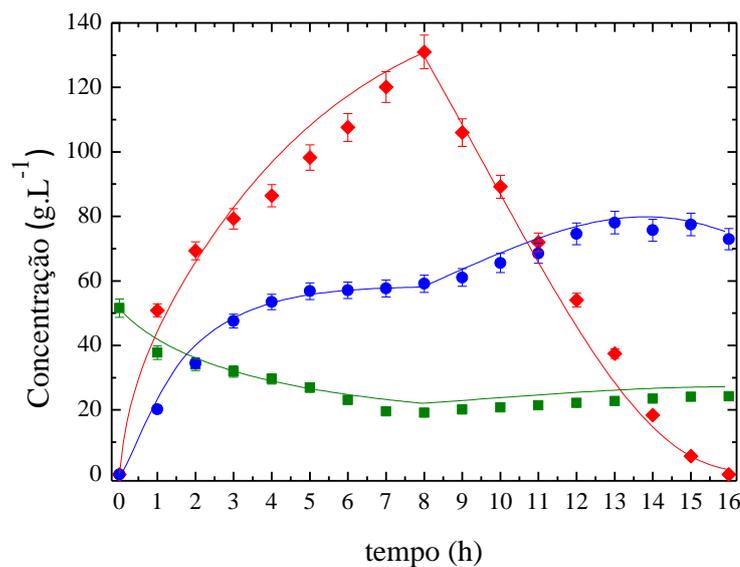


Figura 6.4 - Comparação entre os valores simulados (—) e experimentais de C_x (■), C_s (◆), e C_E (●) para a fermentação extrativa FE3 ($C_{sF}=300 \text{ g.L}^{-1}$), vazão de alimentação de mosto de $0,44 \text{ L.h}^{-1}$ e início do arraste de etanol quando $C_{E0}=34,48 \text{ g.L}^{-1}$.



Na **Figura 6.4** são mostrados os resultados para fermentação extrativa FE3, com concentração de substrato na alimentação de 300 g.L^{-1} . Esses resultados foram obtidos empregando a vazão de alimentação de substrato de $F= 0,44 \text{ L.h}^{-1}$ e a concentração de etanol no início do arraste de $34,48 \text{ g.L}^{-1}$, ambos os valores obtidos empregando a ferramenta de otimização. A concentração máxima do substrato no caldo de fermentação foi de $131,0 \text{ g.L}^{-1}$ ao final da fase de enchimento. A concentração máxima de etanol no caldo de fermentação foi de $78,1 \text{ g.L}^{-1}$. O consumo completo do substrato ocorreu após 16 horas de fermentação, resultando em uma produtividade de $8,6 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Tabela 5.4).

Os valores de concentração de etanol para iniciar o arraste com CO_2 obtidos através da otimização (**Tabela 6.3**) para as fermentações extrativas com altas concentrações de açúcar no substrato (FE1, EF2 e EF3) foram em torno de 35 g.L^{-1} . O início do arraste na faixa de valores indicada pela otimização justifica-se em razão de que em concentrações mais baixas a inibição pelo etanol não é significativa. De acordo com Aiba; Shoda; Nagatani (1968), apenas em concentrações acima de 40 g.L^{-1} o etanol começa a afetar significativamente o crescimento celular e a sua velocidade de produção. Valores de concentração de etanol em torno de 35 g.L^{-1} concordam com resultados obtidos nos Capítulos anteriores, demonstrando que se iniciar o arraste por CO_2 com concentração de etanol no caldo próxima de 40 g.L^{-1} durante a fermentação extrativa em batelada alimentada proporcionou uma maior redução do efeito de inibição pelo etanol, possibilitando realizar fermentações com mosto mais concentrado em açúcar, o que é inviável sem a remoção de etanol do caldo.

Segundo Thatipamala, Rohani, Hill (1992), a inibição pelo substrato em células de levedura passa a ser mais expressiva em concentrações superiores de 150 g.L^{-1} . Assim, as vazões de alimentação do substrato indicadas por meio da otimização foram adequadas para manter a concentração de substrato na dorna abaixo de 150 g.L^{-1} , mesmo quando a concentração de substrato empregada foi de 300 g.L^{-1} (FE3).

Na fermentação extrativa realizada com $C_{sF}=300 \text{ g.L}^{-1}$, a vazão de alimentação do substrato foi de $F=0,44 \text{ L.h}^{-1}$. Nesta condição, a concentração máxima de substrato na dorna foi de $131,0 \text{ g.L}^{-1}$. No **Capítulo 5**, no estudo da produção de etanol por fermentação extrativa em batelada alimentada com vazão de enchimento da dorna definida ($F=0,7 \text{ L.h}^{-1}$) e concentração de substrato na alimentação de 240 g.L^{-1} , verificou-se que a concentração máxima de substrato ao final da fase de enchimento foi de $139,3 \text{ g.L}^{-1}$. Assim, pode-se

observar que a vazão de alimentação do substrato tem uma grande influência no desempenho da fermentação extrativa em batelada alimentada. Dessa forma, a adequação da vazão de alimentação permite regular a concentração do substrato na dorna possibilitando contornar a inibição pelo substrato durante a fase de enchimento da dorna.

Observou-se também que o emprego da ferramenta de otimização tornou possível adequar a vazão de alimentação e a concentração de etanol para iniciar o arraste para cada concentração de substrato avaliada, de forma a obter a máximas produtividades em etanol ao final das fermentações.

Tabela 6.3 - Comparação entre a fermentação convencional otimizada (FC) e as fermentações extrativas otimizadas (FE).

Variáveis	Unidade	Fermentação			
		FC	FE1	FE2	FE3
C_{S_0}	$g.L^{-1}$	183,4	258,6	277,1	304,2
Vazão de alimentação do substrato	$L.h^{-1}$	1,0	0,56	0,51	0,44
C_E no início do arraste	$g.L^{-1}$	-	34,18	35,24	34,48
C_S no final da fase de enchimento	$g.L^{-1}$	99,4	105,2	122,7	131,0
C_E total no processo ^a	$g.L^{-1}$	82,2	116,4	124,7	136,9
C_E máxima no caldo de fermentação	$g.L^{-1}$	82,2	72,0	78,2	78,1
Produtividade volumétrica em etanol ^b	$g.L^{-1}.h^{-1}$	9,1	9,0	8,9	8,6
Concentração total de etanol ^c	$^{\circ}GL$	10,4	14,6	15,8	17,2

^aCalculado a partir do C_{S_0} de cada fermentação e considerando $Y_{E/S}=0.45 g_E.g_S^{-1}$.

^bCalculado a partir da concentração total de etanol no processo.

^cCalculado a partir da concentração total de etanol no processo e considerando a densidade do etanol.

Os valores de concentração máxima de etanol acumulado nos caldos das fermentações extrativas em batelada alimentada foram inferiores a $80 g.L^{-1}$ (Tabela 6.3), o que viabilizou o consumo total do substrato. Isso foi possível devido ao fato de que nessa faixa de concentração, a inibição por etanol não foi forte o suficiente para interromper a produção de etanol. De acordo com o parâmetro cinético $C_{E_{max}}$ (Tabela 6.2), apenas uma concentração de etanol superior a $86,1 g.L^{-1}$ cessa a produção de etanol, resultando em fermentações incompletas.

De acordo com Basso; Basso; Rocha (2011), a concentração de substrato no mosto, geralmente empregada nas destilarias brasileiras, situa-se em torno de 18 a 20° BRIX

(~ 180 g.L⁻¹ dependendo da pureza), o que proporciona uma concentração de etanol no caldo ao final da fermentação de aproximadamente 10 °GL. No entanto, no presente estudo, com a realização da otimização da fermentação extrativa em batelada alimentada, foi possível empregar substrato 44,4% mais concentrado (EF1; C_{SF}=260 g.L⁻¹), resultando em uma concentração total de etanol de 14,6°GL (**Tabela 6.3**). Quando foi empregado substrato 55,5% mais concentrado em açúcar (EF5; C_{SF}=280 g.L⁻¹), a concentração total de etanol foi de 15,8°GL (Tabela 5.4). Foi ainda possível realizar uma fermentação extrativa com substrato 66,6% mais concentrado (EF6; C_{SF}=300 g.L⁻¹), atingindo a concentração total de etanol de 17,2 °GL (**Tabela 5.4**).

No **Capítulo 5**, o estudo da produção de etanol por fermentação extrativa em batelada alimentada com vazão de alimentação do substrato definida ($F=0,7 \text{ L.h}^{-1}$) possibilitou conduzir a fermentação com concentração do substrato na alimentação de até 240 g.L⁻¹, obtendo-se uma concentração total de etanol de 14°GL. No entanto, com o uso da ferramenta de otimização foi possível obter uma concentração total de 17,2°GL. Isto demonstra que a fermentação em batelada alimentada torna possível controlar a concentração de substrato na dorna minimizando os efeitos da inibição do substrato e, quando associada com a técnica de arraste gasoso (fermentação extrativa), possibilita minimizar a inibição pelo etanol, devido a sua remoção ao longo da fermentação. Cabe destacar a importância da ferramenta de otimização empregada neste estudo para definir a vazão de alimentação do substrato e a concentração de etanol para iniciar o arraste gasoso. Esta ferramenta possibilitou realizar fermentações com elevadas concentrações de substrato no mosto (até 300 g.L⁻¹) levando à exaustão do substrato, situação inviável no processo fermentativo convencional sem extração.

Além disso, o uso de alta concentração de sacarose no mosto alimentado resulta em aumento da produção de etanol para um mesmo volume de dorna; em uma expressiva redução no volume de vinha gerado e, conseqüentemente na redução do custo do transporte dessa vinhaça até os canaviais para utilização em irrigação ou como fertilizante.

Assim, este estudo apresenta uma contribuição para a melhoria do processo utilizado pela maioria das usinas no Brasil, empregando CO₂ como agente de extração, o qual se encontra disponível na própria planta industrial.

Capítulo 7

CONCLUSÕES

Dos resultados apresentados nesta tese, conclui-se que:

- A remoção de etanol por arraste gasoso pode ser modelado como um modelo de primeira ordem.
- Para a faixa estudada de vazão específica de CO₂ (ϕ), concentração inicial de etanol (C_{E0}) e temperatura inicial da solução (T_0) o estudo do arraste de etanol de soluções alcoólicas demonstrou que a vazão específica de CO₂ foi a variável que apresentou uma maior influência no arraste de etanol. Porém vazões elevadas resultam em uma grande remoção de água juntamente com o etanol. Assim, vazões do gás de arraste na faixa de 2 - 2,5 vvm foram suficientes para remover parte do etanol ao longo das fermentações e minimizar o efeito de inibição do etanol.
- O modelo cinético híbrido de Andrews-Levenspiel proporcionou um excelente ajuste aos dados experimentais das fermentações convencionais em batelada e batelada alimentada. O modelo proposto para a fermentação extrativa foi capaz de fornecer uma descrição adequada do comportamento das fermentações extrativas com remoção de etanol por CO₂.
- Os resultados de fermentação extrativa em batelada mostraram que a remoção do etanol por arraste com CO₂ foi capaz de minimizar o efeito de inibição do etanol sobre a levedura. Como resultado, observou-se um aumento na velocidade de consumo do substrato e conseqüentemente um aumento na produtividade em etanol. A fermentação extrativa em batelada proporcionou um ganho de aproximadamente 25% na produtividade em relação a fermentação convencional em batelada.
- A fermentação extrativa em batelada alimentada com arraste de etanol por CO₂ possibilitou contornar o efeito da inibição pelo substrato devido à operação em batelada alimentada e contornar a inibição pelo etanol devido ao arraste gasoso. A fermentação extrativa em batelada alimentada realizada com tempo de enchimento de 5 h e o início do arraste com 3 h de fermentação possibilitou realizar fermentações extrativas empregando concentração de sacarose de até $C_{FS}=240 \text{ g.L}^{-1}$. Nestas condições, obteve-se uma concentração total de etanol de aproximadamente 14 °GL.

- Ao otimizar a vazão de alimentação do mosto (F) e a concentração de etanol para iniciar o arraste (C_{E0}), os efeitos inibitórios relacionados ao substrato e ao etanol foram contornados. A otimização da fermentação extrativa em batelada alimentada possibilitou alimentar o fermentador com mosto mais concentrado ($C_{FS}=300 \text{ g.L}^{-1}$), resultando numa concentração total de etanol de 17,2 °GL, a qual significa um aumento de 65% comparado à concentração final de etanol obtida na fermentação convencional em batelada alimentada sem arraste de etanol por CO_2 e com $C_{FS}=180 \text{ g.L}^{-1}$.
- A técnica de arraste do etanol por CO_2 durante a fermentação se mostrou promissora, principalmente quando as fermentações foram conduzidas em batelada alimentada. Possibilitando contornar os efeitos de inibição do substrato e do etanol, permitindo empregar substratos mais concentrados em sacarose resultando em uma redução do volume de água inserido no processo e conseqüentemente uma redução do volume de vinhaça gerado.

Capítulo 8

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

As sugestões para trabalhos futuros são as seguintes:

- Estudar a fermentação extrativa contínua com arraste de etanol por CO₂.
- Realizar fermentações extrativas com arraste de etanol por CO₂ empregando leveduras industriais.
- Avaliar a remoção de calor e etanol durante a fermentação extrativa com arraste gasoso empregando CO₂.
- Avaliar outras configurações do biorreator pneumático para realizar os experimentos de fermentação extrativa com arraste gasoso.

REFERÊNCIAS

AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATANI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, n. 6, p. 845–864, nov. 1968.

ALBERS, E.; LARSSON, C.; LIDÉN, G.; NIKLASSON, C.; GUSTAFSSON, L. Continuous estimation of product concentration with calorimetry and gas analysis during anaerobic fermentations of *Saccharomyces cerevisiae*. **Thermochimica Acta**, v. 394, n. 1-2, p. 185–190, out. 2002.

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; DE CASTRO OLIVEIRA, J. V.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1267–75, set. 2011.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. **Processo de produção de álcool – controle e monitoramento**. FERMENTEC, Piracicaba, 1996.

ANA – Agência Nacional de Águas. Manual de Conservação e Reúso de Água na Agroindústria Sucroenergética / Agência Nacional de Águas; Federação das Indústrias do Estado de São Paulo; União da Indústria da Cana-de-açúcar; Centro de Tecnologia Canavieira – Brasília, 2009.

ANDREWS, J. F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, n. 6, p. 707–723, nov. 1968.

ANDRIETTA, S. R. Modelagem, simulação e controle de Fermentação alcoólica contínua em escala industrial. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

ANDRIETTA, S. R.; MIGLIARI, P. C.; ANDRIETTA, M. G. S. Classificação de cepas de levedura de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa. **STAB- Açúcar Álcool e Subprodutos**, v. 17, p. 54 – 59, 1999.

AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biociologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. Vol. 03. Edgard Blucher Ltda. São Paulo- SP, Brasil, 2001.595p.

ATALA, D. I. P. Montagem, instrumentação, controle e desenvolvimento experimental de um processo fermentativo extrativo de produção de etanol. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 89–105, jan. 2008.

BADINO, A. C.; CERRI, M. O.; HOKKA, C. O. **Sistema reacional pneumático e uso do mesmo** Brazilian, 2007. Disponível em: <http://www.patentesonline.com.br/sistema-reacional-pneum-tico-e-uso-do-mesmo-187759.html>.

BADINO, A. C.; CRUZ, A. J. G. **Reatores Químicos e Bioquímicos**. Coleção UAB-UFSCar, São Carlos, 2012.

BASTOS, R. G. **Tecnologia das Fermentações: Fundamentos de Bioprocessos**. EdUFSCar, 2010, 162 p.

BASSO, L.; BASSO, T.; ROCHA, S. Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation. **Biofuel production - Recent Developments and Prospects**, v. 1530, p. 85–100, 2011.

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, 86, p. 2273–2282, 2009.

BONOMI, A. SCHMIDELL, W. **Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos**. In. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Vol. 2. Editora Edgard Blucher. São Paulo, 2001. p.123-178.

BORGES, M. T. M. R. **Química Tecnológica Geral. Tecnologia Sucroalcooleira**. Coleção UAB-UFSCar, São Carlos, 2009.

CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, O. J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. **Bioresource technology**, v. 98, n. 12, p. 2415–57, set. 2007.

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

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. **Fermentação Descontínua**. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Vol. 2. Editora Edgard Blucher. São Paulo, 2001. p. 193-204.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Avaliação do Potencial Poluidor da Agroindústria Sucroalcooleira na 7ª Zona Hidrográfica do Estado de São Paulo. 1986. 88p.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira**. Disponível em: < <http://www.conab.gov.br> > Acessado em jan.2016.

CRISPIM, J. C. Manual da produção de aguardente de qualidade. Guaíba, Agropecuária. 2000, 336p.

DERRINGER, G. e SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, p. 214-19, 1980.

DARÉ, R. M. Avaliação de coeficientes de rendimento e modelagem do processo fermentativo de produção de etanol. 67 p. Dissertação, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

DE VRIJE, T.; BUDDE, M.; VAN DER WAL, H.; CLAASSEN, P. A. M.; LÓPEZ-CONTRERAS, A. M. “In situ” removal of isopropanol, butanol and ethanol from fermentation broth by gas stripping. **Bioresource technology**, v. 137, p. 153–9, jun. 2013.

DIAS, M. O. S. Simulação do processo de produção de etanol a partir de açúcar e do bagaço visando a integração do processo de maximização da produção de energia e excedentes do bagaço. 282 p. Dissertação – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

DIXON, N. M.; KELL, D. B. The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of micro-organisms. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 67, n. 2, p. 109–136, 11 ago. 1989.

EZEJI, T. C.; KARCHER, P. M.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Improving performance of a gas stripping-based recovery system to remove butanol from *Clostridium beijerinckii* fermentation. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 27, n. 3, p. 207–14, maio 2005.

EZEJI, T. C.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in situ recovery by gas stripping. p. 595–603, 2003.

EZEJI, T. C.; QURESHI, N.; BLASCHEK, H. P. Acetone butanol ethanol (ABE) production from concentrated substrate: Reduction in substrate inhibition by fed-batch technique and product inhibition by gas stripping. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 6, p. 653–658, fev. 2004.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação Contínua. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Vol. 2. Editora Edgard Blucher. São Paulo, 2001. p. 223- 246.

GASI, T. M. T.; SANTOS, J. A. de O. Aspectos do lançamento de vinhaça sobre o solo. São Paulo (BR), USP/FSP, 1984. 47p.

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

GODOY, A.; AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, A. J. Continuous and batch fermentation processes: Advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. **International sugar journal**, v. 110, p. 175–181, 2008.

GUIDINI, C. Z.; MARQUEZ, L. D. S.; DE ALMEIDA SILVA, H.; DE RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Alcoholic fermentation with flocculant *Saccharomyces cerevisiae* in fed-batch process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 3, p. 1623–1638, 2014.

HASHI, M.; TEZEL, F. H.; THIBAUT, J. Ethanol Recovery from Fermentation Broth via Carbon Dioxide Stripping and Adsorption †. **Energy & Fuels**, v. 24, n. 9, p. 4628–4637, 16 set. 2010.

HENDLER, B. Construção de um Software de Simulação e Modelagem Para Processo de Fermentação Alcoólica em Batelada Alimentada, Considerando Diauxia Para a Glicose e a Frutose. Tese (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

IBETO, C. N.; OFOEFULE, A. U.; AGBO, K. E. **A Global Overview of Biomass Potentials for Bioethanol Production: A Renewable Alternative Fuel Trends in Applied**

Sciences Research, 2011.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, v. 11, p. 641–649, 1981.

LEONEL, M.; CEREDA, M. P.; ROAU, X. Aproveitamento do resíduo da produção de etanol a partir de farelo de mandioca, como fonte fibras dietéticas. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 19, n. 2, p. 241-245, mai. 1999.

LEVENSPIEL, O. The monod equation: A revisit and a generalization to product inhibition situations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, n. 8, p. 1671–1687, ago. 1980.

LEWIS, W. K.; WHITMAN, W. G. Principles of gas absorption. *Industrial and Engineering Chemistry*, v.16, n.12, p. 825-833, 1924.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos. **Biotecnologia Industrial**, v.3, p.1-43, 2001.

LLOYD, D.; MORRELL, S.; CARLSEN, H. N.; DEGN, H.; JAMES, P. E.; ROWLANDS, C. C. Effects of growth with ethanol on fermentation and membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast (Chichester, England)**, v. 9, n. 8, p. 825–33, ago. 1993.

LOPES, C. H.; BORGES, M. T. M. R. Controle na fabricação de álcool. São Carlos, SP, Ed. UFSCar, 95 p., 2009.

LOPES, J. J. C.; PARAZZI, C. Fermentação alcoólica. Araras, SP, UFSCar/DTAiSER, 26 p., 2007.

LU, C.; ZHAO, J.; YANG, S.-T.; WEI, D. Fed-batch fermentation for n-butanol production from cassava bagasse hydrolysate in a fibrous bed bioreactor with continuous gas stripping. **Bioresource technology**, v. 104, p. 380–7, jan. 2012.

LUEDEKING, R.; PIRET, E. L. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. **Journal of biochemical and microbiological technology and engineering**, v. 1, n. 4, p. 393–412, 1959.

LY, H. V.; BLOCK, D. E.; LONGO, M. L. Interfacial Tension Effect of Ethanol on Lipid Bilayer Rigidity, Stability, and Area/Molecule: A Micropipet Aspiration Approach. **Langmuir**, v. 18, n. 23, p. 8988–8995, nov. 2002.

MAGAZONI, F. C. Análise dinâmica de um chiller de absorção de brometo de lítio-água em processo de resfriamento de dorna de fermentação alcoólica. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

MAIORELLA, B. L.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Alcohol production and recovery. In: FLECHTER, A., *Advances in biochemical engineering*. Heidelberg: Springer Verlag, 1981, v.20, p.41-73.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 25, n. 1, p. 103–21, jan. 1983.

MAIORELLA, B. L.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Economic evaluation of alternative ethanol fermentation processes. **Biotechnology and bioengineering**, v. 26, n. 9, p. 1003–25, set. 1984.

MENEZES, T. J. B. **Etanol o combustível do Brasil**. São Paulo, Editora Agronômica Ceres Ltda, 1980. 229 p.

MOHANA, S.; ACHARYA, B. K.; MADAMWAR, D. Distillery spent wash: treatment technologies and potential applications. **Journal of hazardous materials**, v. 163, n. 1, p. 12–25, 15 abr. 2009.

MORANDIN, M.; TOFFOLO, A.; LAZZARETTO, A.; MARÉCHAL, F.; ENSINAS, A. V.; NEBRA, S. A. Synthesis and parameter optimization of a combined sugar and ethanol production process integrated with a CHP system. **Energy**, v. 36, n. 6, p. 3675–3690, jun. 2011.

MOULIN, G.; BOZE, H.; GALZY, P. Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, v. 22, p. 2375-2381, 1980.

NELDER, J. A.; MEAD, R. A Simplex Method for Function Minimization. **The Computer Journal**, v. 7, n. 4, p. 308–313, 1 jan. 1965.

NIGAM, P. S.; SINGH, A. **Production of liquid biofuels from renewable resources** *Progress in Energy and Combustion Science* Elsevier Ltd, , fev. 2011.

NORTON, J. S.; KRAUSS, R. W. The inhibition of cell division in *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen) by carbon dioxide. **Plant Cell Physiol**, v. 13, n. 1, p. 139–149, 1972.

PARK, C.-H.; GENG, Q. Simultaneous Fermentation and Separation in the Ethanol and Abe Fermentation. **Separation & Purification Reviews**, v. 21, n. 2, p. 127–174, jan. 1992.

PERRY, R. H.; GREEN, D. W.; MALONEY, J. O. **Perry's chemical engineers' handbook**. New York: McGraw Hill, 1997.

PHAM, C. B.; MOTOKI, M.; MATSUMURA, M.; KATAOKA, H. Simultaneous ethanol fermentation and stripping process coupled with rectification. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 68, n. 1, p. 25–31, jan. 1989.

REIS, V. R. Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para a produção de etanol. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2011.

RIVERA, E. C.; COSTA, A. C.; ATALA, D. I. P.; MAUGERI, F.; MACIEL, M. R. W.; FILHO, R. M. Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: Application to ethanol fermentation considering the effect of temperature. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 7, p. 1682–1687, jul. 2006.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 2ª Ed. – Campinas, SP, Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor. 2009.

ROMÃO, B. B. Produção de etanol por hidrólise ácida de melaço de soja. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

ROSSETO, A. J. Utilização agrônômica dos subprodutos e resíduos da indústria açucareira e alcooleira. In: PARANHOS, S. B. (Ed). Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Campinas: Fundação Cargill, 1987, v.2, p.435-504.

SILVA, A. J. N.; CABEDA, M. S. V. Soil compaction and compressibility parameters in relation to management systems an water content. Rev. Bras. Ciência do Solo, n. 30, 2006.

SILVA-PINTO, C. R. Remoção de etanol por *stripping* empregando dióxido de carbono. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

SILVA, M. A. da, GRIEBELER, N. P., BORGES, C. Uso de Vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v. 11, n. 1 p. 108-114, 2007.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores e Processos Fermentativos. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Vol. 2. Editora Edgard Blucher. São Paulo, 2001. p. 179 - 192.

SCHÜGERL, K. Integrated processing of biotechnology products. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 7, p. 581–599, nov. 2000.

SCHULZ, M. A. Produção de bioetanol a partir de rejeitos da bananicultura: polpa e cascas de banana. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Programa de Mestrado em Engenharia de Processos, Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2010.

SLAPACK, G. E.; RUSSEL, I. ; STEWART. G. G. Thermophilic microbes in ethanol production. Florida: CRC Press, 1987, 186 p.

SOUTO. G. D. B. Lixiviado de aterros sanitários brasileiros – estudo da remoção do nitrogênio amoniacal por processo de arraste com ar (“stripping”). 2009. 371 p. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

SOUZA, C. S. Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae*. 136 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan IPT, São Paulo, 2009.

STECKELBERG, C. Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas. 202 p. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

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.

SZWARC, A. **Álcool Combustível**, Instituto Euvaldo Lodi – Série Indústria em Perspectiva, IEL, Brasília, 2008, cap. 7.

TAYLOR, F.; KURANTZ, M. J.; GOLDBERG, N.; CRAIG, J. C. Continuous

fermentation and stripping of ethanol. **Biotechnology progress**, v. 11, n. 6, p. 693–8, 1995.

TAYLOR, F.; KURANTZ, M. J.; GOLDBERG, N.; CRAIG, J. C. Control of packed column fouling in the continuous fermentation and stripping of ethanol. **Biotechnology and bioengineering**, v. 51, n. 1, p. 33–9, 5 jul. 1996.

TAYLOR, F.; KURANTZ, M. J.; GOLDBERG, N.; CRAIG, J. C. Effects of ethanol concentration and stripping temperature on continuous fermentation rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, n. 3, p. 311–316, 26 set. 1997.

TAYLOR, F.; KURANTZ, M. J.; GOLDBERG, N.; CRAIG, J. C. Kinetics of continuous fermentation and stripping of ethanol. v. 20, n. 1, p. 67–72, 1998.

TAYLOR, F.; MARQUEZ, M. A.; JOHNSTON, D. B.; GOLDBERG, N. M.; HICKS, K. B. Continuous high-solids corn liquefaction and fermentation with stripping of ethanol. **Bioresource technology**, v. 101, n. 12, p. 4403–8, jun. 2010.

THATIPAMALA, R.; ROHANI, S.; HILL, G. A. Effects of high product and substrate inhibitions on the kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, n. 2, p. 289–297, 20 jun. 1992.

TORRES, B.B.; MARZZOCO, A. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1999. 360 p.

TOSETTO, G. M., Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol. Tese (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, (2002).

TRUONG, K. N.; BLACKBURN, J. W. The stripping of organic chemicals in biological treatment processes. **Environmental Progress**, v. 3, n. 3, p. 143–152, ago. 1984.

VAZQUEZ, G.; ALVAREZ, E.; NAVAZA, J. M. Surface tension of alcohol + water from 20 to 50° C. *J. Chem. Eng.*, v. 40, p. 611-614, 1995.

WANG, F. S.; SHEU, J. W. Multiobjective parameter estimation problems of fermentation processes using a high ethanol tolerance yeast. **Chemical Engineering Science**, v. 55, p. 3685 – 3695, 2000.

WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, v. 17, n. 12, p. 482–487, 1 dez. 1999.

XUE, C.; ZHAO, J.; LU, C.; YANG, S.-T.; BAI, F.; TANG, I.-C. High-titer n -butanol production by *clostridium acetobutylicum* JB200 in fed-batch fermentation with intermittent gas stripping. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 11, p. 2746–2756, nov. 2012.

XUE, C.; ZHAO, J.; LIU, F.; LU, C.; YANG, S.-T.; BAI, F. W. Two-stage in situ gas stripping for enhanced butanol fermentation and energy-saving product recovery. **Bioresource technology**, v. 135, p. 396–402, maio 2013.