

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENERGIA

THAIS CALIMAN CATELAN

**USO DE MODELOS EMPÍRICOS NÃO-LINEARES PARA PREDIZER A  
PRODUÇÃO DE CELULASES UTILIZANDO *Aspergillus niger* E BAGAÇO DE  
CANA DE AÇÚCAR COMO SUBSTRATO**

São Mateus – ES

2020

THAIS CALIMAN CATELAN

**USO DE MODELOS EMPÍRICOS NÃO-LINEARES PARA PREDIZER A  
PRODUÇÃO DE CELULASES UTILIZANDO *Aspergillus niger* E BAGAÇO DE  
CANA DE AÇÚCAR COMO SUBSTRATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Energia do Centro Universitário do Norte do Espírito Santo da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Energia, na área de concentração Engenharia Tecnologia e Gestão.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Laura Marina Pinotti

Coorientador: Prof. Dr. Vinícius Barroso Soares

São Mateus – ES

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

C358u Catelan, Thais Caliman, 1992-  
    Uso de modelos empíricos não-lineares para prever a produção de celulasas utilizando *Aspergillus niger* e bagaço de cana de açúcar como substrato / Thais Caliman Catelan. - 2020. 84 f. : il.

Orientadora: Laura Marina Pinotti.

Coorientador: Vinícius Barroso Soares.

Dissertação (Mestrado em Energia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário Norte do Espírito Santo.

1. Modelagem matemática. 2. Estimação de parâmetros. 3. Otimização. 4. Fermentação submersa. 5. Biorreator. I. Pinotti, Laura Marina. II. Soares, Vinícius Barroso. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Universitário Norte do Espírito Santo. IV. Título.

CDU: 620.9

---

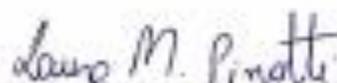
THAIS CALIMAN CATELAN

USO DE MODELOS EMPÍRICOS NÃO-LINEARES PARA PREDIZER A  
PRODUÇÃO DE CELULASES UTILIZANDO *Aspergillus niger* E  
BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR COMO SUBSTRATO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Energia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Energia.

Aprovada em 10 de março de 2020.

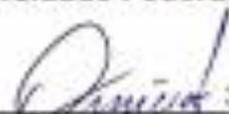
COMISSÃO EXAMINADORA



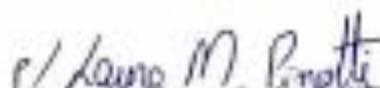
Prof. Dr. Laura Marina Pinotti  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientadora



Prof. Dr. Taisa Shimosakai de Lira  
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. Vinicius Barroso Soares  
Universidade Federal do Espírito Santo



Prof. Dr. Rosineide Gomes da Silva  
Cruz  
Universidade Federal de São Carlos

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço à Deus, por me conceder saúde e sabedoria para seguir sempre em frente. Obrigada por ser a minha força e o meu guia em todos os momentos.

Aos meus pais, Marcos e Ivânia, e aos meus irmãos, Caroline e Mario Marcos, pelo apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida. Por acreditarem em mim, me motivarem, entenderem minhas faltas e não medirem esforços para a concretização dos meus sonhos. Amo vocês.

À minha orientadora Laura Marina Pinotti e ao meu coorientador Vinícius Barroso Soares pela orientação prestada, por toda a paciência, incentivo, empenho e ensinamentos que dedicaram a mim.

Aos meus amigos e colegas de mestrado pelo apoio nos momentos mais difíceis. Em especial à Bárbara Zon Nascimento e à Larissa Thomaz pelo auxílio na elaboração deste trabalho, por sempre estarem ao meu lado me incentivando e me motivando a seguir em frente.

À UFES – Universidade Federal do Espírito Santo - pelo apoio institucional e a CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior– pelo suporte financeiro.

## RESUMO

Uma variedade de estudos está sendo desenvolvida visando a produção de combustíveis a partir de fontes renováveis com intuito de diversificar a matriz energética e minimizar os danos causados ao meio ambiente. Dentre eles, destaca-se o etanol de segunda geração (2G), o qual é produzido a partir de biomassa não alimentar ou lignocelulósica, tais como, bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja, farelo de trigo, madeira, bagaço de frutas, sabugo de milho, entre outros. Entretanto, na produção do etanol 2G são utilizadas enzimas de altos custos para converter a celulose em açúcares fermentáveis, tornando o processo industrialmente inviável. Uma alternativa para tornar o processo de produção das enzimas mais competitivo é utilizar resíduos agroindustriais como fonte de carbono para o microrganismo. Este trabalho propôs o uso de diferentes concentrações de bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono para produção de celulases a partir do *Aspergillus niger*, em fermentação submersa com biorreator de tanque agitado. E, posteriormente, utilizou-se modelos matemáticos empíricos para prever a produção de celulases, consumo de substrato e o crescimento celular. A taxa máxima de variação de atividade enzimática e do consumo de substrato foram modeladas com equações sigmóides, as quais apresentam como característica a forma de uma curva em "S". Na sequência, determinou-se a máxima produção de células e o máximo consumo de oxigênio no meio reacional, através da estimativa de extremos locais com uso de modelos empíricos conhecidos como funções gaussianas, as quais apresentam ponto de máximo (ou de mínimo). Para a atividade enzimática e consumo de substrato, o modelo MMF foi o que apresentou melhor ajuste. Já para o crescimento celular e consumo de oxigênio, o modelo *Extreme* apresentou melhores resultados.

Palavras chave: Modelagem matemática. Estimação de parâmetros. Otimização. Fermentação submersa. Biorreator.

## ABSTRACT

A variety of studies are being carried out with a view to producing fuels from renewable sources in order to diversify the energy matrix and minimize damage to the environment. Among them, second generation ethanol (2G) stands out, which is produced from non-food or lignocellulosic biomass, such as sugar cane bagasse, soybean meal, wheat bran, wood, bagasse fruit, corncob, among others. However, in the production of 2G ethanol high-cost enzymes are used to convert cellulose into fermentable sugars, making the process industrially unviable. An alternative to make the enzyme production process more competitive is to use agro-industrial waste as a carbon source for the microorganism. This work proposed the use of different concentrations of sugarcane bagasse as a carbon source for the production of cellulases from *Aspergillus niger*, in submerged fermentation with agitated tank bioreactor. And, later, empirical mathematical models were used to predict cellulose production, substrate consumption and cell growth. The maximum rate of variation of enzyme activity and substrate consumption were modeled with sigmoid equations, which feature the shape of an "S" curve. In the sequence, the maximum production of cells and the maximum consumption of oxygen in the reaction medium were determined, through the estimation of local extremes using empirical models known as Gaussian functions, which have a maximum (or minimum) point. For enzyme activity and substrate consumption, the MMF model was the one with the best fit. As for cell growth and oxygen consumption, the Extreme model showed better results.

Keywords: Mathematical modeling. Parameter estimation. Optimization Submerged fermentation. Bioreactor.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da parede de um material lignocelulósico. ....	19
Figura 2 – Estrutura da molécula de celulose. ....	20
Figura 3 - Ação das celulasas na molécula de celulose. ....	20
Figura 4 – Representação de uma função sigmoideal. ....	26
Figura 5 – Representação de uma curva em forma de sino. ....	31
Figura 6 - Esquema do preparo do bagaço da cana-de-açúcar. ....	37
Figura 7 - Resultados das análises de concentração de celulose (a), concentração de células (b), atividade enzimática (c) e concentração de oxigênio dissolvido (d) nas fermentações de 5, 10, 13, 15 e 20 g/L. ....	41
Figura 8 – Correlação linear entre atividade e substrato para as fermentações de 10, 13, 15 e 20 g/L. ....	47
Figura 9 - Ajuste não-linear para atividade em função do tempo no ensaio contendo 10 g/L de BC. ....	49
Figura 10 - Ajuste não-linear para atividade em função do tempo no ensaio contendo 13 g/L de BC. ....	49
Figura 11 - Ajuste não-linear para atividade em função do tempo no ensaio contendo 20 g/L de BC. ....	50
Figura 12 - Respostas do modelo MMF para atividade enzimática com parâmetros otimizados. ....	53
Figura 13 - Ajuste não-linear para concentração de celulose no ensaio contendo 10 g/L de BC. ....	54
Figura 14 - Ajuste não-linear para concentração de celulose no ensaio contendo 13 g/L de BC. ....	54
Figura 15 - Ajuste não-linear para concentração de celulose no ensaio contendo 20 g/L de BC. ....	55
Figura 16 - Respostas do modelo MMF para concentração de substrato com parâmetros otimizados. ....	58
Figura 17 - Ajuste não-linear para concentração de células no ensaio contendo 10 g/L de BC. ....	59
Figura 18 - Ajuste não-linear para concentração de células no ensaio contendo 13 g/L de BC. ....	59

Figura 19 - Ajuste não-linear para concentração de células no ensaio contendo 20 g/L de BC. ....	60
Figura 20 - Respostas do modelo <i>Extreme</i> para concentração de células o com parâmetros otimizados. ....	63
Figura 21 - Ajuste não-linear para concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo utilizando as equações <i>Extreme</i> , <i>GaussAmp</i> e <i>Logistpk</i> no ensaio contendo 10 g/L de BC. ....	63
Figura 22 - Ajuste não-linear para concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo utilizando as equações <i>Extreme</i> , <i>GaussAmp</i> e <i>Logistpk</i> no ensaio contendo 13 g/L de BC. ....	64
Figura 23 - Ajuste não-linear para concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo utilizando as equações <i>Extreme</i> , <i>GaussAmp</i> e <i>Logistpk</i> no ensaio contendo 20 g/L de BC. ....	64
Figura 24 - Respostas do modelo <i>Extreme</i> para oxigênio dissolvido com parâmetros otimizados. ....	67
Figura 25 - Variação da concentração de substrato (■), concentração de células (●) e atividade enzimática (◆) e o resultado do modelo (-) em função do tempo para o ensaio de 15 g/L.....	70
Figura 26 - Variação da concentração de oxigênio (-) e o resultado do modelo (-) em função do tempo para o ensaio de 15 g/L. ....	70
Figura 27 - Correlação linear entre células e oxigênio para as fermentações de 10, 13, 15 e 20 g/L. ....	84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Funções sigmoidais e suas características. ....	26
Tabela 2 - Funções polinomiais de baixa ordem e suas características.....	31
Tabela 3 - Condições experimentais para produção enzimática. ....	38
Tabela 4 - Matriz com os coeficientes de correlação para o ensaio de 10 g/L. ....	45
Tabela 5 - Matriz com os coeficientes de correlação para o ensaio de 13 g/L. ....	45
Tabela 6 - Matriz com os coeficientes de correlação para o ensaio de 15 g/L. ....	46
Tabela 7 - Matriz com os coeficientes de correlação para o ensaio de 20 g/L. ....	46
Tabela 8 - Parâmetros que caracterizam o modelo linear para predição da atividade enzimática em função da concentração de substrato adicionada ao meio reacional. ....	47
Tabela 9 - Resultado dos modelos não-lineares para atividade no ensaio contendo 10 g/L de BC. ....	50
Tabela 10 - Resultado dos modelos não-lineares para atividade no ensaio contendo 13 g/L de BC. ....	51
Tabela 11 - Resultado dos modelos não-lineares para atividade no ensaio contendo 20 g/L de BC. ....	52
Tabela 12 - Parâmetros estimados para atividade enzimática usando o modelo MMF. ....	52
Tabela 13 - Estimativa do ponto de inflexão para atividade enzimática. ....	53
Tabela 14 – Resultado dos modelos não-lineares para substrato no ensaio contendo 10 g/L de BC. ....	55
Tabela 15 – Resultado dos modelos não-lineares para substrato no ensaio contendo 13 g/L de BC. ....	56
Tabela 16 – Resultado dos modelos não-lineares para substrato no ensaio contendo 20 g/L de BC. ....	57
Tabela 17 - Parâmetros estimados para concentração de substrato usando o modelo MMF. ....	57
Tabela 18 - Estimativa do ponto de inflexão para concentração de substrato.....	58

Tabela 19 - Resultado dos modelos não-lineares para células no ensaio contendo 10 g/L de BC. ....	60
Tabela 20 – Resultado dos modelos não-lineares para células no ensaio contendo 13 g/L de BC. ....	61
Tabela 21 – Resultado dos modelos não-lineares para células no ensaio contendo 20 g/L de BC. ....	61
Tabela 22 - Parâmetros estimados para o modelo <i>Extreme</i> na predição da concentração de células.....	62
Tabela 23 - Estimativa do ponto de máximo para concentração de células. ....	62
Tabela 24 - Modelos não-lineares para oxigênio dissolvido no ensaio contendo 10 g/L de BC. ....	65
Tabela 25 - Modelos não-lineares para oxigênio dissolvido no ensaio contendo 13 g/L de BC. ....	65
Tabela 26 - Modelos não-lineares para oxigênio dissolvido no ensaio contendo 20 g/L de BC. ....	66
Tabela 27 - Parâmetros estimados para o modelo <i>Extreme</i> na predição do consumo de oxigênio.....	66
Tabela 28 - Estimativa do ponto de mínimo para concentração de oxigênio.....	66
Tabela 29 - Valores médios dos parâmetros a serem utilizados para predizer a atividade enzimática em ensaios contendo 15 g/L de BC. ....	68
Tabela 30 - Valores médios dos parâmetros a serem utilizados para predizer a concentração de celulose em ensaios contendo 15 g/L de BC. ....	68
Tabela 31 - Valores médios dos parâmetros a serem utilizados para predizer a concentração de células em ensaios contendo 15 g/L de BC. ....	68
Tabela 32 - Valores médios dos parâmetros a serem utilizados para predizer o consumo de oxigênio em ensaios contendo 13 g/L de BC.....	69
Tabela 33 - Desvio padrão residual (RSD) para as fermentações realizadas em comparação com o modelo encontrado. ....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E TERMOS

2G - Segunda geração

BC - Bagaço de cana-de-açúcar

FES - Fermentação em estado sólido

FS - Fermentação submersa

LHWB - *Liquid hot water-pretreated bagasse*

PDA - Potato Dextrose Agar

R<sup>2</sup> - Coeficiente de determinação

R<sup>2</sup> adj. - Coeficiente de determinação ajustado

RMSE - Raiz da soma do quadrado dos erros

S – Concentração de substrato (g/L)

SEB - *Steam explosion-pretreated sugarcane bagasse*

SEBw - *Exploded bagasse washed with warm water*

SQE - Soma do quadrado dos erros

SQT - Soma do quadrado dos erros total

t – tempo (h)

X – Concentração de microrganismo (g/L)

RSD - Desvio padrão residual

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
2.1	ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO .....	16
2.2	BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA: BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR .....	17
2.3	PRODUÇÃO DE CELULASES .....	20
2.4	MODELAGEM MATEMÁTICA.....	23
2.4.1	<b>Funções sigmoidais</b> .....	<b>25</b>
2.4.2	<b>Funções Gaussianas</b> .....	<b>30</b>
2.4.3	<b>Estimação de parâmetros por mínimos quadrados não-linear</b> .....	<b>33</b>
2.2.4	<b>Análise da qualidade dos modelos</b> .....	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>37</b>
3.1	PREPARO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	37
3.2	OBTENÇÃO E PROPAGAÇÃO DOS MICRORGANISMOS .....	37
3.3	OBTENÇÃO DO INÓCULO .....	37
3.4	PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA .....	38
3.5	ATIVIDADE ENZIMÁTICA (CMCase).....	38
3.6	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CELULOSE, MASSA SECA E CÉLULAS.....	39
3.7	MODELAGEM EMPÍRICA.....	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>41</b>
4.1	CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO, CÉLULAS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	41
4.2	ANÁLISE DA CORRELAÇÃO LINEAR .....	45
4.3	MODELOS SIGMOIDAIS .....	48
4.3.1	<b>Ajuste não-linear para atividade enzimática</b> .....	<b>48</b>
4.3.2	<b>Ajuste não-linear para concentração de celulose</b> .....	<b>54</b>
4.4	MODELOS GAUSSIANOS .....	58
4.4.1	<b>Ajuste não-linear para concentração de células</b> .....	<b>59</b>
4.4.2	<b>Ajuste não-linear para concentração de oxigênio dissolvido</b> .....	<b>63</b>
4.5	VALIDAÇÃO DO MODELO EMPÍRICO .....	67
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	<b>74</b>

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>75</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A maior parte do etanol produzido no mundo provém de compostos amiláceos ou sacarose (melaço ou caldo de cana), no entanto, estudos de novas tecnologias estão sendo desenvolvidos para fabricação de álcool empregando biomassa não alimentícia e visando a viabilidade da sua produção industrial. Esse produto obtido a partir de biomassa lignocelulósica é conhecido como etanol de segunda geração (2G) e vem sendo analisado como uma alternativa renovável em substituição aos combustíveis fósseis (SUKUMARAN *et al.*, 2009).

As fontes lignocelulósicas utilizadas são principalmente resíduos agroindustriais, como bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja, farelo de trigo, madeira, bagaço de frutas, sabugo de milho, entre outros (DELABONA *et al.*, 2013; JAMPALA *et al.*, 2017). No Brasil, entre os materiais lignocelulósicos que podem ser utilizados para produção de etanol e como fonte de carbono para produção de enzimas, destaca-se o bagaço de cana-de-açúcar, já que este está disponível em grandes quantidades nas usinas sucroalcooleiras (VASCONCELLOS *et al.*, 2015).

Esses materiais são constituídos principalmente de celulose, hemicelulose e lignina, sendo que a celulose é o componente majoritário e pode ser hidrolisada enzimaticamente em açúcares monoméricos fermentáveis. A hidrólise enzimática da celulose é realizada por celulasas que são altamente específicas (ADAV *et al.*, 2012; MAKI; LEUNG; QIN, 2010).

Para degradar a celulose, as celulasas atuam em sinergismo durante o processo. O mecanismo completo de degradação envolve as ações de três principais classes de celulasas: endoglucanases, exoglucanases, e  $\beta$ -glucosidases (CUNHA *et al.*, 2012; SUN; CHENG, 2002). Um dos desafios existentes para o uso dessas biomassas é especialmente o emprego de celulasas comerciais de altos custos (HANSEN *et al.*, 2015).

As celulasas são produzidas por muitos microrganismos, como fungos, bactérias e actinomicetos, entretanto, os fungos apresentam maiores rendimentos para a produção dessas enzimas. Entre os fungos, os gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* são os mais empregados para esses processos por possuírem elevada atividade celular (DHILLON *et al.*, 2011).

Entre os métodos de cultivo aplicados para produzir enzimas, os sistemas de fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS) têm sido amplamente descritos para obtenção de celulases. Entretanto, a FS é a mais usada industrialmente, pois possui maior facilidade de monitoramento e controle das variáveis do processo, tais como temperatura, pH, aeração e agitação (CUNHA *et al.*, 2012; FLORENCIO; BADINO; FARINAS, 2016).

As condições dos meios de cultivo nos processos fermentativos como temperatura, pH, atividade de água, nível de oxigênio e concentração de nutrientes afetam diretamente o crescimento celular e a formação de produtos. As fontes de suplementação do meio com nutrientes minerais, tais como, ureia, sulfato de amônio entre outros, e elementos traços como Fe, Zn, Mn e Co, são necessários para o efetivo crescimento do microrganismo e produção enzimática (SALOMÃO, 2017).

Diversos indutores enzimáticos vêm sendo estudados e utilizados para melhorar a síntese de enzimas. Dentre eles, destaca-se o uso dos próprios substratos como indutores, estes podem ser quimicamente definidos (celulose cristalina, carboximetilcelulose (CMC), celobiose, etc) ou meios complexos como resíduos agroindustriais (bagaço e palha de cana, palha e farelo de trigo, etc.) (LORENCI, 2016; SALOMÃO, 2017).

As matérias-primas lignocelulósicas podem ser utilizadas como substratos alternativos para reduzir os custos da produção enzimática, uma vez que esses materiais podem ser utilizados como fonte de nutrientes, principalmente de carbono, para os microrganismos nos processos fermentativos de diferentes tipos. O uso dessas biomassas juntamente com substâncias compostas por nitrogênio, minerais e vitaminas é eficaz para produção de elevada atividade enzimática, visto que esses elementos apresentam condições favoráveis para o crescimento celular (AGUIAR; MENEZES, 2000; SILVA; FERREIRA, 2017).

Entretanto, o uso desses resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono pode ocasionar alguns empecilhos na medida do crescimento do microrganismo durante a fermentação, pois a quantificação das células em meios com a presença de sólidos é complexa devido à dificuldade em separar microrganismos do substrato.

Normalmente utiliza-se uma metodologia de quantificação indireta da biomassa celular (CUNHA *et al.*, 2012).

Estes métodos indiretos, no entanto, trazem uma dificuldade adicional para a modelagem do sistema devido às incertezas associadas ao processo de medição experimental. O uso de modelos matemáticos é importante para prever o comportamento das variáveis de interesse dos processos fermentativos, para a otimização e para o controle das operações de produção, pois permitem monitorar as condições do processo e elaborar estratégias para obter maiores rendimentos.

A modelagem na bioengenharia é complicada devido à complexidade dos sistemas vivos, por isso, apesar do interesse na produção de enzimas, existem poucos estudos relacionados aos modelos matemáticos. Vale ressaltar, que grande parte das pesquisas baseia-se apenas na produção de enzimas de distintas cepas de fungos em diferentes condições experimentais sem dar ênfase na modelagem. O que impulsionou a realização desta pesquisa foi encontrar poucos trabalhos de modelagem na área da bioengenharia que avaliassem as condições dos processos fermentativos, tais como, concentração de substrato, de células e de formação de produtos, em meios contendo substratos suspensos.

Este trabalho propôs utilizar modelos matemáticos empíricos para prever a produção de celulases, consumo de substrato e o crescimento celular, utilizando *Aspergillus niger* em biorreator de tanque agitado, em uma fermentação submersa com diferentes concentrações de bagaço de cana-de-açúcar.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

O aumento da emissão de gases do efeito estufa e a diminuição das reservas de petróleo ampliam as discussões sobre a matriz energética e incentivam o uso de fontes alternativas de energia (NAIK *et al.*, 2010; SIMS *et al.*, 2010). Nesse contexto, o etanol de segunda geração (2G), produzido a partir de biomassa não alimentar tal como, palha de cereais, bagaço de cana-de-açúcar, resíduos florestais *etc.*, torna-se uma interessante alternativa (SIMS *et al.*, 2010).

O uso deste tipo de matéria-prima, além de não competir com as culturas alimentares, reduz a quantidade de resíduos despejados no ambiente e aumenta a eficiência da linha de produção (ALVIRA *et al.*, 2010). Em tese, como é possível extrair mais etanol do bagaço de cana-de-açúcar, a usina pode produzir mais sem que isso acarrete grandes investimentos nas linhas de produção e, conseqüentemente, o preço do etanol tende a ficar mais barato nos postos de combustível e para o consumidor final.

A produção de bioetanol 2G compreende quatro etapas: pré-tratamento, para tornar a celulose acessível; hidrólise com a adição de enzimas ou um catalisador ácido para liberar os açúcares monoméricos; fermentação para converter açúcares em etanol; e destilação para recuperação de produto (RABELO *et al.*, 2011).

Na produção do etanol 2G, as biomassas obtidas diretamente da natureza são inadequadas para a bioconversão, devido à presença de compostos complexos, como a lignina, sendo necessário realizar procedimentos eficazes e economicamente viáveis para removê-los e facilitar o ataque enzimático ao substrato (MENON; RAO, 2012). O pré-tratamento tem como objetivo remover a lignina e fracionar o material para aumentar a velocidade e o rendimento da hidrólise. Este método diminui a interação entre os principais componentes da parede celular e torna-os suscetíveis tanto à sacarificação quanto à fermentação (KARP *et al.*, 2013).

As melhores condições de pré-tratamento são definidas como aquelas em que a recuperação máxima de açúcares hemicelulósicos solúveis em água é obtida,

juntamente com a produção do melhor substrato possível para hidrólise enzimática e fermentação (GÁMEZ et al., 2006). Estes tratamentos podem ser físicos, químicos ou biológicos.

Após a etapa de pré-tratamento, ocorre a hidrólise da celulose a partir da clivagem das moléculas pela adição de água. Esta reação é catalisada por ácido diluído, ácido concentrado ou enzimas (celulases). A hidrólise enzimática apresenta muitas vantagens, pois é realizada em condições amenas (pH= 4,8 e temperatura entre 318-323 K), permitem altos rendimentos e apresentam baixos custos de manutenção em comparação com a hidrólise ácida (BALAT; BALAT; ÖZ, 2008).

Um dos empecilhos da hidrólise enzimática é o emprego de celulases comerciais de altos custos para converter celulose em açúcares fermentáveis (HANSEN et al., 2015). Por isso, estão sendo desenvolvidos estudos para minimizar os custos de produção de enzimas microbianas, sendo que os fungos apresentam maiores rendimentos neste processo (DHILLON et al., 2011). Como alternativa para diminuição dos preços, destaca-se o uso dos resíduos agroindustriais como fonte de carbono nos processos fermentativos para produção de celulases (VASCONCELLOS et al., 2015).

Na fermentação, o microrganismo converte o caldo rico em glicose proveniente da hidrólise em bioetanol (álcool 2G). A recuperação do produto a partir do caldo ocorre através da destilação ou destilação combinada com a adsorção (MOSIER et al., 2005).

## 2.2 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA: BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR

A biomassa lignocelulósica apresenta grande importância para produção de etanol, pois pode ser encontrada abundantemente na Terra. Esse material compreende cerca de 50% da biomassa mundial e sua produção anual foi estimada em 10 a 50 bilhões de toneladas. A seleção dessa matéria-prima depende de cada país, visando utilizar os resíduos produzidos em maior quantidade, em especial aqueles que não possuem uso alimentício (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

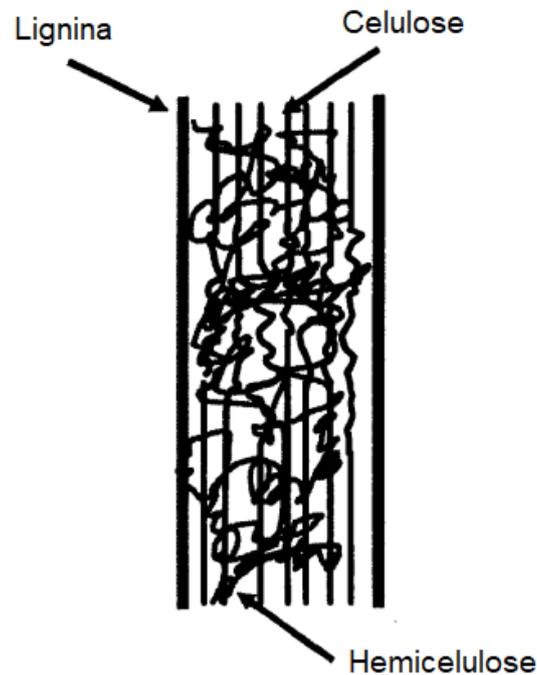
No Brasil, a plantação da cana-de-açúcar vem se expandindo devido à valorização do etanol e a disponibilidade de recursos naturais, tecnologias, clima e solo para desta cultura, favorecendo a diminuição dos custos de produção do etanol quando comparado com a utilização de outras matérias-primas (SILVA; ALMEIDA GARCIA; SILVA, 2010).

Cada tonelada de cana produz aproximadamente 250 quilos de bagaço, o qual é a biomassa celulósica mais utilizada no Brasil. Este material é um resíduo fibroso de caules de cana que sobra após o esmagamento e a extração do caldo da cana-de-açúcar e pode ser quase totalmente utilizado pelas próprias fábricas de açúcar como combustível para as caldeiras (PANDEY et al., 2000; SILVA; ALMEIDA GARCIA; SILVA, 2010).

Entretanto, os processos industriais estão sendo otimizados para minimizar a demanda de energia nestas usinas, o que irá resultar em um aumento no excesso de bagaço. E conseqüentemente, este pode ser convertido a bioetanol sem ocasionar a um aumento na plantação da matéria-prima (DIAS et al., 2012).

Os materiais lignocelulósicos apresentam em sua constituição celulose (40 - 50%), hemicelulose (25 - 30%), lignina (15 - 20%) e outros componentes extraíveis. A celulose consiste de cadeias de glicose unidas por ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas. A hemicelulose é formada por polímeros compostos por diferentes unidades de açúcares, como pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glicose e galactose) e ácidos urônicos. Liga-se a microfibrilas de celulose e formam uma rede que fornece o esqueleto estrutural para a parede celular da planta. A lignina é um heteropolímero estruturado em unidades de fenilpropano que são mantidas juntas por diferentes tipos de ligações formando uma macromolécula amorfa que confere maior resistência à planta (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; MENON; RAO, 2012; MOSIER et al., 2005). O esquema da parede de um material lignocelulósico está apresentado na Figura 1.

Figura 1 – Esquema da parede de um material lignocelulósico.

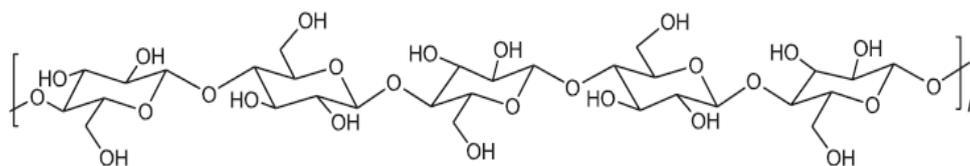


Fonte: Adaptado de Mosier *et al.*, 2005.

Devido à presença de compostos glicosídicos em suas estruturas, a celulose e a hemicelulose são fontes potenciais de açúcares fermentáveis e podem ser convertidas em glicose por hidrólise enzimática ou química (MAURYA; SINGLA; NEGI, 2015). Se levarmos em consideração a produção mundial de 50 bilhões de toneladas de biomassa lignocelulósica produzidas por ano, e um percentual de 80% de compostos glicosídicos (celulose e hemicelulose) presentes nesse material, isso significa que existe 40 bilhões de toneladas de açúcares fermentáveis que podem ser convertidas em glicose por ano.

A estrutura típica da molécula de celulose está apresentada na Figura 2. Estas moléculas são ligadas por ponte de hidrogênio e formam microfibrilas, tornando-a de natureza cristalina e resistente à degradação, sendo necessária uma grande variedade de enzimas de diferentes especificidades para hidrolisá-la (VAN DYK; PLETSCHE, 2012).

Figura 2 – Estrutura da molécula de celulose.

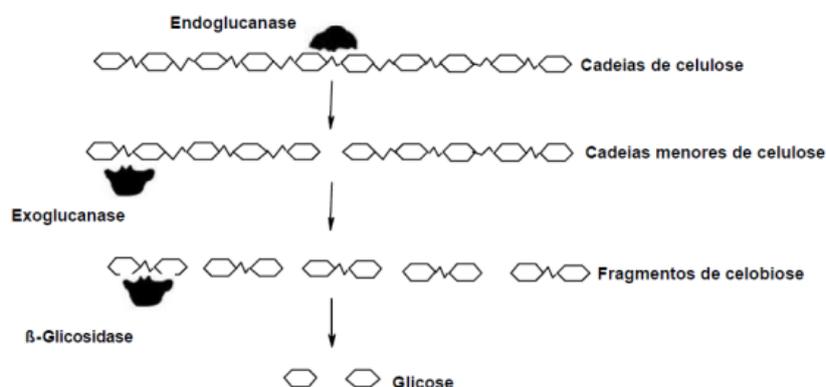


Fonte: Santos *et al.*, 2012.

### 2.3 PRODUÇÃO DE CELULASES

Para degradar a celulose em glicose, microrganismos, especialmente fungos, secretam enzimas hidrolíticas, denominadas celulases, as quais envolvem ações sinérgicas da endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase ou celobiohidrolase (EC 3.2.1.91) e  $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.21). As endoglucanases hidrolisam ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas intramoleculares acessíveis de celulose aleatoriamente para produzir novas extremidades de cadeia. As exoglucanases clivam cadeias nas extremidades para liberar celobiose solúvel ou glicose e as  $\beta$ -glicosidases hidrolisam a celobiose, diminuindo a inibição da endoglucanase e exoglucanase por este componente (FARHAN *et al.*, 2019; ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006). A ação dessas três enzimas (endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase) está representada na Figura 3.

Figura 3 - Ação das celulases na molécula de celulose.



Fonte: Adaptado de Wright *et al.*, 1988.

As enzimas celulolíticas são produzidas por uma grande variedade de bactérias e fungos (leveduras). Entretanto, poucos microrganismos produzem níveis elevados de celulase capaz de solubilizar a celulose cristalina. Os fungos oferecem maiores quantidades dessas enzimas para o meio, favorecendo a extração e purificação das mesmas. Isto explica, em parte, o uso comercial mais frequente dos gêneros *Trichoderma* e *Aspergillus* (DHILLON *et al.*, 2011; KUHAD *et al.*, 2016).

O uso da fermentação para produção de enzimas celulolíticas a partir de resíduos agroindustriais não alimentares é uma forma de minimizar custos, já que estes materiais podem ser utilizados como fonte de carbono e energia (substrato) para os microrganismos (CUNHA *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2018). A fermentação pode ser submersa (FS), em estado sólido (FES) ou sequencial (CUNHA *et al.*, 2012; FARINAS *et al.*, 2011; FLORENCIO; BADINO; FARINAS, 2016). Nos processos industriais o uso da fermentação submersa em meio líquido é mais comum devido às facilidades de controle de pH, aeração e temperatura. Na FES existem vários gradientes de umidade e temperatura que podem afetar negativamente a produção de metabólitos (FARINAS *et al.*, 2011).

Muitos estudos vêm sendo realizados visando encontrar meios alternativos para produção enzimática a custos reduzidos. Diversas pesquisas têm mostrado resultados significativos no cultivo do fungo *Aspergillus niger* em diferentes materiais lignocelulósicos.

Aguiar e Menezes (2000) avaliaram a produção de celulase e xilanase de *Aspergillus niger* IZ9 tendo como fonte de carbono o bagaço de cana-de-açúcar quimicamente tratado. A concentração de bagaço para produção enzimática foi de 10 g/L. O bagaço sem tratamento apresentou níveis de produção enzimática para CMC<sub>Case</sub> (200 UI/L) semelhantes aos dos bagaços tratados com hidróxido de sódio (250 UI/L) e solução de hidróxido de sódio, ácido fosfórico e vapor (225 UI/L).

Garcia-Kirchner, Segura-Granados e Rodriguez-Pascual (2005) pesquisaram o cultivo de *Aspergillus niger* para produção de  $\beta$ -glicosidase em fermentação submersa (FS), empregando meio de cultura com calda de xarope de milho e bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono, ambos à 20 g/L. A FS foi realizada à temperatura de 29 °C, pH de 5,5 e tempo de fermentação de 240 horas.

Foram analisadas três velocidades de agitação (100, 180, 250 rpm) e três taxas de aeração (0,2, 0,5 e 1,0 vvm). A máxima produção enzimática foi de 7200 UI/L obtido em três dias de fermentação, 180 rpm e 0,2 vvm. O microrganismo utilizado foi considerado com bom potencial de atingir uma alta produção enzimática.

Ahamed e Vermette (2008) pesquisaram a co-cultura de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* para melhorar a produção de celulases em um biorreator. Os resultados mostraram que a cultura mista obteve um aumento significativo na atividade enzimática CMCase (4700 UI/L), quando comparada com a monocultura de *Aspergillus niger* (2900 UI/L). Os autores não comparam os resultados entre *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger*.

Mrudula e Murugammal (2011) investigaram o uso do *Aspergillus niger* para produzir celulases em fermentação submersa em meio líquido (FS) e sólido (FES). As atividades CMCase obtidas em FS foram 310, 510, 800, 720, 180 UI/L utilizando como fonte de carbono a casca de arroz, farelo de arroz, fibra de coco, farelo de trigo e pó de serra, respectivamente. A concentração de substrato na FS para produção enzimática foi de 30 g/L.

Kumar, Sharma e Sarkar (2011) estudaram as melhores condições de fermentação para a produção de pectinase e celulase por *Aspergillus niger* NCIM 548 em fermentação submersa em meio líquido e sólido. Utilizaram como fonte de carbono uma mistura de farelo de trigo, farelo de milho e casca de Kinnow na proporção 2:1:2. De acordo com os resultados obtidos, as condições ótimas para produção de pectinase (1640 UI/L na FS e 179,83 UI/g na FES) foram 126 horas de fermentação, pH 4,6, concentração de fonte de carbono 65 g/L. As condições ótimas para produção de celulase (360 UI/L na FS e 10,81 UI/g na FES) foram 156 horas de fermentação, pH 4,8 e teor de umidade de 65% em FES.

Cunha *et al.* (2012) testaram uma metodologia capaz de quantificar indiretamente a biomassa durante o processo de fermentação, já que a biomassa sólida é difícil de ser medida. O cultivo de *Aspergillus niger* com bagaço de cana-de-açúcar foi realizado por meio de uma fermentação sequencial, com tempo de 24 horas em FES seguido por 48 horas em FS. A concentração de bagaço para produção

enzimática foi de 1% (m/v). A atividade de CMCase foi de 1052 UI/L, superior ao da FS convencional que foi de 824 UI/L.

Vasconcellos *et al.* (2015) cultivaram *Aspergillus niger* usando como fonte de carbono o bagaço de cana-de-açúcar nos três processos de fermentação. O bagaço foi submetido a três diferentes pré-tratamentos: explosão a vapor (*Steam explosion-pretreated sugarcane bagasse* - SEB), explosão a vapor lavado com água morna (*Exploded bagasse washed with warm water* - SEBw) e tratamento com água quente (*Liquid hot water-pretreated bagasse* - LHWB). A concentração de bagaço na FS foi de 1% (m/v). Os melhores resultados obtidos para as atividades das CMCase e xilanase foram 3039,4 UI/L e 23553,1 UI/L em FES e SEBw, respectivamente. Para a  $\beta$ -glicosidase o resultado obtido foi de 7438,9 UI/L usando FS e SEB.

Florencio, Badino e Farinas (2016) estudaram o melhor método de cultivo de *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei* com concentração de bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor de 1% (m/v), visando obter a melhor produção de coquetéis enzimáticos. As atividades encontradas para o *Aspergillus niger* em meio sólido foram superiores às de *Trichoderma reesei* em todos os meios de cultivos avaliados (líquido, sólido e sequencial). As atividades CMCase encontradas para o *Aspergillus niger* em FES, FS e combinada foram 2300, 400 e 900 UI/L, respectivamente.

## 2.4 MODELAGEM MATEMÁTICA

Um problema fundamental em qualquer trabalho científico é o de correlacionar dados, construir modelos. A modelagem matemática tem como principal objetivo prever o comportamento dinâmico e estacionário do processo, possibilitando a determinação de melhores condições operacionais do sistema, auxiliando no projeto e ajuste de algoritmos de controle, no qual o modelo matemático formulado passa a ser parte integrante do mesmo (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

De acordo com Thilakavathi; Basak e Panda (2007), o tratamento matemático na bioengenharia não é trivial devido à complexidade dos sistemas vivos. Ainda assim, a combinação do trabalho experimental com modelagem matemática fornece interpretações significativas que permitem analisar novos aspectos da fisiologia dos microrganismos.

A construção do modelo envolve a definição de, ao menos, duas entidades básicas distintas: i) a estrutura do modelo através da qual as diversas variáveis do problema estão relacionadas; ii) os parâmetros que tornam possível a previsão quantitativa das relações existentes entre as várias variáveis do problema, através da estrutura do modelo (SCHWAAB e PINTO, 2007).

A estrutura do modelo pode ser gerada de forma empírica ou fenomenológica. A primeira abordagem é obtida a partir de correlações matemáticas dos dados experimentais, enquanto a segunda abordagem é obtida via balanços de massa, energia, *momentum*, equações constitutivas etc. Os modelos empíricos demandam menos tempo para sua formulação, são menos onerosos e sua qualidade depende fundamentalmente da qualidade dos dados experimentais. Por outro lado, os modelos fenomenológicos permitem extrapolações muito mais confiáveis que aquelas obtidas com modelos empíricos.

Na literatura científica alguns trabalhos fazem uso da abordagem empírica e/ou fenomenológica na tentativa de prever o comportamento da atividade enzimática no cultivo dos fungos em diferentes materiais lignocelulósicos.

Shahriarinour *et al.* (2011) investigaram o efeito de distintas concentrações de oxigênio dissolvido no crescimento celular e na produção de FPase, CMCase e  $\beta$ -glicosidase pelo fungo *Aspergillus terreus* empregando resíduo da produção de óleo de palma como fonte de carbono. Os modelos empíricos foram baseados nas equações logísticas.

Gómez Sánchez, Martínez-Trujillo e Aguilar Osorio (2012) avaliaram o efeito do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio e a cinética para produção de pectinases em frascos agitados e biorreator, utilizando o fungo *Aspergillus flavipes* FP-500 e a pectina como fonte de carbono. A taxa de crescimento do microrganismo foi elaborada pelo modelo empírico logístico, enquanto a taxa de consumo de substrato e a produção de pectinase foram desenvolvidas pelo modelo empírico de Leudeking-Piret.

Li, Tang e Xu (2015) estudaram o uso de diferentes subprodutos agrícolas (palha de arroz, suco de farelo de trigo e resíduo de soja) como fonte de carbono para o microrganismo *Rhizopus stolonifer* TP-02. Foram utilizados modelos empíricos

logísticos e modelos fenomenológicos da cinética de Luedeking-Piret para analisar o crescimento de biomassa, a produção de celulase (CMCase, avicelase e salicinase) e o consumo de substrato.

Modelos fenomenológicos, embora não abordados neste trabalho, podem ser vistos em Doran (1995), Gelain, Geraldo e Carvalho (2015), Gómez Sánchez, Martínez-Trujillo e Aguilar Osorio (2012), Li, Tang e Xu (2015), Schmidell et al. (2001), Shahriarinnour et al., (2011), entre outros. Esses modelos mostram que houve um aprimoramento das equações que descrevem as variáveis de interesse dos processos fermentativos com o aparecimento de novas pesquisas.

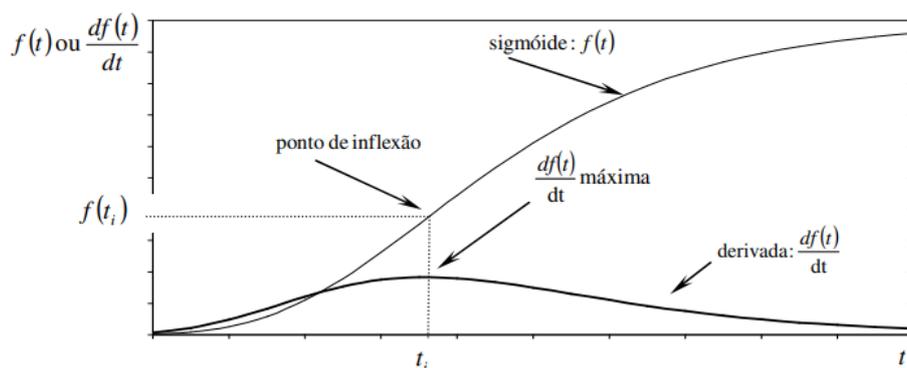
Neste trabalho utilizou-se a abordagem empírica para descrever o processo fermentativo para produção de celulases por *A. niger*. Neste contexto, foram usadas funções matemáticas, sigmoidais e gaussianas, que descrevessem a atividade enzimática, concentração de células, concentração de substrato e concentração de oxigênio nas fermentações estudadas.

#### **2.4.1 Funções sigmoidais**

Os modelos empíricos na forma sigmoidal foram encontrados com maior frequência nesta revisão bibliográfica para descrever o consumo de substrato e a atividade enzimática. Em parte, isto pode ser explicado pelo comportamento da curva em forma de “S”, característica típica dessas variáveis de interesse.

De acordo com Florentino, Biscaro e Passos (2010), a função sigmoidal é crescente em todo intervalo de variação do tempo, não possui pontos de máximos e mínimos relativos, mas possui ponto de inflexão que indica a taxa máxima de variação da função. A Figura 4 apresenta uma típica curva sigmoidal com suas principais características. É possível verificar que o ponto de inflexão da função sigmoide  $f(t)$  coincide com o ponto de máximo da derivada primeira desta função.

Figura 4 – Representação de uma função sigmoideal.



Fonte: Florentino, Biscaro e Passos (2010).

Uma curva com essa característica inicia em algum ponto fixo, com a razão de crescimento aumentando, ou diminuindo, monotonicamente até atingir o ponto de inflexão e, em seguida, essa razão decai, ou aumenta, até aproximar, assintoticamente de algum valor final (UEDA, 2003).

Muitos modelos matemáticos apresentam essas características e são bastante utilizados na análise de dados de curvas de crescimento. A função sigmóide é de amplo uso em campos como o da economia, computação, medicina, biologia, agronomia e engenharia (FLORENTINO; BISCARO; PASSOS, 2010; LUCENA et al., 2017; SEBER; WILD, 2003; SILVEIRA et al., 2018; UEDA, 2003).

Na biologia, estuda-se a descrição do crescimento de animais e plantas na tentativa de compreender seus mecanismos essenciais. Na química, interessa-se na formulação do produto de uma reação química ao longo do tempo. Na agricultura, investiga-se como a produção cresce, o quão rápido ela cresce, e como esses fatores respondem a condições ou tratamentos ambientais. Na medicina, pesquisa-se o crescimento infantil, o crescimento de tumores e os efeitos de tratamentos sobre tais crescimentos. Cientistas sociais têm interesse em crescimento da população, no fornecimento de alimentos e na demanda de energia (SEBER; WILD, 2003).

De acordo com Florentino, Biscaro e Passos (2010) os principais modelos utilizados para descrever curvas sigmoideas são Logística, Gompertz, Richards, MMF, Weibull e Boltzmann. A Tabela 1 apresenta alguns exemplos de funções sigmoideas e suas principais características.

Tabela 1 - Funções sigmoidais e suas características.

Equação	Nome	Função	Restrições	$f'(t)$	Coordenadas do ponto de inflexão
(1)	Logística	$\frac{\alpha}{1 + \beta e^{-\gamma t}}$	$\alpha > 0, \beta > 1$ e $\gamma > 0$	$\frac{\alpha \beta \gamma e^{-\gamma t}}{(1 + \beta e^{-\gamma t})^2}$	$t = \frac{1}{\gamma} \ln \beta, y = \frac{\alpha}{2}$
(2)	Gompertz	$\alpha e^{-\beta e^{-\gamma t}}$	$\alpha > 0, \beta > 1$ e $\gamma > 0$	$\alpha \beta \gamma e^{-\beta e^{-\gamma t}} e^{-\gamma t}$	$t = \frac{1}{\gamma} \ln \beta, y = \alpha e^{-1}$
(3)	Richards	$\frac{\alpha}{(1 + \beta e^{-\gamma t})^{\frac{1}{\delta}}}$	$\alpha > 0, \beta > \alpha, \gamma > 0$ e $\delta > 0$	$\frac{\alpha \beta \gamma e^{-\gamma t}}{\delta (\beta e^{-\gamma t} + 1)^{\frac{1}{\delta} + 1}}$	$t = \frac{1}{\gamma} \ln \frac{\beta}{\delta}, y = \frac{\alpha}{(1 + \delta)^{\frac{1}{\delta}}}$
(4)	MMF	$\frac{\beta \gamma + \alpha t^{\delta}}{\gamma + t^{\delta}}$	$0 < \beta < \alpha, \gamma > 0$ e $\delta > 1$	$\frac{\delta \alpha t^{\delta-1} L - N \delta t^{\delta-1}}{L^2}$ $N = \beta \gamma + \alpha t^{\delta}$ $L = \gamma + t^{\delta}$	$t = \left(\frac{\gamma(\delta-1)}{\delta+1}\right)^{\frac{1}{\delta}}, y = \frac{\alpha(\delta-1) + \beta(\delta+1)}{2\delta}$
(5)	Weibull	$\alpha - (\alpha - \beta)e^{-\gamma t^{\delta}}$	$0 < \beta < \alpha, \gamma > 0$ e $\delta > 1$	$\gamma \delta (\alpha - \beta) e^{-\gamma t^{\delta}} t^{\delta-1}$	$t = \left(\frac{\delta-1}{\gamma \delta}\right)^{\frac{1}{\delta}}, y = \alpha - (\alpha - \beta) e^{(-\frac{\delta-1}{\delta})}$
(6)	Boltzmann	$\frac{\alpha 1 - \alpha 2}{1 + e^{\frac{t-\beta}{\gamma}}} + \alpha 2$	$\alpha 2 > 0, \beta > 0, \gamma > 0, \alpha 1 - \alpha 2 < 0$ e $\alpha 2 > \left(-\frac{\delta}{1 + e^{\frac{t-\beta}{\gamma}}}\right)$	$\frac{-(\alpha 1 - \alpha 2) e^{\frac{t-\beta}{\gamma}}}{\gamma (1 + e^{\frac{t-\beta}{\gamma}})^2}$	$t = \beta, y = \frac{(\alpha 1 - \alpha 2)}{2} + \alpha 2$

Fonte: Adaptado de Florentino, Biscaro e Passos (2010).

Nas equações da Tabela 1, com exceção da Equação 6, o parâmetro  $\alpha$  é uma estimativa do valor assintótico ou do valor limite considerando que o tempo seria infinito ( $t \rightarrow \infty$ ). Tem-se através de  $\alpha$  uma estimativa do valor máximo ou mínimo da segunda assíntota da curva.  $\beta$  não é um parâmetro, e sim uma constante de integração, que não apresenta interpretação física, todavia, tem a função de modelar a curva sigmoidal. Há variações significativas em torno do valor de  $\beta$  nos diferentes modelos sigmoides utilizados (BOIN; NARDON; LEME, 2000; FITZHUGH, 1976; SILVA, 2015).

Outra constante de que compõe os modelos é a taxa de maturidade “ $\gamma$ ”, esta é uma função entre a máxima taxa de crescimento e o valor final atingido pela curva. Quanto maior esse valor, mais precoce será o crescimento, pois atingirá o valor limite de crescimento máximo ou mínimo em menor tempo. E  $\delta$  é o parâmetro de inflexão que determina a posição da inflexão da curva (BOIN; NARDON; LEME, 2000; SILVA, 2015).

Já na Equação de Boltzmann (6),  $\alpha_1$  é a primeira assíntota da curva sigmóide,  $\alpha_2$  é a segunda assíntota da curva;  $\beta$  é o ponto de inflexão e  $\gamma$  é a inclinação da curva no ponto de inflexão (SILVEIRA et al., 2018).

#### 2.4.1.1 Modelo Logístico

Para Longhi (2012) o modelo Logístico tem como principal característica a simetria em torno do ponto de inflexão, o que pode prejudicar a eficiência de ajuste deste modelo aos dados experimentais. De acordo com Ueda (2003) este modelo foi inicialmente utilizado para descrever o crescimento microbiano e posteriormente foi utilizado para descrever análises de dados de curvas de crescimento para o estudo de populações humanas, e atualmente, é usado na modelagem do crescimento de vegetais e animais. Os parâmetros deste modelo possuem boas propriedades estatísticas, pois, em geral, os modelos apresentam medidas de curvatura não significativas, mesmo em casos onde a amostra não é muito grande.

#### 2.4.1.2 Modelo Gompertz

Segundo Ueda (2003) o modelo de Gompertz é frequentemente usado na análise de curvas de crescimento de populações de animais e de vegetais. Segundo Longhi (2012) o modelo de Gompertz tem sido usado por muitos autores na modelagem preditiva do crescimento microbiano. Este modelo não é simétrico, o que melhora a estimativa dos seus parâmetros.

#### 2.4.1.3 Modelo de Richards

O modelo de Richards é uma extensão do modelo de crescimento Von Bertalanffy proposto em 1951, utilizado no estudo de relações alométricas em organismos, de dinâmica de populações de peixes, crescimento de produção agrícola, etc. Em comparação aos outros modelos descritos para curvas sigmóides, o de Richards é o que exhibe curvatura intrínseca mais significativa, sendo, portanto, o seu comportamento mais distante do linear (UEDA, 2003).

#### 2.4.1.4 Modelo Morgan – Mercer – Flodin (MMF)

A curva MMF foi desenvolvida como uma alternativa aos modelos Michaelis-Menten e Hill para descrever a resposta/crescimento nutricional de organismos confrontados com uma fonte limitante de nutrientes. Sua aplicação mostrou ser melhor do que os outros modelos, uma vez que permite uma interceptação vertical diferente de zero e padrões de resposta hiperbólica e sigmóidal dentro de sua estrutura geral (PIEGORSCH; BAILER, 2005).

#### 2.4.1.5 Modelo Weibull

O modelo Weibull recebe este nome por ter originado da distribuição de Weibull, que é uma das distribuições mais utilizadas em análise de sobrevivência e confiabilidade. Este modelo é uma boa alternativa para os modelos logístico e de Gompertz, principalmente quando estes exibem comportamento distante do linear. Dentre os modelos de crescimento sigmóidal com quatro parâmetros, experiências práticas têm mostrado que o modelo Weibull é o modelo que possui o comportamento mais próximo do comportamento linear (UEDA, 2003).

#### 2.4.1.6 Modelo Boltzmann

O modelo matemático sigmoidal proposto Boltzmann, em 1879, baseava-se na equação logística sigmoidal. Essa equação tem sido amplamente utilizada em pesquisas de crescimento populacional, biologia, física, química e medicina. Esse modelo é frequentemente usado para descrever as transições físicas e químicas que ocorrem em diversas áreas, sendo que essas transições são observadas a partir do ponto de inflexão existente na equação de Boltzmann (RESÉNDIZ-MUÑOZ et al., 2017; ZHOU et al., 2014).

#### 2.4.2 Funções Gaussianas

Embora as funções sigmoides possam ser utilizadas para descrever a variação da atividade enzimática e do consumo de substrato, essas não são capazes de prever máxima produção de células e o máximo consumo de oxigênio em ambientes fermentáveis. Essas funções devem ser crescentes em um intervalo de variação do tempo e decrescentes num outro intervalo. Portanto, este tipo de função possui pontos extremos (máximos e mínimos relativos).

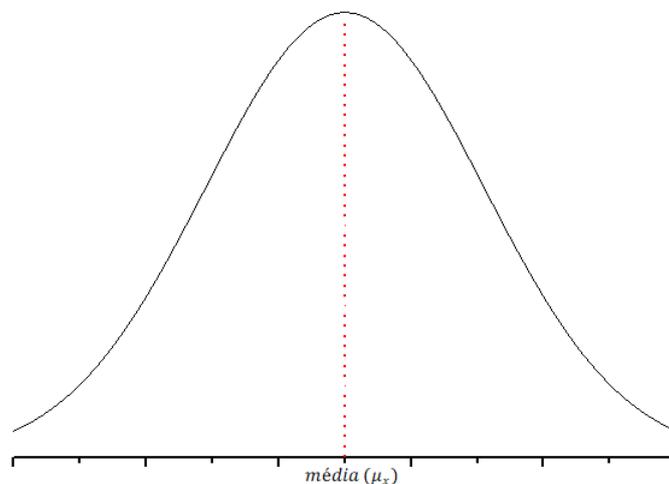
A curva de distribuição Gaussiana, apresentada na Figura 5, é uma típica função de pico, que apresenta como característica marcante a simetria em torno do ponto médio na coordenada  $x$  e diminuição das frequências quando nos afastamos da média. Esse tipo de comportamento é comum, por exemplo, nas mensurações da linha de produção até em áreas distintas como economia e biologia (SAMOHYL, 2009; SCHWAAB; PINTO, 2007).

Embora existam outras características relevantes para uma definição matematicamente rigorosa dessa distribuição, a simetria e as caudas finas são as mais importantes nas aplicações fabris cotidianas. Essa distribuição é representada pela Equação (7) (SAMOHYL, 2009).

$$Y_i = -\frac{1}{\sigma_x \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x_i - \mu_x)^2}{2\sigma_x^2}} \quad (7)$$

Em que  $\mu_x$  é a média e  $\sigma_x$  é o desvio padrão.

Figura 5 – Representação de uma curva em forma de sino.



Fonte: O autor.

Na maioria dos casos, os dados experimentais não apresentam resultados perfeitos, refletindo em assimetrias na curva Gaussiana. Dessa forma, foi proposto o uso de equações com características exponenciais, como a curva gaussiana, para representar os dados experimentais. As funções *Extreme*, *GaussAmp* e *Logistpk* são algumas com essas descrições e foram selecionadas através do *software* Origin 8.5. A Tabela 2 apresenta as principais características dessas funções.

Nos modelos representados abaixo, o parâmetro  $A$  é a amplitude da curva,  $y_0$  é o valor de  $f(t)$  no tempo inicial,  $W$  é a largura da curva e o parâmetro  $X_c$  é o valor do tempo no centro da curva.

Tabela 2 - Funções polinomiais de baixa ordem e suas características.

Equação	Nome	Função	Restrições	$f'(t)$	Coordenadas do ponto de máximo (ou mínimo)
(8)	<i>Extreme</i>	$y = y_0 + Ae[-e^{(-z)} - z + 1]$ $z = \left(\frac{t - x_c}{w}\right)$	$A > 0$ e $w > 0$	$A \cdot e^{(1-z-e^{(-z)})} \cdot \left(\frac{e^{(-z)}}{w} - \frac{1}{w}\right)$	$t = x_c, y = y_0 + A$
(9)	<i>GaussAmp</i>	$y = y_0 + A \cdot e^{(-0,5 \cdot (z)^2)}$ $z = \left(\frac{t - x_c}{w}\right)$	$A > 0$ e $w > 0$	$\frac{A \cdot e^{\left(\frac{-z^2}{2}\right)} \cdot 2(t - x_c)}{2w^2}$	$t = x_c, y = y_0 + A$
(10)	<i>Logistpk</i>	$y = y_0 + \frac{4 \cdot A \cdot e^{(-z)}}{(1 + e^{(-z)})^2}$ $z = \left(\frac{t - x_c}{w}\right)$	$A > 0$ e $w > 0$	$\frac{8 \cdot A \cdot e^{-2z}}{w \cdot (e^{-z} + 1)^3} - \frac{4 \cdot A \cdot e^{-z}}{w \cdot (e^{-z} + 1)^2}$	$t = x_c, y = y_0 + A$

Fonte: Adaptado do *software* Origin.

### 2.4.3 Estimação de parâmetros por mínimos quadrados não-linear

Conforme pode ser observado nas Tabelas 1 e 2 todos os modelos apresentados são não-lineares nos parâmetros, portanto, requer algum procedimento de estimação de parâmetros não-linear. Segundo Edgar e Himmelblau (2001), se um modelo for não-linear em relação aos parâmetros, então o método de mínimos quadrados não-linear deve ser utilizado, em vez de mínimos quadrados lineares, para estimar os parâmetros. No geral, um modelo não-linear pode ser escrito na forma da Equação (11).

$$Y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \dots) \quad (11)$$

Em que,  $Y$  é a resposta do modelo;  $x_j$ 's são as variáveis de entradas do modelo e  $\beta_j$ 's são os parâmetros a serem estimados.

Pode-se definir o critério da soma dos quadrados do erro, como função objetivo a ser minimizada, para estimar o conjunto de parâmetros  $\beta_j$ 's, conforme Equação (12).

$$F_{\text{obj}} = \sum_{i=1}^{\text{NE}} (Y_i^e - Y_i^m)^2 \quad (12)$$

Em que,  $Y_i^e$  é o dado obtido experimentalmente;  $Y_i^m$  são os dados calculados pelo modelo; NE é o número de experimentos.

Para Montgomery (2009), um modelo de regressão não-linear é composto de um componente determinístico  $f(x_j; \beta_j)$  e por um componente aleatório,  $\varepsilon_j$ , conforme Equação (13).

$$Y = f(x_j; \beta_j) + \varepsilon_j \quad (13)$$

Em que,  $j$  refere-se a  $j$ -ésima observação,  $Y$  são os valores da variável aleatória resposta;  $\beta_j$  é o vetor de parâmetros,  $x_j$  são os valores conhecidos ou pré-fixados do tempo e não correlacionados entre si e os  $\varepsilon_j$  são variáveis aleatórias independentes e identicamente distribuídas de modo que  $\varepsilon_j \sim N(0, \sigma^2)$ , com  $\sigma^2$  constante.

Este modelo pode ser expresso na forma vetorial dada pela Equação (14).

$$Y = x\hat{\beta} + \varepsilon \quad (14)$$

em que,

$$\hat{\beta} = \begin{bmatrix} \beta_1 \\ \beta_2 \\ \vdots \\ \beta_j \end{bmatrix}, \quad Y = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_j \end{bmatrix}, \quad x = \begin{bmatrix} x_{11} & \cdots & x_{1p} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{n1} & \cdots & x_{np} \end{bmatrix}$$

A função objetivo a ser minimizada é dada pela forma da Equação (15), que tem solução na forma da Equação (16). Maiores detalhamentos sobre a técnica de mínimos quadrados não-linear podem ser encontrados em Bem (2017), Devore (2006), Mattos (2013), Seber e Wild (2003) e Silveira (2013).

$$f = \varepsilon^T \varepsilon = (Y - x\hat{\beta})^T (Y - x\hat{\beta}) \quad (15)$$

$$\hat{\beta} = (x^T x)^{-1} x^T Y \quad (16)$$

### 2.2.4 Análise da qualidade dos modelos

A qualidade do ajuste dos modelos pode ser realizada de várias maneiras. Pode-se utilizar, por exemplo, a Soma do Quadrado dos Erros (SQE), na forma da Equação (17). Esta estatística reflete a variância não explicada pelo modelo, portanto, um valor mais próximo de zero indica que o modelo tem um componente de erro aleatório menor e que o ajuste será mais útil para a previsão (FERNANDEZ, 2017; SAMOHYL, 2009).

$$SQE = \sum_{i=1}^{NE} (Y_i^e - Y_i^m)^2 \quad (17)$$

Em que,  $Y_i^e$  é o dado obtido experimentalmente,  $Y_i^m$  é o dado calculado pelo modelo matemático e NE o número de experimentos.

De acordo com Fernandez (2017), como o SQE possui unidades de engenharia ao quadrado é conveniente expressá-lo através de sua raiz quadrada. Neste caso, tem-se a Raiz da Soma do Quadrado dos Erros (RMSE), na forma da Equação (18).

$$RMSE = \sqrt{SQE} \quad (18)$$

As Equações (17) e (18) medem a variabilidade não explicada pelo modelo, mas é igualmente importante aferir a variância explicada pelo modelo. Segundo Samohyl (2009), pode-se utilizar a Soma do Quadrado Total dos Erros (SQT), apresentada na forma da Equação (19).

$$SQT = \sum_{i=1}^{NE} (Y_i^m - \bar{Y})^2 \quad (19)$$

Em que,  $Y_i^m$  é o dado calculado pelo modelo matemático,  $\bar{Y}$  a média dos valores calculados pelo modelo e NE o número de experimentos.

A relação entre a variabilidade não explicada pelo modelo e aquela que o mesmo consegue explicar é usualmente conhecida pelo nome de Coeficiente de Determinação ( $R^2$ ), que pode ser representada pela Equação (20).  $R^2$  próximo de 1 indica que uma maior proporção de variância (em termos percentual) é contabilizada pelo modelo (SAMOHYL, 2009).

$$R^2 = 1 - \frac{SQE}{SQT} \quad (20)$$

Se o número de parâmetros do modelo aumentar, o valor de  $R^2$  também irá aumentar, embora isso não signifique um melhor ajuste dos dados. Para evitar essa situação, Samohyl (2009) sugere utilizar o Coeficiente de Determinação Ajustado ( $R^2$  adj.), na forma da Equação (21).

$$R^2_{adj.} = 1 - (1 - R^2) \left[ \frac{n - 1}{n - (k + 1)} \right] \quad (21)$$

Em que,  $n$  representa o tamanho da amostra e  $k$  o número de parâmetros na equação de regressão.

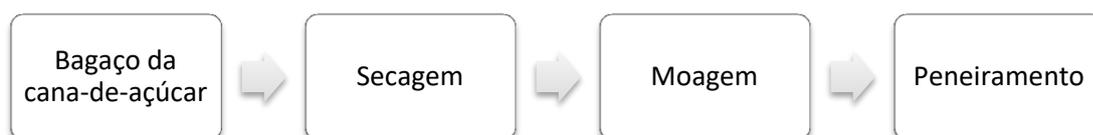
A partir dos modelos apresentados, verifica-se que o consumo de substrato, a atividade enzimática, a concentração de células e o consumo de oxigênio nos processos fermentáveis podem ser modelados por modelos empíricos. Os modelos empíricos na forma sigmoide são mais comuns para prever a máxima taxa variação do consumo de substrato e da atividade enzimática. Os modelos empíricos gaussianos podem ser utilizados para prever a máxima produção de células e o máximo consumo de oxigênio no meio. Estas duas classes de modelos foram avaliadas neste trabalho.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 PREPARO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

O bagaço da cana-de-açúcar (BC) utilizado foi doado pela DISA (Destilaria Itaúnas S/A), uma usina de produção de álcool e açúcar localizada na cidade Conceição da Barra, no estado do Espírito Santo – ES. O bagaço foi seco em uma estufa de esterilização e secagem (EDUTECH) a 55 °C até massa constante, com a finalidade de retirar a umidade da biomassa. Em seguida, o material foi triturado em moinho de facas SL 32 (SOLAB) e peneirado usando a granulometria de *mesh* -32/+42 com abertura superior de 0,500 mm e inferior de 0,355 mm. A Figura 6 apresenta um esquema da preparação do bagaço para ser utilizado posteriormente nas fermentações.

Figura 6 - Esquema do preparo do bagaço da cana-de-açúcar.



Fonte: O autor.

#### 3.2 OBTENÇÃO E PROPAGAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

O fungo *Aspergillus niger* INCQS 40018 foi cedido pela instituição de pesquisa e desenvolvimento Fundação Oswaldo Cruz, localizada no município do Rio de Janeiro, no estado do Rio de Janeiro – RJ. Os microrganismos foram propagados durante cinco (5) dias a 28 °C no meio Potato Dextrose Agar (PDA) 4,2% comercial e armazenados em geladeira.

#### 3.3 OBTENÇÃO DO INÓCULO

O inóculo foi obtido através do cultivo dos microrganismos em placas de Petri contendo o meio PDA 4,2%. Estes foram armazenados em estufa de crescimento biológico por cinco (5) dias a 28 °C. Após terminar o tempo de crescimento do microrganismo, os esporos foram raspados em Tween 80 (0,1 % v/v) e contados em câmara de Neubauer com a finalidade de determinar a concentração de esporos presentes no meio, e posteriormente, quantificar o volume do inóculo a ser utilizado.

### 3.4 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Os ensaios para produção enzimática foram realizados em batelada em um biorreator TEC-BIO-7,5V (TECNAL) de 1,5 L. O bagaço de cana-de-açúcar foi adicionado com concentrações de 5, 10, 13, 15 e 20 g/L em 1,0 L de solução salina de Mandels e Weber (1969): 2,0 g/L de fosfato de potássio monobásico,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,3 g/L ureia,  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ ; 1,4 g/L de sulfato de amônio,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,3 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,3 g/L de cloreto de cálcio,  $\text{CaCl}_2$ ; 0,75 g/L de peptona, 0,25 g/L de extrato de levedura, 5,0 mg/L de sulfato de ferro (II) heptahidratado,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,4 mg/L de sulfato de zinco heptahidratado,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1,56 mg/L de sulfato de manganês monohidratado,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 2,0 mg/L de cloreto de cobalto (II) hexahidratado,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

O pH foi ajustado para 5,0. O biorreator foi autoclavado a 121 °C por 40 minutos. Inoculou-se  $10^6$  esporos/mL. A agitação foi conduzida utilizando uma turbina do tipo Rushton de 200 a 250 rpm. A temperatura e a taxa de aeração foram de 30 °C e 1 L/min, durante um tempo de cultivo de 72 horas. As amostras foram coletadas nos tempos de 0, 10, 24, 48 e 72 horas para análise de concentração de celulose, células e atividade enzimática. Durante o período de fermentação foi monitorado o comportamento do oxigênio dissolvido no meio a partir de um sensor (METTLER TOLEDO). As condições operacionais utilizadas estão resumidas na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições experimentais para produção enzimática.

Variáveis	Condições
Vazão de ar	1 L/min
Agitação	200 a 250 rpm
Temperatura	30 °C
Tempo de fermentação	72 h
Volume	1,0 L
pH	5,0
Concentração de substrato	5, 10, 13, 15 e 20 g/L

Fonte: O autor.

### 3.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA (CMCase)

A atividade enzimática foi realizada de acordo com a metodologia da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) descrita por Ghose (1987). Para

determinação da atividade endoglucanásica (CMCase) foram adicionados, em tubos de ensaio, 0,5 mL do extrato enzimático e 0,5 mL de solução de CMC 2% (m/v) preparada em solução tampão citrato 50 mM (pH 4,8). Os tubos foram mantidos a 50 °C por 15 minutos. Posteriormente, foi adicionado 2 mL de solução de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). Após a adição do DNS levou-se os tubos para um banho a 100 °C por 5 min e, em seguida, resfriou-se em banho de gelo e adicionou-se 12 mL de água destilada. Posteriormente, realizou-se a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm. O valor medido diz respeito à dosagem da concentração de açúcares redutores liberados durante a degradação do substrato carboximetilcelulose (CMC).

A atividade enzimática foi expressa em unidades internacionais (UI), em que uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de extrato enzimático necessária para liberar 1 μmol de açúcares redutores (glicose equivalente) por minuto. Para o cálculo da atividade enzimática utilizou-se Ghose, (1987), conforme a Equação 22.

$$\text{Atividade enzimática} = \frac{C \cdot V_1}{V_2 \cdot t} \quad (22)$$

Em que, C é a concentração de açúcares redutores (μmol·AR/mL), V<sub>1</sub> é volume da solução incubada (mL), V<sub>2</sub> é volume do extrato enzimático presente na solução incubada (mL) e t é o tempo de incubação (min).

### 3.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CELULOSE, MASSA SECA E CÉLULAS

A quantificação da concentração de celulose e massa seca total foi baseada no método exposto por Gelain, Geraldo e Carvalho (2015). Foram coletados 10 mL de amostra do meio fermentativo, estas foram centrifugadas (3500 rpm por 20 minutos) e o sobrenadante foi removido para determinação das atividades enzimáticas. A amostra sólida foi seca em estufa a 70 °C até massa constante. A massa resultante, após a secagem, representa à massa seca total.

Posteriormente, adicionou-se 3 mL de uma solução de ácidos (ácido acético 80 % (v/v) e ácido nítrico puro na proporção de 10:1) à amostra seca, e esta foi fervida por 30 minutos em banho de água fervendo (100 °C). Em seguida, o material foi resfriado e centrifugado (3500 rpm por 20 minutos), este foi lavado com água destilada, centrifugado (3500 rpm por 20 minutos) e seco em estufa a 70 °C até massa constante, sendo o sólido resultante composto principalmente por celulose. O procedimento foi realizado em quadruplicata.

De acordo com Gelain, Geraldo e Carvalho (2015), a concentração de células foi estimada através da diferença entre a concentração de sólidos totais e a concentração de celulose desconsiderando os resíduos de lignina, hemiceluloses e cinzas (outros), através do uso da Equação (23).

$$\text{células} + \text{outros} = \text{massa seca total} - \text{celulose} \quad (23)$$

### 3.7 MODELAGEM EMPÍRICA

Para prever a máxima variação (ponto de inflexão) do consumo de substrato e da atividade enzimática, nas concentrações de 5, 10, 13 e 20 g/L BC, foi proposto o uso dos modelos sigmóides Logístico, Gompertz, Richards, Morgan-Mercer-Flodin, Weibull e Boltzmann, conforme apresentado nas Equações 1 a 6. Os dados experimentais foram ajustados aos modelos por procedimento numérico de estimação de parâmetros, por meio do *software* Origin 8.5, utilizando a técnica de mínimos quadrados não-linear, conforme Equações 11 a 16.

Para prever a máxima produção de células (ponto de máximo) e o máximo consumo de oxigênio (ponto de mínimo), nas concentrações de 5, 10, 13 e 20 g/L BC, utilizou-se os modelos *Extreme*, *GaussAmp* e *Logistpk*, conforme Equações 8 a 10.

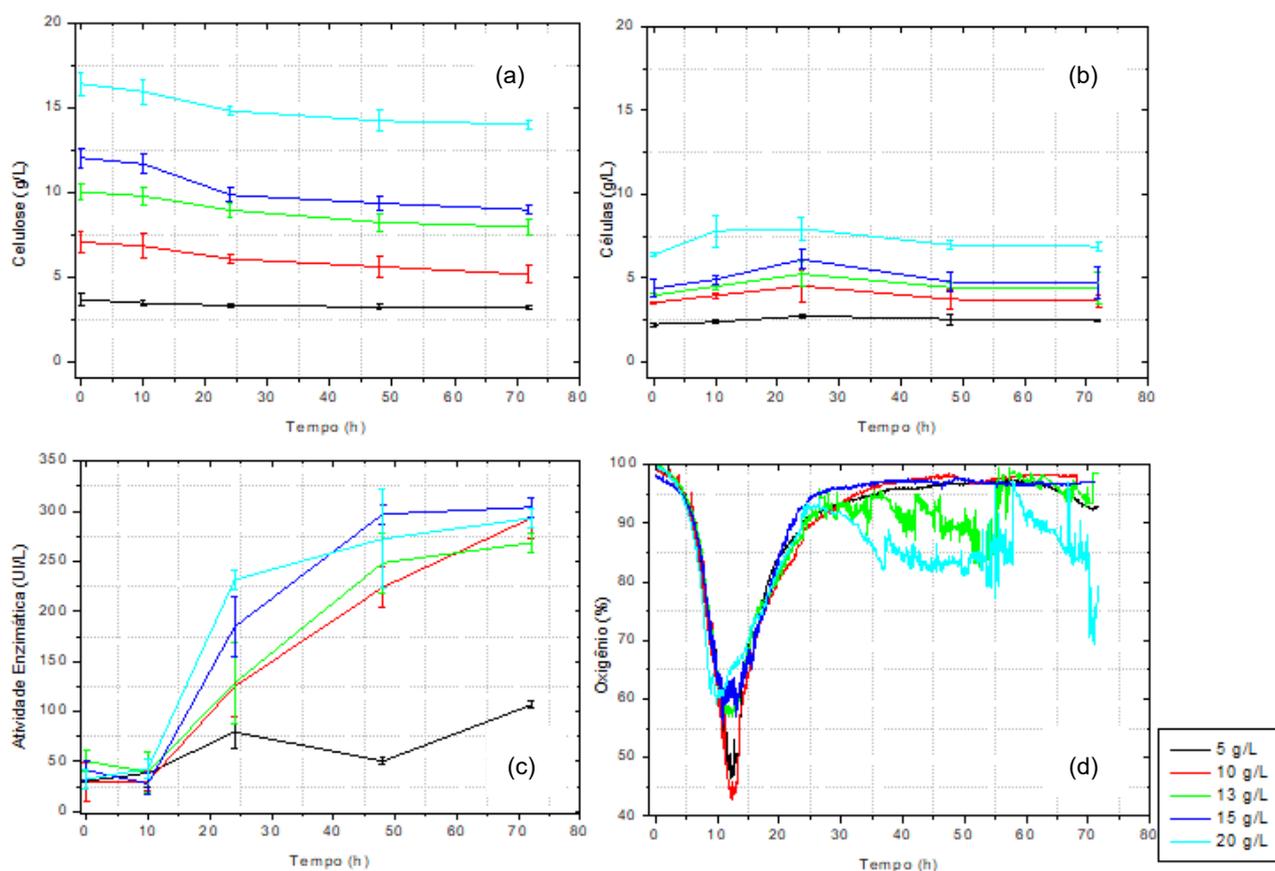
Em todos os casos, a qualidade do ajuste dos modelos foi avaliada conforme Equações 17 a 21. A validação dos modelos foi realizada usando dados de concentração de 15 g/L BC. Esses dados, embora dentro da faixa experimental estudada (5 a 20 g/L), não foram utilizados para estimar os parâmetros dos modelos, evitando, desta forma, o crime inverso (*inverse crime*).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO (CELULOSE), CÉLULAS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A fermentação submersa foi realizada com a finalidade de analisar a produção de celulases em diferentes concentrações de bagaço da cana-de-açúcar (5, 10, 13, 15 e 20 g.L<sup>-1</sup>). Para isso, foram avaliadas a atividade enzimática (CMCase), a concentração de celulose, de células e de oxigênio dissolvido no decorrer do processo. A Figura 7 exibe os principais resultados obtidos nos experimentos realizados.

Figura 7 - Resultados das análises de concentração de celulose (a), concentração de células (b), atividade enzimática (c) e concentração de oxigênio dissolvido (d) nas fermentações de 5, 10, 13, 15 e 20 g/L.



Fonte: O autor.

Notou-se que, com exceção do ensaio contendo 5 g/L de BC, existe um comportamento padrão, na forma sigmoide, para a celulose e para a atividade

enzimática, modificando-se apenas em função da quantidade inicial de bagaço introduzida no reator. Já a concentração de células apresentou um comportamento padrão com curvas em forma de “sino” em todas as concentrações de bagaço testadas.

Analisando-se as atividades enzimáticas encontradas verificou-se que nas primeiras horas de fermentação não foram observadas grandes produções enzimáticas e os cultivos com diferentes concentrações de BC obtiveram um aumento na atividade com o passar do tempo. Esse mesmo comportamento pode ser observado no trabalho de Gelain (2014), em que o autor comenta que a baixa atividade no início do processo corresponde a um período de produção das enzimas, em que a velocidade de produção supera a de secreção, em seguida ocorre produção e secreção, e no final de cultivo não ocorre mais produção, apenas secreção de enzimas.

Na fermentação de 5 g/L houve uma pequena produção de celulase, devido ao pouco crescimento microbiano, o que justifica seu comportamento diferente quando comparado com as outras concentrações. Nas concentrações acima de 10 g/L alcançou-se valores muito próximos de atividade, o que permitiu concluir que essas fermentações seriam viáveis para produção de celulases. No entanto, dentre as análises, o ensaio de 15 g/L apresentou uma atividade de 300 UI/L, exibindo melhor produção enzimática.

Destaca-se que os ensaios de 13, 15 e 20 g/L exibiram uma produção máxima de CMCase em 48 horas de cultivo, já as fermentações de 5 e 10 g/L não apresentaram esse comportamento. A maior atividade em menor tempo de fermentação mostra que não é necessário mantê-la por um período prolongado, neste caso 72 horas, uma vez que a diminuição do tempo gera um menor gasto energético, e, conseqüentemente, um menor custo do processo.

Valores semelhantes de atividade CMCase foram encontrados na literatura científica para produção de celulases por *Aspergillus niger*, conforme exibido anteriormente na revisão bibliográfica. Florencio, Badino e Farinas (2016), Cunha et al. (2012),

Aguiar e Menezes (2000) e Kumar, Sharma e Sarkar (2011) encontraram atividades CMCase de 400, 824, 200 UI/L e 360 UI/L, respectivamente.

Nas variações das concentrações de celulose em função do tempo, observou-se que durante as primeiras 10 horas de fermentação não foram observadas grandes variações. A partir das 10 horas começou a ocorrer um consumo do substrato, com exceção do ensaio de 5 g/L, que praticamente não apresentou mudança no decorrer do tempo. No ensaio de 5 g/L, o baixo consumo de celulose pode ter sido ocasionado pela baixa disponibilidade de substrato no meio. A baixa concentração faz com que o bagaço esteja muito disperso no líquido, dificultando o acesso do microrganismo ao mesmo, deixando o crescimento microbiano limitado e resultando na diminuição do consumo da celulose. Dessa forma, o ensaio de 5 g/L não foi utilizado para a realização da modelagem matemática, visto que, seu comportamento foi diferente das demais fermentações.

A quantificação de células em meios heterogêneos, os quais apresentam sólidos suspensos no caldo fermentativo, é complexa devido à dificuldade em separar os microrganismos do substrato, dessa forma, foi necessário utilizar metodologias de estimativa indireta da biomassa celular. Os métodos indiretos relacionam algum componente que seja mensurável e proporcional com a concentração de células por meio de uma equação matemática. A quantificação do consumo de O<sub>2</sub> ou liberação de CO<sub>2</sub>, assim como a estimativa de DNA ou RNA são exemplos de métodos para determinar indiretamente a concentração de células (GELAIN; GERALDO; CARVALHO, 2015; KOUTINAS; WANG; WEBB, 2003). Neste trabalho, empregou-se o método indireto descrito por Gelain, Geraldo e Carvalho (2015) no qual as células foram estimadas através da diferença entre a concentração de sólidos totais e a concentração de celulose, desconsiderando os resíduos de lignina, hemiceluloses e cinzas.

Observou-se nos gráficos das concentrações de células que o período de crescimento iniciou-se no tempo 0 e atingiu um máximo em 24 horas de fermentação. Após esse tempo, verificou-se uma fase de declínio nas curvas de todas as diferentes concentrações de BC, indicando que a taxa de morte celular

tornou-se superior ao crescimento microbiano. Pode-se verificar que as curvas obtiveram comportamentos semelhantes.

Salienta-se que o comportamento das curvas de crescimento foi similar nas fermentações, mesmo este método podendo conter erros, já que, na quantificação da concentração de células pode aparecer também os resíduos de lignina, hemiceluloses e cinzas (outros). No entanto, o gráfico apresentado teve desempenho semelhante do estabelecido por Gelain, Geraldo e Carvalho (2015).

A partir das análises das Figuras apresentadas apurou-se que o momento de início do consumo de substrato correspondeu ao período de crescimento exponencial celular. As células utilizam o substrato para obtenção de energia, usando-a para o seu crescimento e manutenção, por isso quando a quantidade de celulose diminui, aumenta-se o número de células no meio. Sendo assim, tanto a velocidade máxima de crescimento quanto o maior consumo de substrato ocorreram em 24 horas. Após esse período, verificou-se uma fase de declínio do número de células e a estabilização da quantidade de substratos. Supostamente, esse fato pode ter ocorrido devido ao acúmulo de metabólitos e/ou limitação de nutrientes no meio fermentativo.

Os crescimentos celulares exibidos ocorreram conforme exposto por Schmidell et al. (2001) e Tortora, Funke e Case (2017). Na fase exponencial verificou-se a máxima velocidade de crescimento, na fase estacionária a concentração de células atingiu um valor máximo e constante, porque houve um balanço entre a velocidade de crescimento e a velocidade de morte dos microrganismos, e na fase de declínio a velocidade de morte celular excedeu a velocidade de produção de células novas.

Analisando as concentrações de oxigênio dissolvido obtidas, apresentadas na Figura 7(d), observa-se que em todas as curvas aparece um ponto de extremo local, localizado entre 10 e 20 horas de fermentação. Este ponto de mínimo representa o máximo consumo de oxigênio no reator. Notou-se também que o consumo de oxigênio mostra um comportamento padrão, com curvas em forma de “sino”, em todas as concentrações de BC testadas.

A forma como as figuras foram plotadas permitiu avaliar qualitativamente o comportamento conjunto dessas variáveis de interesse (concentração de substrato, concentração de células, atividade enzimática e consumo de oxigênio) e inferir sobre possíveis modelos empíricos capazes de prever os dados experimentais. Em outras palavras, modelos que geram curvas em forma de “S” podem ser utilizados para descrever a concentração de substrato e atividade enzimática. E, modelos que geram curvas em forma de “sino” podem ser utilizados para concentração de células e o consumo de oxigênio.

#### 4.2 ANÁLISE DA CORRELAÇÃO LINEAR

Visando avaliar a relação existente entre as variáveis estudadas foram calculadas as correlações lineares das mesmas. Estas podem variar de 0 a 1 em módulo e quanto maior for esse valor, maior será a relação entre elas. As Tabelas 4, 5, 6 e 7 mostram os coeficientes de correlação linear obtidos nos ensaios contendo 10, 13, 15 e 20 g/L de bagaço de cana, respectivamente. Vale ressaltar que a fermentação de 5 g/L não foi utilizada para representação de modelos devido seu comportamento diferenciado. As correlações significativas ( $> 0,90$ ) estão destacadas em vermelho. Notou-se que a atividade-substrato e células-oxigênio se relacionaram linearmente na forma inversa.

Tabela 4 - Matriz com os coeficientes de correlação para o ensaio de 10 g/L.

	Substrato	Células	Atividade	Oxigênio
Substrato	1			
Células	-0,3316	1		
Atividade	<b>-0,9534</b>	0,0573	1	
Oxigênio	0,1155	<b>-0,9677</b>	0,1733	1

Tabela 5 - Matriz com os coeficientes de correlação para o ensaio de 13 g/L.

	Substrato	Células	Atividade	Oxigênio
Substrato	1			
Células	-0,0977	1		
Atividade	<b>-0,9579</b>	0,1451	1	
Oxigênio	0,0460	<b>-0,9189</b>	-0,0041	1

Tabela 6 - Matriz com os coeficientes de correlação para o ensaio de 15 g/L.

	Substrato	Células	Atividade	Oxigênio
Substrato	1			
Células	0,0609	1		
Atividade	<b>-0,9923</b>	-0,0962	1	
Oxigênio	-0,0094	<b>-0,9495</b>	0,0754	1

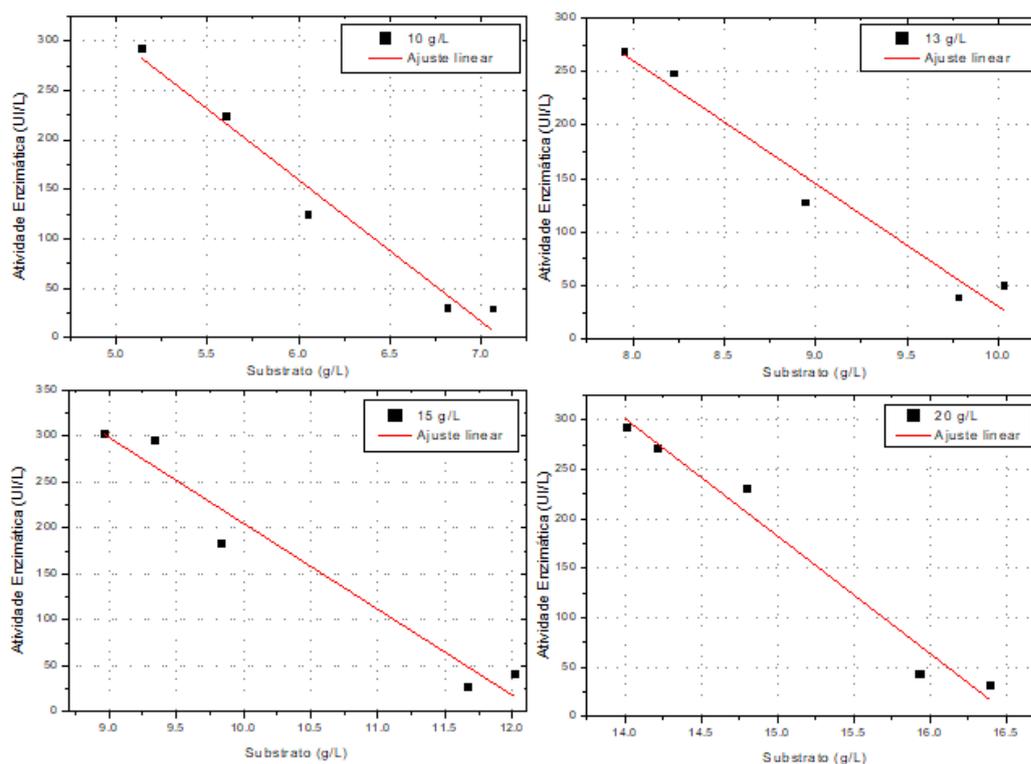
Tabela 7 - Matriz com os coeficientes de correlação para o ensaio de 20 g/L.

	Substrato	Células	Atividade	Oxigênio
Substrato	1			
Células	-0,3177	1		
Atividade	<b>-0,9858</b>	0,3416	1	
Oxigênio	0,5864	<b>-0,9448</b>	-0,5935	1

A análise de correlação é um fator de grande importância, já que o crescimento fúngico pode ser avaliado a partir do consumo de oxigênio dissolvido, desde que exista uma relação funcional (ou seja, um modelo matemático) capaz de relacionar estas duas variáveis de interesse. De acordo com Koutinas, Wang e Webb (2003) a medida dos dados metabólicos, como a taxa de liberação do CO<sub>2</sub> e a taxa de consumo de O<sub>2</sub> pode ser utilizada como meio indireto de quantificação do crescimento celular. Vale destacar também que o consumo de O<sub>2</sub> ocorre como resultado do metabolismo dos fungos, principalmente, devido ao crescimento e manutenção dos mesmos, sendo que no consumo máximo de O<sub>2</sub>, as células consomem grande parte do oxigênio que é fornecido ao biorreator.

A Figura 8 apresenta o ajuste linear das correlações entre atividade enzimática e consumo de substrato para as fermentações com concentrações de 10, 13, 15 e 20 g/L BC, respectivamente. Observou-se que as relações apresentaram um bom ajuste linear, o que permitiu concluir que as variáveis estudadas foram linearmente proporcionais.

Figura 8 – Correlação linear entre atividade e substrato para as fermentações de 10, 13, 15 e 20 g/L.



Fonte: O autor.

A Tabela 8 apresenta os parâmetros que caracterizam o modelo linear para predição da atividade enzimática em função da concentração de substrato adicionada ao meio reacional, bem como o erro associado a cada um desses parâmetros. Verificou-se que em todos os casos o coeficiente de determinação ajustado ( $R^2$  adj.) foi superior a 0,90, mostrando um bom ajuste linear. Portanto, foi possível determinar a atividade enzimática a partir da concentração de substrato presente no meio reacional.

Tabela 8 - Parâmetros que caracterizam o modelo linear para predição da atividade enzimática em função da concentração de substrato adicionada ao meio reacional.

Concentração de BC	a (UI/L)	b (UI/g)	$R^2$ adj.
10 g/L	$1019,6 \pm 87,1$	$-143,4 \pm 14,1$	0,9623
13 g/L	$1179,9 \pm 112,2$	$-114,9 \pm 12,4$	0,9548
15 g/L	$1140,4 \pm 124,1$	$-93,5 \pm 11,9$	0,9383
20 g/L	$1961,6 \pm 175,5$	$-118,6 \pm 11,6$	0,9626

No caso da relação entre células e oxigênio, não foi possível obter uma equação linear, já que apesar de ter obtido um valor de correlação significativo, esta

combinação deu origem a duas retas concorrentes. Esse comportamento já era esperado, visto que as variáveis apresentam curvas opostas, ou seja, enquanto a concentração de células aumenta (Figura 7(b)), a concentração de oxigênio diminui (Figura 7(d)), até chegar a um ponto máximo e mínimo, respectivamente, e, a partir daí, ocorre a diminuição da concentração celular e aumento da concentração de oxigênio. Essa relação entre as variáveis pode ser verificada na Figura 27 do Apêndice A.

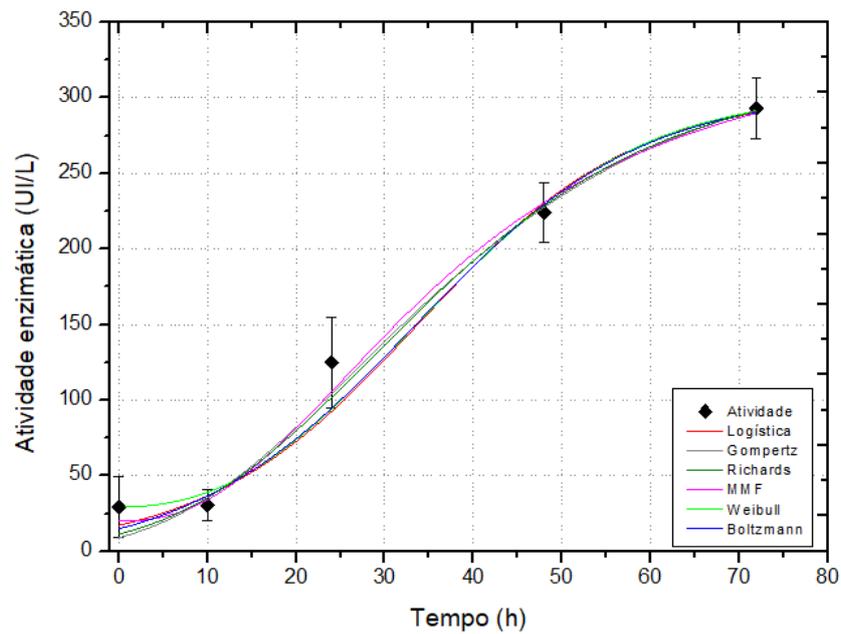
### 4.3 MODELOS SIGMOIDAIS

Por meio da análise gráfica dos dados experimentais para atividade enzimática e concentração de substrato, foi possível observar a similaridade dos mesmos com funções sigmoidais identificadas na literatura, como descrito na revisão bibliográfica. Assim, os principais modelos encontrados, apresentados na Tabela 1, foram testados para descrever os experimentos realizados.

#### 4.3.1 Ajuste não-linear para atividade enzimática

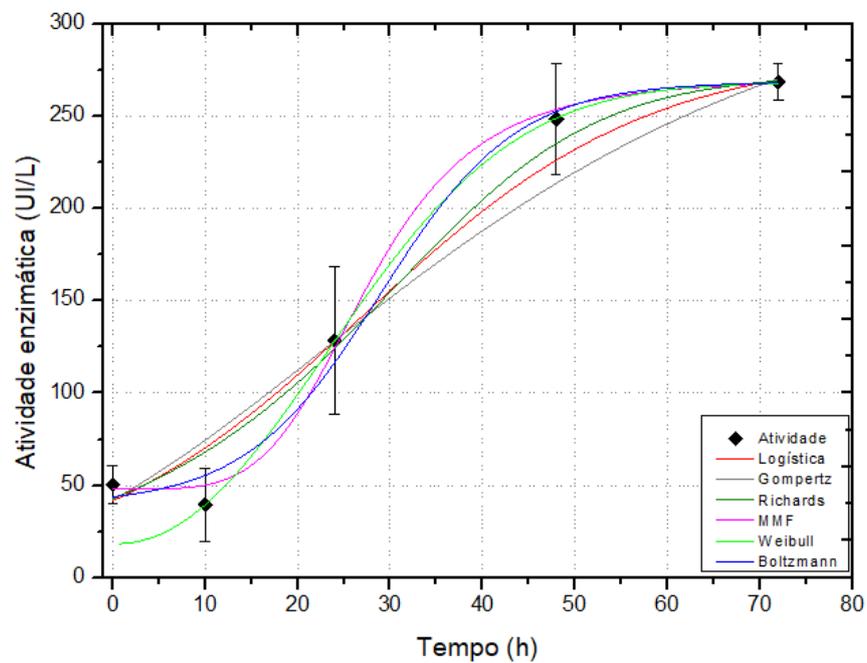
Os modelos sigmoides apresentados na Tabela 1 foram utilizados para prever a atividade enzimática nos ensaios contendo 10, 13 e 20 g/L de bagaço de cana. Os resultados podem ser observados nas Figuras 9, 10 e 11, respectivamente. Notou-se que para 10 g/L de BC todos os modelos ajustaram satisfatoriamente os dados experimentais, dentro da incerteza experimental, apresentando coeficiente de determinação ajustado ( $R^2_{adj.}$ ) superior a 0,90. Para a concentração de 13 g/L e 20 g/L apenas os modelos MMF, Weibull e Boltzmann foram capazes de representar os dados experimentais, dentro da incerteza experimental. As Tabelas 9, 10 e 11 apresentam todos os valores de parâmetros estimados para cada modelo, nas concentrações de 10, 13 e 20 g/L de bagaço de cana, respectivamente.

Figura 9 - Ajuste não-linear para atividade em função do tempo no ensaio contendo 10 g/L de BC.



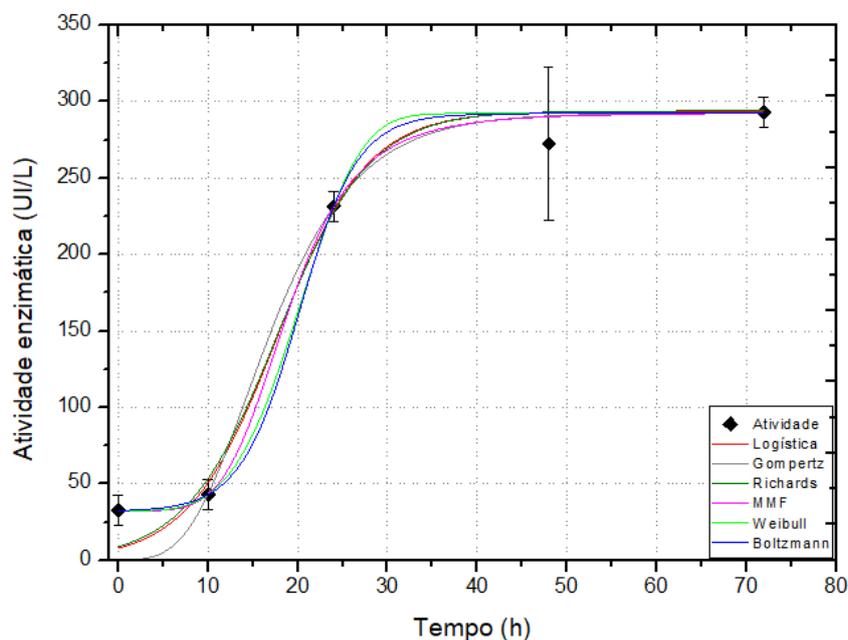
Fonte: O autor.

Figura 10 - Ajuste não-linear para atividade em função do tempo no ensaio contendo 13 g/L de BC.



Fonte: O autor.

Figura 11 - Ajuste não-linear para atividade em função do tempo no ensaio contendo 20 g/L de BC.



Fonte: O autor.

Tabela 9 - Resultado dos modelos não-lineares para atividade no ensaio contendo 10 g/L de BC.  
(continua)

Função	Parâmetros	SQE	RMSE	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> adj.
Logística	$\alpha = 302,7 \pm 29,4$ $\beta = 16,5 \pm 6,1$ $\gamma = 0,08 \pm 0,02$	2,0707	1,0175	0,9893	0,9785
Gompertz	$\alpha = 327,9 \pm 45,6$ $\beta = 3,6 \pm 0,6$ $\gamma = 0,05 \pm 0,01$	1,7814	0,9438	0,9908	0,9815
Richards	$\alpha = 319,0 \pm 88,3$ $\beta = 1,0 \pm 11,7$ $\gamma = 0,06 \pm 0,07$ $\delta = 0,2 \pm 1,8$	1,7378	1,3183	0,9910	0,9640
MMF	$\alpha = 347,9 \pm 81,5$ $\beta = 19,9 \pm 16,8$ $\gamma = 4872,2 \pm 16792,3$ $\delta = 2,34 \pm 1,05$	0,9160	0,9571	0,9952	0,9810
Weibull	$\alpha = 299,9 \pm 45,3$ $\beta = 29,5 \pm 0$ $\gamma = 0,023 \pm 0,005$ $\delta = 2,3 \pm 0,8$	1,8968	1,3772	0,9894	0,9683

Tabela 9 - Resultado dos modelos não-lineares para atividade no ensaio contendo 10 g/L de BC.  
(conclusão)

Função	Parâmetros	SQE	RMSE	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> adj.
Boltzmann	$\alpha_1 = -6,6 \pm 68,1$ $\alpha_2 = 305,3 \pm 50,9$ $\beta = 33,4 \pm 9,4$ $\gamma = 12,8 \pm 8,2$	2,0393	1,4280	0,9894	0,9577

Tabela 10 - Resultado dos modelos não-lineares para atividade no ensaio contendo 13 g/L de BC.

Função	Parâmetros	SQE	RMSE	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> adj.
Logística	$\alpha = 284,5 \pm 31,5$ $\beta = 5,8 \pm 1,9$ $\gamma = 0,06 \pm 0,02$	3,7328	1,3662	0,9867	0,9734
Gompertz	$\alpha = 330,3 \pm 117,4$ $\beta = 2,1 \pm 0,4$ $\gamma = 0,03 \pm 0,02$	5,1356	1,6024	0,9817	0,9634
Richards	$\alpha = 273,3 \pm 15,7$ $\beta = 50,5 \pm 0$ $\gamma = 0,10 \pm 0,03$ $\delta = 2,1 \pm 0,3$	2,8497	1,1937	0,9899	0,9797
MMF	$\alpha = 270,9 \pm 11,2$ $\beta = 48,0 \pm 5,8$ $\gamma = 3,6E6 \pm 3,7E7$ $\delta = 4,5 \pm 3,2$	0,3922	0,6262	0,9986	0,9944
Weibull	$\alpha = 268,5 \pm 0$ $\beta = 18,3 \pm 3,1$ $\gamma = 0,03 \pm 4,70E-4$ $\delta = 2,14 \pm 0,08$	0,00361	0,06005	0,9999	0,9999
Boltzmann	$\alpha_1 = 39,5 \pm 0$ $\alpha_2 = 268,8 \pm 8,1$ $\beta = 29,0 \pm 4,5$ $\gamma = 7,4 \pm 2,4$	1,1980	0,7739	0,9957	0,9915

Tabela 11 - Resultado dos modelos não-lineares para atividade no ensaio contendo 20 g/L de BC.

Função	Parâmetros	SQE	RMSE	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> adj.
Logística	$\alpha = 293,6 \pm 18,2$ $\beta = 35,9 \pm 27,7$ $\gamma = 0,20 \pm 0,04$	6,8838	1,8552	0,9870	0,9740
Gompertz	$\alpha = 292,5 \pm 22,8$ $\beta = 8,5 \pm 5,1$ $\gamma = 0,15 \pm 0,04$	10,6609	2,3088	0,9799	0,9597
Richards	$\alpha = 293,9 \pm 18,2$ $\beta = 32,5 \pm 0$ $\gamma = 0,20 \pm 0,02$ $\delta = 1,0 \pm 0,3$	6,9332	1,8619	0,9869	0,9738
MMF	$\alpha = 292,7 \pm 3,6$ $\beta = 32,4 \pm 3,6$ $\gamma = 2,0E6 \pm 4,2E6$ $\delta = 4,9 \pm 0,65$	0,12868	0,35872	0,9998	0,9990
Weibull	$\alpha = 292,2 \pm 3,94$ $\beta = 32,5 \pm 0$ $\gamma = 0,04 \pm 7,40E-4$ $\delta = 4,1 \pm 0,4$	0,1616	0,4020	0,9995	0,9986
Boltzmann	$\alpha_1 = 31,9 \pm 4,4$ $\alpha_2 = 292,2 \pm 3,9$ $\beta = 20,1 \pm 0,6$ $\gamma = 3,2 \pm 0,4$	0,1609	0,4011	0,9997	0,9988

Verificou-se que os modelos MMF, Weibull e Boltzmann apresentaram um ajuste satisfatório aos dados experimentais dentro da incerteza experimental. Esses modelos obtiveram R<sup>2</sup> adj similares, dessa forma o modelo selecionado para dar continuidade a modelagem foi o MMF, visto que esse apresentou maior valor de R<sup>2</sup>adj na análise de 10 e 20 g/L. A Tabela 12 apresenta os valores de parâmetros estimados para este modelo. Vale destacar o elevado valor do parâmetro  $\gamma$ , que representa a taxa média de crescimento, garantindo as curvas um crescimento mais rápido quando comparadas com aquelas com  $\gamma$  mais baixo.

Tabela 12 - Parâmetros estimados para atividade enzimática usando o modelo MMF.

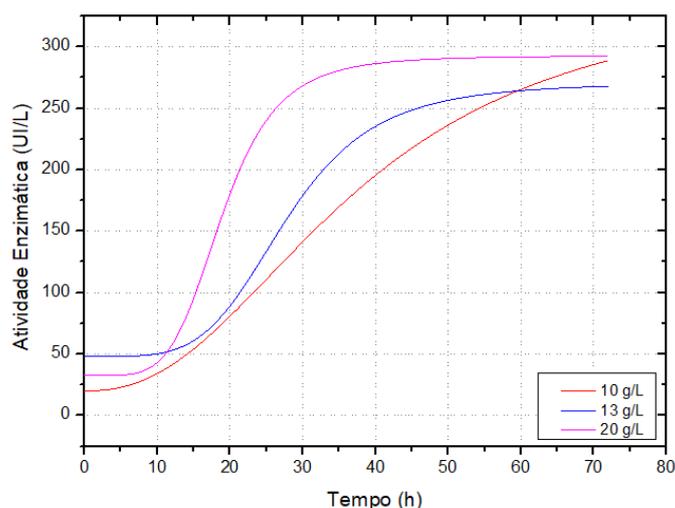
Ensaio	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$
10 g/L	347,9	19,9	4872,2	2,3
13 g/L	270,9	48,0	$3,6 \times 10^6$	4,5
20 g/L	292,7	32,4	$2,04 \times 10^6$	4,9

A Tabela 13 mostra o tempo em que ocorreu a máxima taxa de variação da atividade enzimática. Este comportamento (ponto de inflexão) fica mais evidente ao observar a Figura 12. Esses valores representam o momento em que ocorre a maior taxa de secreção de enzimas pelos fungos durante a fermentação. Pode-se observar ainda que quanto maior a concentração de BC no meio, mais rápido foi alcançada a taxa máxima. A maior concentração de BC pode ter obtido ponto de inflexão mais rapidamente devido a maior disponibilidade de substrato para os microrganismos na fermentação, entretanto este ensaio não atingiu a maior produção de enzima quando comparado com os demais. Essa análise é importante para realização da otimização de processos industriais, pois é neste tempo que ocorre uma maior formação do produto de interesse. Após o ponto de inflexão a quantidade de enzimas secretadas começa a diminuir e a curva apresenta uma mudança em sua curvatura.

Tabela 13 - Estimativa do ponto de inflexão para atividade enzimática.

Ensaio	Tempo (h)	Atividade (UI/L)
10 g/L	29,69	118,64
13 g/L	26,27	145,66
20 g/L	17,42	136,20

Figura 12 - Respostas do modelo MMF para atividade enzimática com parâmetros otimizados.

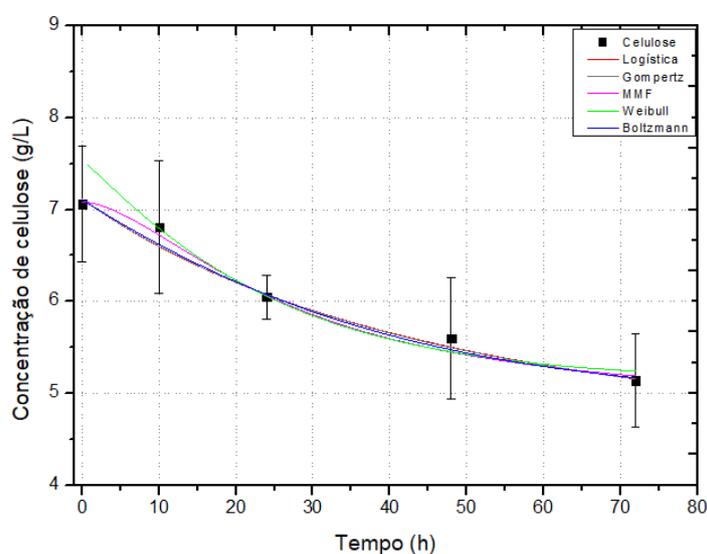


Fonte: O autor.

### 4.3.2 Ajuste não-linear para concentração de celulose

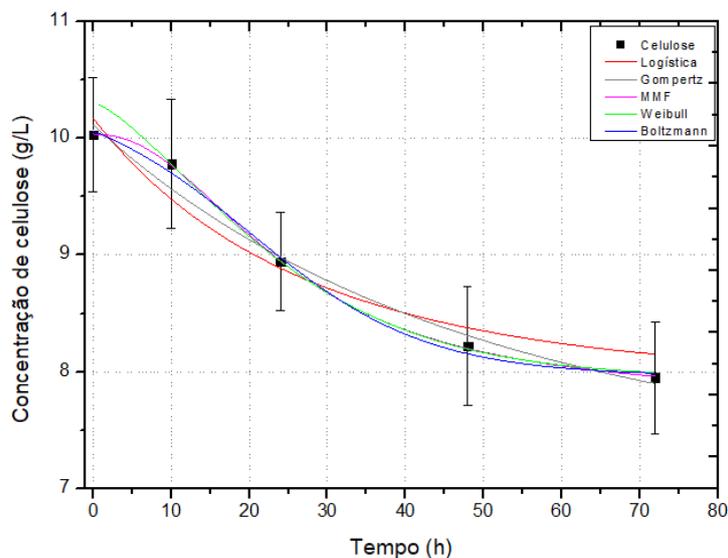
As Figuras 13, 14 e 15 apresentam os resultados obtidos com os modelos da Tabela 1 para os ensaios de 10, 13 e 20 g/L de BC, respectivamente. O modelo de Richards não foi eficaz para descrever os experimentos estudados, com exceção desse, todos os demais foram capazes de prever os dados experimentais, dentro da incerteza apresentada no gráfico. O coeficiente de determinação ajustado em todos os casos foi superior a 0,90, mostrando um bom ajuste do modelo.

Figura 13 - Ajuste não-linear para concentração de celulose no ensaio contendo 10 g/L de BC.



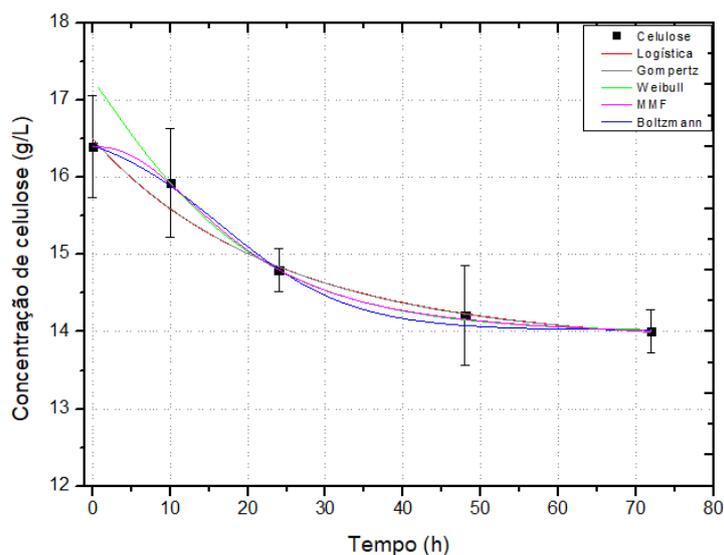
Fonte: O autor.

Figura 14 - Ajuste não-linear para concentração de celulose no ensaio contendo 13 g/L de BC.



Fonte: O autor.

Figura 15 - Ajuste não-linear para concentração de celulose no ensaio contendo 20 g/L de BC.



Fonte: O autor.

As Tabelas 14, 15 e 16 resumem todos os valores de parâmetros estimados para os modelos, bem como a sua qualidade. Verificou-se que o modelo MMF ajustou bem todos os ensaios experimentais, dentro da incerteza experimental.

Tabela 14 – Resultado dos modelos não-lineares para substrato no ensaio contendo 10 g/L de BC. (continua)

Função	Parâmetros	SQE	RMSE	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> adj.
Logística	$\alpha = 4,4 \pm 0,6$ $\beta = -0,37 \pm 0,08$ $\gamma = 0,014 \pm 0,007$	0,1291	0,2540	0,9825	0,9650
Gompertz	$\alpha = 4,6 \pm 0,4$ $\beta = -0,43 \pm 0,09$ $\gamma = 0,019 \pm 0,007$	0,1277	0,2527	0,9827	0,9653
MMF	$\alpha = 4,8 \pm 0,6$ $\beta = 7,08 \pm 0,18$ $\gamma = 246,6 \pm 668,1$ $\delta = 1,7 \pm 0,9$	0,0829	0,2879	0,9887	0,9550
Weibull	$\alpha = 5,1 \pm 0$ $\beta = 7,5 \pm 1,1$ $\gamma = 0,04 \pm 0,02$ $\delta = 1,1 \pm 0,6$	0,0914	0,3023	0,9792	0,9377

Tabela 14 – Resultado dos modelos não-lineares para substrato no ensaio contendo 10 g/L de BC.  
(conclusão)

Função	Parâmetros	SQE	RMSE	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> adj.
Boltzmann	$\alpha_1 = 12,3 \pm 53,7$ $\alpha_2 = 4,9 \pm 1,2$ $\beta = -25,4 \pm 353,3$ $\gamma = 29,5 \pm 76,9$	0,1258	0,3547	0,9829	0,9316

Tabela 15 – Resultado dos modelos não-lineares para substrato no ensaio contendo 13 g/L de BC.

Função	Parâmetros	SQE	RMSE	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> adj.
Logística	$\alpha = 7,9 \pm 0$ $\beta = -0,218 \pm 0,016$ $\gamma = 0,030 \pm 0,006$	0,6682	0,4720	0,9506	0,9341
Gompertz	$\alpha = 7,2 \pm 0,8$ $\beta = -0,3 \pm 0,1$ $\gamma = 0,017 \pm 0,009$	0,2327	0,3411	0,9828	0,9656
MMF	$\alpha = 7,76 \pm 0,07$ $\beta = 10,04 \pm 0,03$ $\gamma = 1153,6 \pm 652,7$ $\delta = 2,2 \pm 0,2$	0,0036	0,0600	0,9997	0,9989
Weibull	$\alpha = 7,9 \pm 0$ $\beta = 10,3 \pm 0,2$ $\gamma = 0,037 \pm 0,004$ $\delta = 1,4 \pm 0,2$	0,0110	0,1047	0,9985	0,9956
Boltzmann	$\alpha_1 = 10,4 \pm 0,5$ $\alpha_2 = 7,9 \pm 0,1$ $\beta = 20,1 \pm 5,0$ $\gamma = 11,3 \pm 4,8$	0,055	0,2345	0,9959	0,9837

Tabela 16 – Resultado dos modelos não-lineares para substrato no ensaio contendo 20 g/L de BC.

Função	Parâmetros	SQE	RMSE	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> adj.
Logística	$\alpha = 13,8 \pm 0,2$ $\beta = -0,160 \pm 0,014$ $\gamma = 0,040 \pm 0,008$	0,2793	0,3737	0,9829	0,9657
Gompertz	$\alpha = 13,8 \pm 0,2$ $\beta = -0,18 \pm 0,02$ $\gamma = 0,040 \pm 0,008$	0,2667	0,3652	0,9836	0,9673
MMF	$\alpha = 13,90 \pm 0,04$ $\beta = 16,40 \pm 0,05$ $\gamma = 801,9 \pm 522,9$ $\delta = 2,3 \pm 0,2$	0,0062	0,0788	0,9996	0,9985
Weibull	$\alpha = 14 \pm 0$ $\beta = 17,2 \pm 0,7$ $\gamma = 0,1 \pm 0,3$ $\delta = 1,13 \pm 0,01$	0,0129	0,1135	0,9985	0,9955
Boltzmann	$\alpha_1 = 16,7 \pm 0,5$ $\alpha_2 = 14,02 \pm 0,06$ $\beta = 16,6 \pm 4,1$ $\gamma = 8,3 \pm 2,6$	0,0480	0,2191	0,9971	0,9882

A Tabela 17 apresenta o resumo dos valores de parâmetros estimados para concentração de substrato usando o modelo com o melhor ajuste (MMF), ou seja, o qual obteve R<sup>2</sup> adj. mais elevado.

Tabela 17 - Parâmetros estimados para concentração de substrato usando o modelo MMF.

Ensaio	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$
10 g/L	4,8	7,1	246,6	1,7
13 g/L	7,8	10,04	1153,6	2,2
20 g/L	13,9	16,4	801,9	2,3

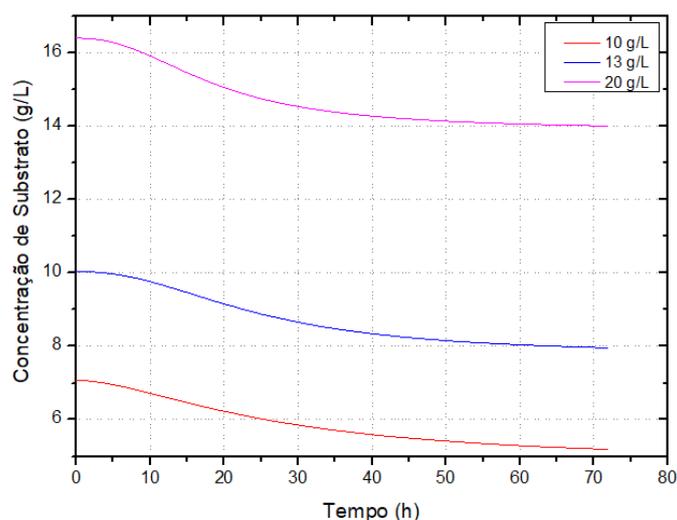
A Tabela 18 mostra o tempo em que ocorre o ponto de inflexão da curva da concentração de substrato, representada também na Figura 16. Pode-se verificar o momento em que ocorre a maior taxa de consumo de substrato pelos microrganismos durante os ensaios. Observou-se ainda que o aumento da

concentração de BC no reator fez com que o ponto de inflexão ocorresse em um tempo mais longo. Ao comparar esses dados com os pontos de inflexão encontrados para as atividades enzimáticas, verifica-se que o tempo de consumo máximo de celulose ocorre antes do processo de produção e secreção das enzimas. Após o ponto de inflexão ocorre a mudança de curvatura e, conseqüentemente, a diminuição da taxa de consumo de celulose.

Tabela 18 - Estimativa do ponto de inflexão para concentração de substrato.

Ensaio	Tempo (h)	Substrato (g/L)
10 g/L	11,82	6,63
13 g/L	18,73	8,82
20 g/L	14,23	15,70

Figura 16 - Respostas do modelo MMF para concentração de substrato com parâmetros otimizados.



Fonte: O autor.

#### 4.4 MODELOS GAUSSIANOS

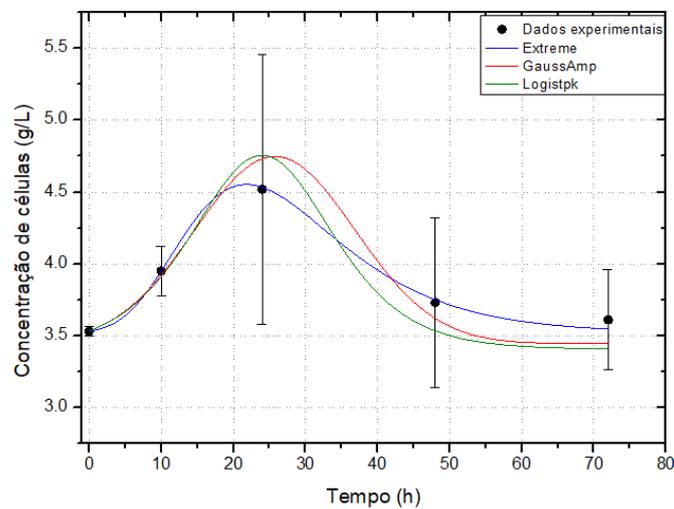
Os modelos sigmoides não são capazes de descrever o crescimento de células e o consumo de oxigênio nas fermentações, visto que essas variáveis são funções crescentes em um intervalo de variação do tempo e decrescentes num outro intervalo. Portanto, foi necessário identificar modelos que apresentassem essas características. As funções gaussianas foram avaliadas para prever as variáveis

estudadas, entretanto, essas são funções simétricas, e não são suficientes para descrever os dados experimentais. Dessa forma, a partir da função gaussiana foi possível encontrar modelos com características exponenciais similares, os quais foram *Extreme*, *GaussAmp* e *Logistpk*.

#### 4.4.1 Ajuste não-linear para concentração de células

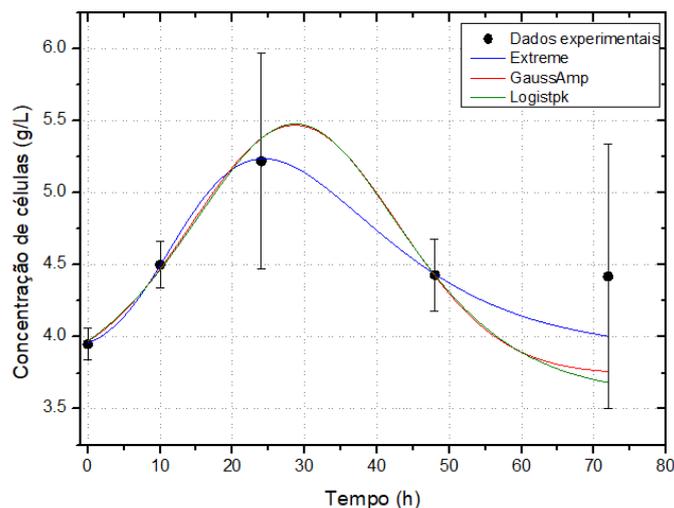
Os modelos apresentados na Tabela 2 foram investigados quanto à capacidade de prever a concentração de células no reator em função do tempo de fermentação. As Figuras 17, 18 e 19 apresentam os resultados obtidos para os ensaios de 10, 13 e 20 g/L, respectivamente.

Figura 17 - Ajuste não-linear para concentração de células no ensaio contendo 10 g/L de BC.



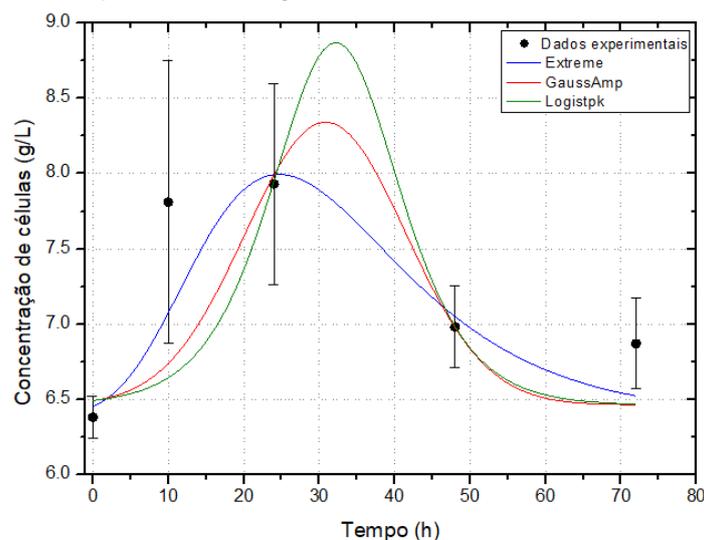
Fonte: O autor.

Figura 18 - Ajuste não-linear para concentração de células no ensaio contendo 13 g/L de BC.



Fonte: O autor.

Figura 19 - Ajuste não-linear para concentração de células no ensaio contendo 20 g/L de BC.



Fonte: O autor.

As Tabelas 19, 20 e 21 resumem os valores de parâmetros estimados, bem como a qualidade dos ajustes dos modelos. O modelo selecionado foi o *Extreme*, visto que, apesar de não ter obtido ajuste satisfatório nos três casos, pois os  $R^2$  adj. para a concentração de BC de 20 g/L foi menor do que 0,90, foi o que melhor representou a maioria dos ensaios. A Tabela 22 resume os valores de parâmetros encontrados para este modelo em cada ensaio.

Tabela 19 - Resultado dos modelos não-lineares para células no ensaio contendo 10 g/L de BC.

Função	Parâmetros	SSE	RMSE	$R^2$	$R^2$ adj.
<i>Extreme</i>	$A = 1,0 \pm 0,2$ $y_0 = 3,52 \pm 0,02$ $W = 10,9 \pm 2,3$ $X_c = 21,8 \pm 1,9$	0,0354	0,1881	0,9950	0,9802
<i>GaussAmp</i>	$A = 1,3 \pm 0,5$ $y_0 = 3,4 \pm 0,1$ $W = 11,1 \pm 4,2$ $X_c = 25,8 \pm 5,0$	0,3472	0,5892	0,9513	0,8053
<i>Logistpk</i>	$A = 1,4 \pm 0,4$ $y_0 = 3,4 \pm 0,1$ $W = 6,5 \pm 1,9$ $X_c = 24 \pm 0$	0,5772	0,5372	0,9191	0,8382

Tabela 20 – Resultado dos modelos não-lineares para células no ensaio contendo 13 g/L de BC.

Função	Parâmetros	SQE	RMSE	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> adj.
<i>Extreme</i>	A=1,3±0,3 y <sub>0</sub> =3,9±0,1 w=13,6±3,4 X <sub>c</sub> =24,3±1,6	0,2068	0,4547	0,9818	0,9272
<i>GaussAmp</i>	A=1,7±0,5 y <sub>0</sub> =3,7±0,4 w=14,2±5,2 X <sub>c</sub> =28,6±1,8	0,6205	0,7877	0,9454	0,7815
<i>Logistpk</i>	A=1,9±0,4 y <sub>0</sub> =3,6±0,1 w=10±0 X <sub>c</sub> =28,7±1,4	0,7754	0,6226	0,9317	0,8635

Tabela 21 – Resultado dos modelos não-lineares para células no ensaio contendo 20 g/L de BC.

Função	Parâmetros	SQE	RMSE	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> adj.
<i>Extreme</i>	A = 1,6±0,9 y <sub>0</sub> = 6,4±0,6 W = 13,7±11,9 X <sub>c</sub> = 24,7±7,8	2,2849	1,5116	0,7891	0,1565
<i>GaussAmp</i>	A = 1,9±2,7 y <sub>0</sub> = 6,5±0,4 W = 10,6±15,6 X <sub>c</sub> = 30,8±12,9	3,7683	1,9412	0,6522	-0,3911
<i>Logistpk</i>	A = 2,4±10,7 y <sub>0</sub> = 6,5±0,6 W = 5,7±18,2 X <sub>c</sub> = 32±17	3,9763	1,9941	0,6330	-0,4678

A Tabela 22 apresenta os valores de parâmetros estimados para concentração de células usando o modelo *Extreme*.

Tabela 22 - Parâmetros estimados para o modelo *Extreme* na predição da concentração de células.

Ensaio	$A$	$\gamma_0$	$w$	$x_c$
10 g/L	1,03	3,52	10,88	21,82
13 g/L	1,34	3,90	13,65	24,32
20 g/L	1,60	6,39	13,68	24,67

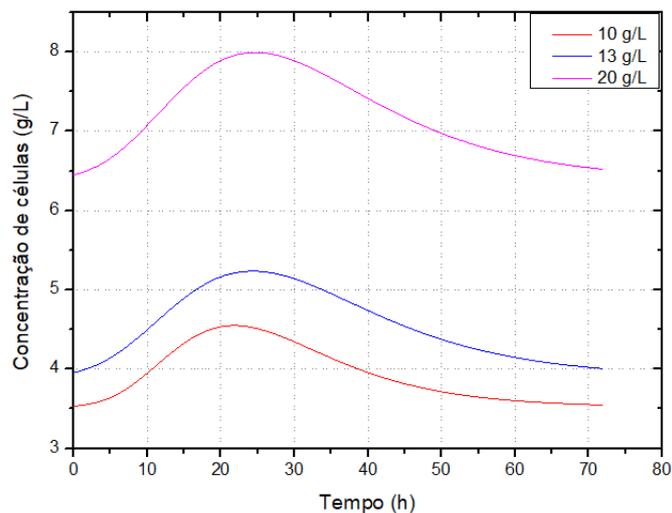
A Tabela 23 mostra o tempo em que ocorreu o maior pico de crescimento celular, representada também na Figura 20. Na figura 20 pode-se observar que as concentrações iniciais apresentam-se diferentes em cada fermentação, no entanto, para todos os ensaios foi adicionada a mesma quantidade inicial de microrganismo. Este fato está relacionado com o uso de métodos indiretos para determinar a concentração celular, os quais podem acarretar em alguns erros experimentais, pois levam em consideração outras substâncias presentes nos meios além das células, conforme explicado no item 4.1, portanto quanto maior a concentração de bagaço de cana utilizado, maior será a concentração de células no meio. Entretanto, esse erro experimental é computado para todas as amostras retiradas ao longo do tempo.

Realizando uma análise no intervalo de tempo de 0 a 24 horas, observa-se que o ensaio de 20 g/L obteve um crescimento celular superior, apresentando um aumento de 1,6 g/L. Já nas fermentações de 10 e 13 g/L o crescimento foi de 1,0 e 1,3 g/L, respectivamente. Pode-se verificar que todas as fermentações obtiveram máximo crescimento no tempo de 24 horas.

Tabela 23 - Estimativa do ponto de máximo para concentração de células.

Ensaio	Tempo (h)	Células (g/L)
10 g/L	21,82	4,55
13 g/L	24,32	5,24
20 g/L	24,67	7,99

Figura 20 - Respostas do modelo *Extreme* para concentração de células o com parâmetros otimizados.

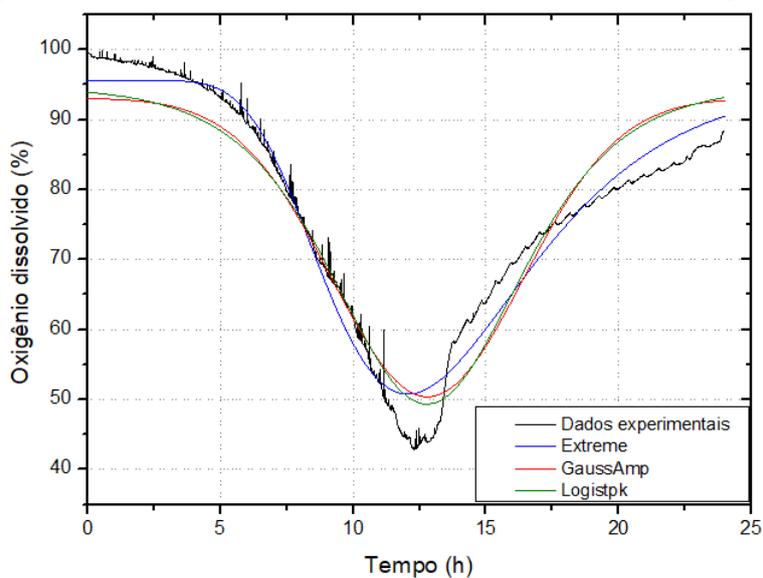


Fonte: O autor.

#### 4.4.2 Ajuste não-linear para concentração de oxigênio dissolvido

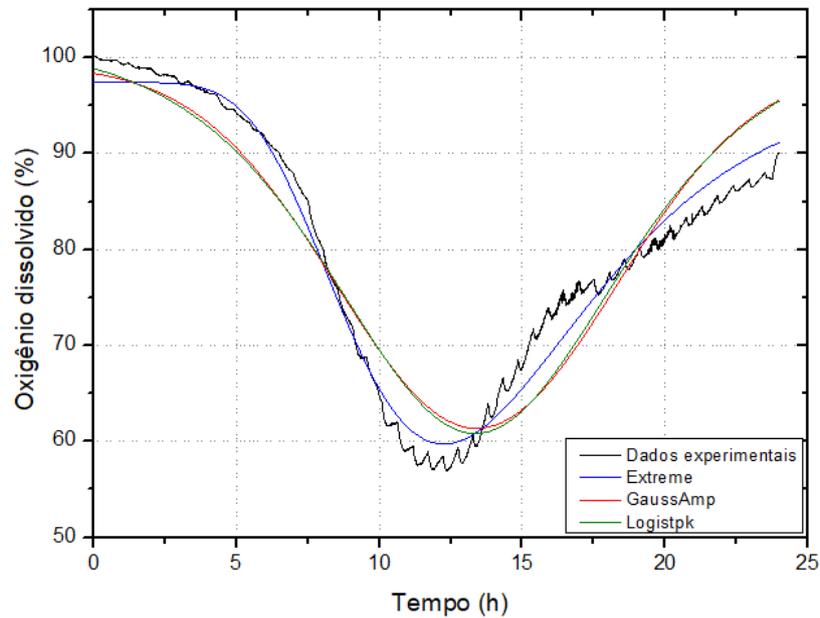
Os modelos da Tabela 2 também foram avaliados quanto a capacidade de prever o consumo de oxigênio nos ensaios contendo 10, 13 e 20 g/L de BC. As Figuras 21, 22 e 23 apresentam esses resultados, respectivamente. Todos os modelos foram capazes de prever os dados experimentais.

Figura 21 - Ajuste não-linear para concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo utilizando as equações *Extreme*, *GaussAmp* e *Logistpk* no ensaio contendo 10 g/L de BC.



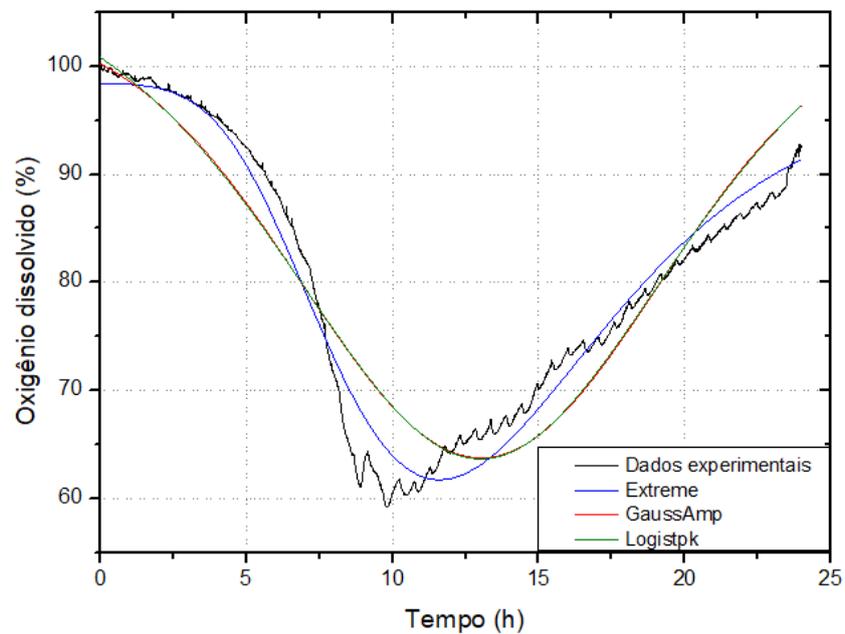
Fonte: O autor.

Figura 22 - Ajuste não-linear para concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo utilizando as equações *Extreme*, *GaussAmp* e *Logistpk* no ensaio contendo 13 g/L de BC.



Fonte: O autor.

Figura 23 - Ajuste não-linear para concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo utilizando as equações *Extreme*, *GaussAmp* e *Logistpk* no ensaio contendo 20 g/L de BC.



Fonte: O autor.

As Tabelas 24, 25 e 26 exibem os valores de parâmetros estimados para cada modelo. O modelo *Extreme* apresentou maior coeficiente de determinação em todos os casos. A Tabela 27 resume os valores de parâmetros estimados para esse modelo em cada caso.

Tabela 24 - Modelos não-lineares para oxigênio dissolvido no ensaio contendo 10 g/L de BC.

Função	Parâmetros	SQE	RMSE	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> adj,
<i>Extreme</i>	A = -44,9±0,1 y <sub>0</sub> = 95,63±0,07 W = 3,82±0,01 X <sub>c</sub> = 12,05±0,008	84271,44	3,1238	0,9616	0,9616
<i>GaussAmp</i>	A = -42,7±0,2 y <sub>0</sub> = 93,1±0,1 W = 3,60±0,02 X <sub>c</sub> = 12,80±0,01	228958,94	5,1490	0,8958	0,8958
<i>Logistpk</i>	A = -45,4±0,1 y <sub>0</sub> = 95±0 W = 2,370±0,009 X <sub>c</sub> = 12,78±0,01	213606,52	4,9731	0,9028	0,9028

Tabela 25 - Modelos não-lineares para oxigênio dissolvido no ensaio contendo 13 g/L de BC.

Função	Parâmetros	SQE	RMSE	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> adj,
<i>Extreme</i>	A = -37,73±0,06 y <sub>0</sub> = 97,45±0,05 W = 4,30±0,01 X <sub>c</sub> = 12,26±0,006	34053,78	1,9858	0,9775	0,9775
<i>GaussAmp</i>	A = -37,9±0,2 y <sub>0</sub> = 99,3±0,2 W = 4,90±0,03 X <sub>c</sub> = 13,41±0,01	156035,84	4,2507	0,8968	0,8968
<i>Logistpk</i>	A = -41,0±0,2 y <sub>0</sub> = 101,9±0,2 W = 3,36±0,02 X <sub>c</sub> = 13,35±0,01	152752,73	4,2057	0,8990	0,8989

Tabela 26 - Modelos não-lineares para oxigênio dissolvido no ensaio contendo 20 g/L de BC.

Função	Parâmetros	SQE	RMSE	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> adj,
<i>Extreme</i>	A = -36,75±0,07 y <sub>0</sub> = 98,45±0,07 W = 4,81±0,01 X <sub>c</sub> = 11,610±0,008	39176,84	2,1299	0,9707	0,9707
<i>GaussAmp</i>	A = -40,6±0,3 y <sub>0</sub> = 104,4±0,3 W = 6,08±0,05 X <sub>c</sub> = 13,03±0,01	151071,33	4,1825	0,8871	0,8871
<i>Logistpk</i>	A = -46,4±0,4 y <sub>0</sub> = 110,0±0,5 W = 4,49±0,05 X <sub>c</sub> = 13,02±0,01	152187,97	4,1979	0,8863	0,8863

A Tabela 27 apresenta os parâmetros estimados para consumo de oxigênio usando o modelo *Extreme*.

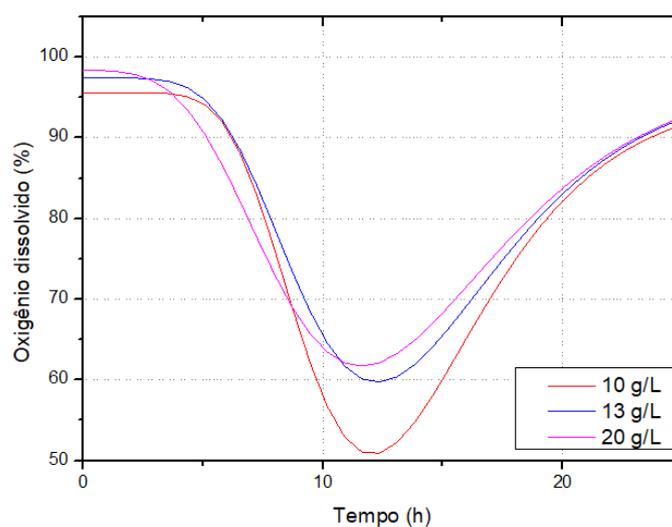
Tabela 27 - Parâmetros estimados para o modelo *Extreme* na predição do consumo de oxigênio.

Ensaio	A	y <sub>0</sub>	w	x <sub>c</sub>
10 g/L	-44,9	95,6	3,8	12,0
13 g/L	-37,7	97,4	4,3	12,3
20 g/L	-36,8	98,4	4,8	11,6

A Tabela 28 mostra o tempo em que ocorreu o maior consumo de oxigênio pelos microrganismos, representada também na Figura 24. Pode-se notar que o aumento da concentração de BC no reator não afetou o momento no qual ocorreu o ponto mínimo da curva, embora para o caso de 20 g/L o consumo de oxigênio tenha ocorrido num tempo ligeiramente menor. O intervalo em que ocorreu o maior consumo de oxigênio (10 a 20 horas) coincide com o intervalo de maior crescimento celular, como observado no item 4.4.1.

Tabela 28 - Estimativa do ponto de mínimo para concentração de oxigênio.

Ensaio	Tempo (h)	Oxigênio (%)
10 g/L	12,05	50,76
13 g/L	12,26	59,72
20 g/L	11,61	61,71

Figura 24 - Respostas do modelo *Extreme* para oxigênio dissolvido com parâmetros otimizados.

Fonte: O autor.

#### 4.5 VALIDAÇÃO DO MODELO EMPÍRICO

Para a validação do modelo empírico foram utilizados os dados obtidos para o ensaio de 15 g/L de bagaço de cana. Estes dados não foram utilizados nos procedimentos de estimação de parâmetros para evitar o “crime inverso”. Para realizar a validação foram desenvolvidos modelos utilizando os pontos médios das curvas dos ensaios de 10, 13 e 20 g/L para atividade enzimática, concentração de células, concentração de substrato e concentração de oxigênio. As Tabelas 29, 30, 31 e 32 mostram os parâmetros encontrados nos valores médios.

Tabela 29 - Valores médios dos parâmetros a serem utilizados para prever a atividade enzimática em ensaios contendo 15 g/L de BC.

Ensaio	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$
10 g/L	347,9	19,9	4872,2	2,3
13 g/L	270,9	48,0	$3,6 \times 10^6$	4,5
20 g/L	292,7	32,4	$2,0 \times 10^6$	4,9
Curva Média	290,3	28,6	110485,7	3,7

Tabela 30 - Valores médios dos parâmetros a serem utilizados para prever a concentração de celulose em ensaios contendo 15 g/L de BC.

Ensaio	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$
10 g/L	4,8	7,1	246,6	1,7
13 g/L	7,8	10,0	1153,6	2,2
20 g/L	13,9	16,4	801,9	2,3
Curva Média	9,4	11,8	1601,5	2,5

Tabela 31 - Valores médios dos parâmetros a serem utilizados para prever a concentração de células em ensaios contendo 15 g/L de BC.

Ensaio	$A$	$y_0$	$w$	$x_c$
10 g/L	1,0	3,5	10,9	21,8
13 g/L	1,3	3,9	13,6	24,3
20 g/L	1,6	6,4	13,7	24,7
Curva Média	1,4	4,9	10,7	20,8

Tabela 32 - Valores médios dos parâmetros a serem utilizados para prever o consumo de oxigênio em ensaios contendo 15 g/L de BC.

Ensaio	A	$y_0$	w	$x_c$
10 g/L	-44,9	95,6	3,8	12,1
13 g/L	-37,7	97,4	4,3	12,3
20 g/L	-36,8	98,4	4,8	11,6
Curva Média	-36,9	93,7	3,8	11,8

Os modelos para descrever as variáveis de interesse para o caso de 15 g/L de BC, utilizando os dados médios apresentados, são apresentadas na forma das Equações 24, 25, 26 e 27.

$$\text{Atividade} = \frac{3158787,31 + 290,27 \cdot t^{3,74}}{110485,74 + t^{3,74}} \quad (24)$$

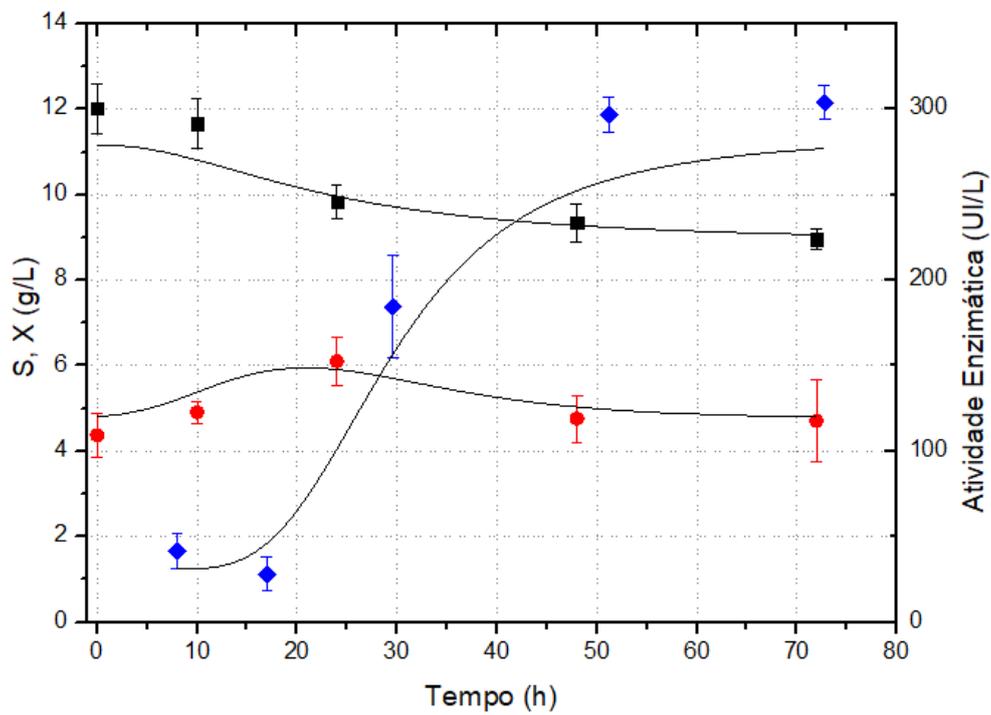
$$\text{Celulose} = \frac{18961,52 + 9,36 \cdot t^{2,49}}{1601,48 + t^{2,49}} \quad (25)$$

$$\text{Células} = 4,89 + 1,36 * e \left\{ -e \left[ -\left( \frac{t-20,82}{10,69} \right) \right] - \left( \frac{t-20,82}{10,69} \right) + 1 \right\} \quad (26)$$

$$\text{Oxigênio} = 93,73 + (-36,97) * e \left\{ -e \left[ -\left( \frac{t-11,80}{3,79} \right) \right] - \left( \frac{t-11,80}{3,79} \right) + 1 \right\} \quad (27)$$

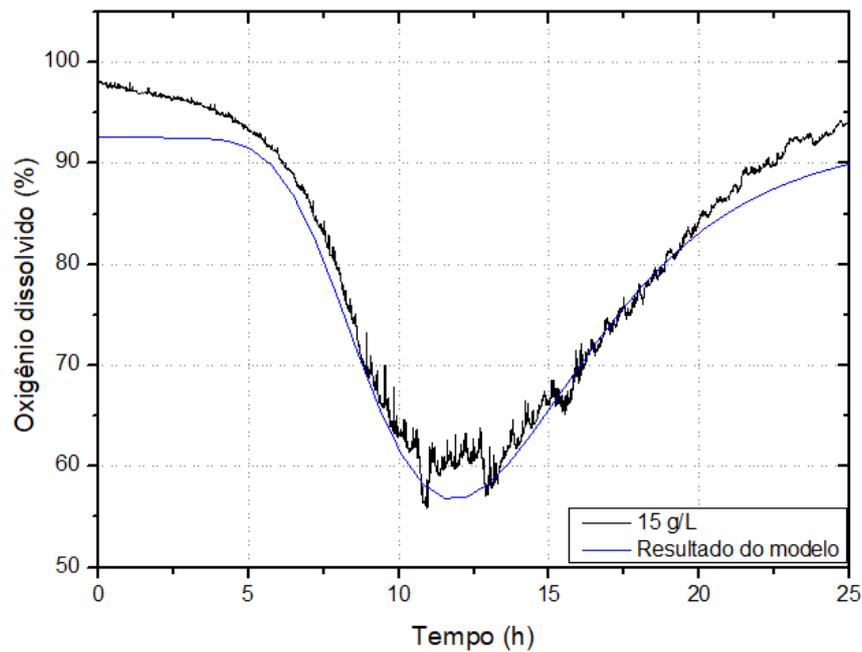
As Figuras 25 e 26 apresentam os resultados da simulação realizada a partir das equações descritas anteriormente juntamente com os dados experimentais para o ensaio de 15 g/L.

Figura 25 - Variação da concentração de substrato (■), concentração de células (●) e atividade enzimática (◆) e o resultado do modelo (-) em função do tempo para o ensaio de 15 g/L.



Fonte: O autor.

Figura 26 - Variação da concentração de oxigênio (-) e o resultado do modelo (-) em função do tempo para o ensaio de 15 g/L.



Fonte: O autor.

A qualidade de predição dos modelos matemáticos foi caracterizada usando o desvio padrão residual (RSD), Equação 28 e 29, que forneceu uma indicação de precisão dos modelos (ATALA et al., 2001; BERTO et al., 2011).

$$RSD = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{pi})^2}}{n} \quad (28)$$

$$RSD(\%) = \frac{RSD}{\bar{y}_i} \cdot 100 \quad (29)$$

Em que  $y_i$  e  $y_{pi}$  correspondem aos dados experimentais e os valores preditos pelo modelo respectivamente,  $n$  é o número de pontos experimentais e  $\bar{y}_i$  é a média dos valores experimentais. De acordo com Atala et al. (2001), valores de RSD (%) menores que 10 % são aceitáveis para processos biotecnológicos. O resultado encontrado do desvio padrão residual para cada fermentação está apresentado na Tabela 33.

Tabela 33 - Desvio padrão residual (RSD) para as fermentações realizadas em comparação com o modelo encontrado.

Ensaio	RSD (%)			
	Atividade	Substrato	Células	Oxigênio
10 g/L	6,56	28,67	15,34	0,05
13 g/L	5,33	5,37	6,91	0,02
15 g/L	6,79	2,31	2,89	0,03
20 g/L	8,56	14,86	12,54	0,04

Como verificado na Tabela 33, tanto o modelo para atividade enzimática quanto para concentração de oxigênio, foram capazes de descrever todos os ensaios com diferentes concentrações de BC, visto que apresentaram RSD menores do que 10%. Entretanto, os modelos desenvolvidos para substrato e células não foram eficazes para prever concentrações muito elevadas ou muito baixas, como no caso das fermentações de 10 e 20 g/L.

Apesar de ter apresentado resultados significativos, vale ressaltar a dificuldade obtida para a realização da modelagem matemática neste trabalho, já que a utilização de concentrações muito diferentes de BC fez com que fossem geradas curvas com características semelhantes, porém com valores muito distintos nas

fermentações. Por esse motivo, optou-se por utilizar a curva média dos ensaios para a modelagem.

Como descrito por Thilakavathi, Basak e Panda (2007) a modelagem de sistemas que utilizam seres vivos em sua composição é difícil devido à complexidade dos mesmos, assim os resultados experimentais podem conter incertezas provenientes de erros nos experimentos. Além disso, a presença de sólidos nos meios de cultivo dificultou a determinação de substrato e células nos ensaios, visto que foi necessário utilizar métodos indiretos de quantificação, contribuindo para o aumento de erros experimentais. Esses fatores podem ter contribuído para que a modelagem não fosse eficiente para todas as variáveis estudadas.

## 5 CONCLUSÃO

O bagaço da cana-de-açúcar mostrou-se eficiente como fonte de carbono para produção de celulases com o fungo *Aspergillus niger*, sem a necessidade de adição de outras fontes de carbono ao meio. Dentre as concentrações testadas, 15 g/L apresentou melhor produção enzimática (304 UI/L). Ainda, foi possível estimar a concentração celular em meio de cultivo com a presença de substrato sólido.

O modelo sigmoide MMF foi capaz de representar a produção enzimática e concentração de celulose. Foi observado que as maiores taxas de consumo de substrato ocorreram em tempos menores ( $t_{\text{médio}} = 14,93$  h) do que os tempos de maiores taxas de produção enzimática ( $t_{\text{médio}} = 24,46$  h), indicando que inicialmente ocorre um crescimento do microrganismo e após a secreção da enzima.

O modelo *Extreme* foi o que melhor representou a concentração de células e o consumo de oxigênio com o tempo. Na análise da concentração de células o ensaio de 20 g/L de bagaço de cana obteve um crescimento celular superior, apresentando um aumento de 1,6 g/L. Na concentração de oxigênio dissolvido, o intervalo em que ocorreu o maior consumo foi entre 10 e 20 horas e coincidiu com o intervalo de maior crescimento celular.

Os modelos representaram satisfatoriamente os dados experimentais no intervalo de concentrações de BC analisado com um ajuste eficaz para a maioria dos ensaios. A falta de ajuste de alguns dados pode ser resultado da utilização de métodos indiretos na determinação da concentração de células e de substrato.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com o intuito de dar continuidade a essa pesquisa, seguem algumas sugestões para futuras investigações:

- Realizar melhorias nos métodos de quantificação indireta de celulose e crescimento celular, visando a diminuição dos erros experimentais;
- Verificar a influência do uso de novas concentrações de Bagaço da cana-de-açúcar no meio fermentativo, ou ainda, o uso de outras fontes de carbono buscando maximizar a produção das enzimas;
- Aprimorar os modelos matemáticos deste trabalho para que se ajustem melhor aos dados experimentais;
- Realizar um estudo aprofundado dos parâmetros utilizados nos modelos propostos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAV, S. S. et al. Label free quantitative proteomic analysis of secretome by Thermobifida fusca on different lignocellulosic biomass. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 12, p. 3694–3706, 2012.

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 18, n. 1, p. 57–70, 2000.

AHAMED, A.; VERMETTE, P. Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, p. 41–46, 2008.

ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010.

ATALA, D. I. P. et al. Kinetics of Ethanol Fermentation with High Biomass Concentration Considering the effect of Temperature. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91, p. 353–365, 2001.

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 5, p. 551–573, 2008.

BEM, C. M. DE. **Modelos de crescimento na cultura de crotalaria juncea**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Maria, 2017.

BERTO, M. I. et al. Perfil de deformação de embalagens em função da variação da pressão efetiva. **Brazilian Journal of food technology**, v. 14, n. 4, p. 325–331, 2011.

BOIN, C.; NARDON, R. F.; LEME, P. R. Estudo da Curva de Crescimento de Animais da Raça Guzerá e seus Cruzamentos Alimentados a Pasto , com e sem

Suplementação . 1 . Análise e Seleção das Funções Não-Lineares. **Revista brasileira zootecnia**, v. 29, n. 2, p. 630–637, 2000.

CUNHA, F. M. et al. Indirect Method for Quantification of Cellular Biomass in a Solids containing Medium Used as Pre-culture for Cellulase Production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 108, p. 100–108, 2012.

CUNHA, F. M. et al. On-Site Production of Enzymatic Cocktails Using a Non-conventional Fermentation Method with Agro-Industrial Residues as Renewable Feedstocks. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, n. 2, p. 517–526, 2017.

DELABONA, S. et al. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. **Industrial Crops & Products**, v. 42, p. 236–242, 2013.

DEVORE, J. L. **Probabilidade e Estatística: para Engenharia e Ciências**. 6. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2006.

DHILLON, G. S. et al. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 1160–1167, 2011.

DIAS, M. O. S. et al. Improving bioethanol production - Comparison between extractive and low temperature fermentation. **Applied Energy**, v. 98, p. 548–555, 2012.

DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. London: Academic, 1995.

EDGAR, T. F.; HIMMELBLAU, D. M. **Optimization of chemical processes**. 2<sup>o</sup> ed. New York: McGraw-Hill chemical engineering series, 2001.

FARHAN, A. et al. Protein Expression and Purification Functional characterisation of cellobiohydrolase I ( Cbh1 ) from *Trichoderma virens* UKM1 expressed in *Aspergillus niger*. **Protein Expression and Purification**, v. 154, n. May 2018, p. 52–61, 2019.

FARINAS, C. S. et al. Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on endoglucanase production using an instrumented bioreactor. **Industrial Crops & Products**, v. 34, n. 1, p. 1186–1192, 2011.

FERNANDEZ, L. E. O. **Método Genérico para Estimação e Modelagem do Erro RMS em Dados de Profundidade de Sensores para Visão 3D**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017.

FITZHUGH, H. A. J. Analysis of growth curves and strategies for altering their shape. **Journal of animal science**, v. 42, n. 4, 1976.

FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Soybean protein as a cost-effective lignin-blocking additive for the saccharification of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 172–180, 2016.

FLORENTINO, H. O.; BISCARO, A. F. V.; PASSOS, J. R. S. FUNÇÕES SIGMOIDAIS APLICADAS NA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE METANOGÊNICA ESPECÍFICA -AME. **Revista brasileira Biomassa**, v. 28, n. 1, p. 141–150, 2010.

GÁMEZ, S. et al. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v. 74, n. 1, p. 78–88, 2006.

GARCIA-KIRCHNER, O.; SEGURA-GRANADOS, M.; RODRIGUEZ-PASCUAL, P. Effect of Media Composition and Growth Conditions on Production of  $\beta$ -Glucosidase by *Aspergillus niger* C-6. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, p. 347–359, 2005.

GELAIN, L. **Modelagem matemática da produção de enzimas utilizando *Trichoderma harzianum* em meio submerso e bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2014.

GELAIN, L.; GERALDO, J.; CARVALHO, A. Mathematical modeling of enzyme production using *Trichoderma harzianum* P49P11 and sugarcane bagasse as carbon source. **Bioresource Technology**, v. 198, p. 101–107, 2015.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.

GÓMEZ SÁNCHEZ, C. E.; MARTÍNEZ-TRUJILLO, A.; AGUILAR OSORIO, G. Oxygen transfer coefficient and the kinetic parameters of exo-polygalacturonase production by *Aspergillus flavipes* FP-500 in shake flasks and bioreactor. **Letters in Applied Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 444–452, 2012.

HANSEN, G. H. et al. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 9, p. 1327–1341, 2015.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 10–18, 2009.

JAMPALA, P. et al. Concurrent production of cellulase and xylanase from *Trichoderma reesei* NCIM 1186: enhancement of production by desirability-based multi-objective method. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

KARP, S. G. et al. Pretreatment strategies for delignification of sugarcane bagasse: A Review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 4, p. 679–689, 2013.

KOUTINAS, A. A.; WANG, R.; WEBB, C. Estimation of fungal growth in complex, heterogeneous culture. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, n. 2, p. 93–100, 2003.

KUHAD, R. C. et al. Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 249–272, 2016.

KUMAR, S.; SHARMA, H. K.; SARKAR, B. C. Effect of Substrate and Fermentation Conditions on Pectinase and Cellulase Production by *Aspergillus niger* NCIM 548 in Submerged ( SmF ) and Solid State Fermentation ( SSF ). **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 1289–1298, 2011.

LI, S.; TANG, B.; XU, Z. Fermentation Optimization and Unstructured Kinetic Model for Cellulase Production by *Rhizopus stolonifer* var. *reflexus* TP-02 on Agriculture By-Products. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 177, n. 8, p. 1589–1606, 2015.

LONGHI, D. A. **AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PREDITIVA DE DIFERENTES MODELOS MATEMÁTICOS PARA O CRESCIMENTO MICROBIANO EM CONDIÇÕES NÃO-ISOTÉRMICAS**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

LORENCI, L. R. C. G. **Produção e pré-purificação da enzima lacase e sua utilização na polpação enzimática dos resíduos da palma**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2016.

LUCENA, L. R. R. et al. Ajuste de modelos de regressão lineares, não lineares e sigmoidal no ganho de peso simulado de frangos de corte. **Agrarian academy**, v. 4, n. 8, p. 34–45, 2017.

MAKI, M.; LEUNG, K. T.; QIN, W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 5, p. 500–516, 2010.

MANDELS, M.; WEBER, J. The Production of Cellulases. **Advances in Chemistry**, v. 95, p. 391–414, 1969.

MATTOS, T. DO B. **Modelos Não Lineares e suas Aplicações**. [s.l.] Universidade Federal de Juiz de fora, 2013.

MAURYA, D. P.; SINGLA, A.; NEGI, S. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. **3 Biotech**, v. 5, n. 5, p. 597–609, 2015.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 522–550, 2012.

MONTGOMERY, D. C. **Introduction to Statistical Quality Control**. 6<sup>o</sup> ed. Danvers: John Wiley & Sons, 2009.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.

MRUDULA, S.; MURUGAMMAL, R. Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1119–1127, 2011.

NAIK, S. N. et al. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 578–597, 2010.

OLIVEIRA, S. D. et al. Utilization of agroindustrial residues for producing cellulases by *Aspergillus fumigatus* on Semi-Solid Fermentation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 1, p. 937–944, 2018.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69–80, 2000.

PIEGORSCH, W. W.; BAILER, A. J. **Analyzing Environmental Data**. Chichester: John Wiley & Sons, 2005.

RABELO, S. C. et al. Production of bioethanol , methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 7887–7895, 2011.

RESÉNDIZ-MUÑOZ, J. et al. Mathematical model of Boltzmann ' s sigmoidal equation applicable to the set-up of the RF-magnetron co-sputtering in thin films deposition of  $BaxSr_{1-x}TiO_3$ . **Bulletin of Materials Science**, v. 40, n. 5, p. 1043–1047, 2017.

SALOMÃO, G. S. B. **Análise da produção de celulases por fungos utilizando bagaço de cana como substrato.** [s.l.] Universidade Federal do Espírito Santo, 2017.

SAMOHYL, R. W. **Controle Estatístico de Qualidade.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

SÁNCHEZ, Ó. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270–5295, 2008.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. Volume 2.** 1<sup>o</sup> ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001.

SCHWAAB, M.; PINTO, J. C. **Análise de Dados Experimentais I: Fundamentos de Estatística e Estimação de Parâmetros.** Rio de Janeiro: E-papers, 2007.

SEBER, G. A. F.; WILD, C. J. **Nonlinear Regression.** [s.l.] John Wiley & Sons, 2003.

SHAHRIARINOUR, M. et al. Kinetics of cellulase production by *Aspergillus terreus* at various levels of dissolved oxygen tension in a stirred tank bioreactor. **Bioresources**, v. 6, n. 4, p. 4909–4921, 2011.

SILVA, C. DE O. G.; FERREIRA, E. X. A Review of Holocellulase Production Using Pretreated Lignocellulosic Substrates. **Bioenergy Research**, v. 10, p. 592–602, 2017.

SILVA, M. R. **Modelos estatísticos empregados para descrição do crescimento de codornas de corte.** [s.l.] Universidade Federal do Mato Grosso, 2015.

SILVA, V. S.; ALMEIDA GARCIA, C.; SILVA, C. M. O destino do bagaço da cana-de-açúcar: um estudo a partir das agroindústrias sucroalcooleiras do Paraná. **Revista em Agronegocio e Meio Ambiente**, v. 3, n. 1, p. 59–76, 2010.

SILVEIRA, S. DE C. **Modelagem não linear com erros correlacionados da frequência cardíaca com cargas crescentes de trabalho**. [s.l.] Universidade Federal de Lavras, 2013.

SILVEIRA, S. DE C. et al. Modelos não lineares ajustados à produção acumulada de biogás provenientes de camas sobrepostas de suínos. **Revista Agrogeoambiental**, v. 10, n. 3, p. 91–104, 2018.

SIMS, R. E. H. et al. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1570–1580, 2010.

SUKUMARAN, R. K. et al. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 34, n. 2, p. 421–424, 2009.

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

THILAKAVATHI, M.; BASAK, T.; PANDA, T. Modeling of enzyme production kinetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 5, p. 991–1007, 2007.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12<sup>o</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

UEDA, M. C. **Modelos não lineares com diferentes estruturas de covariância em curvas de crescimento: uma aplicação no estudo da severidade da doença Late blight**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

VAN DYK, J. S.; PLETSCHE, B. I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes-Factors

affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1458–1480, 2012.

VASCONCELLOS, V. M. et al. Production efficiency versus thermostability of (hemi) cellulolytic enzymatic cocktails from different cultivation systems. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1701–1709, 2015.

WRIGHT, J. O. H. N. D.; WYMAN, C. E.; GROHMANN, K. Simultaneous Saccharification and Fermentation of Lignocellulose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 75–90, 1988.

ZHANG, Y. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement : Screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 452–481, 2006.

ZHOU, T. et al. Vibrational Spectroscopy An insight into the sequential order in 2D correlation spectroscopy using polymer transitions : Boltzmann Sigmoid , Gaussian Cumulative , Lorentz Cumulative , and Asymmetric Sigmoid . Findings in experiments and simulations. **Vibrational Spectroscopy**, v. 70, p. 137–161, 2014.

## APÊNDICE A

Figura 27 - Correlação linear entre células e oxigênio para as fermentações de 10, 13, 15 e 20 g/L.

