



PROGRAMA EQ-ANP

**Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria
do Petróleo e Gás Natural**



**Modelagem da Produção Contínua de Etanol
por *Zymomonas mobilis***

Bruna Cristina Oliveira

Projeto de Final de Curso

Orientadores

Prof. Maurício Bezerra de Souza Júnior, D.Sc.

Prof. Argimiro Resende Secchi, D.Sc.

Março de 2014

MODELAGEM DA PRODUÇÃO CONTÍNUA DE ETANOL
POR *Zymomonas mobilis*
Bruna Cristina Oliveira

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente do Programa Escola de Química/Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria de Petróleo e Gás Natural, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Engenharia de Bioprocessos com ênfase na área de Petróleo e Gás Natural – Biocombustíveis.

Aprovado por:

Prof^ª.Andrea Valdman, D.Sc.

Prof^ª. Andrea Medeiros Salgado, D.Sc.

Elizabeth Ferreira da Fonseca, D.Sc.

Orientado por:

Prof. Maurício Bezerra de Souza Júnior, D.Sc.

Prof. Argimiro Resende Secchi, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Março de 2014

Ficha Catalográfica.

Bruna, Bruna Cristina

Modelagem da Produção Contínua de Etanol por *Zymomonas mobilis*/ Bruna Cristina Oliveira

Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2014.

vii, 122 p.; il.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2014. Orientadores: Maurício Bezerra de Souza Júnior e Argimiro Resende Secchi.

1. Fermentador. 2. Estimação de parâmetros. 3. Monografia. (Graduação – UFRJ/EQ).
4. Maurício Bezerra de Souza Júnior e Argimiro Resende Secchi I. Título.

Resumo do Projeto Final apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenharia de Bioprocessos com ênfase na área de Petróleo e Gás Natural – Biocombustíveis.

MODELAGEM DA PRODUÇÃO CONTÍNUA DE ETANOL POR *Zymomonas mobilis*

Bruna Cristina Oliveira

Março, 2014

Orientadores: Prof. Maurício Bezerra de Souza Júnior, D.Sc.

Prof. Argimiro Resende Secchi, D.Sc.

Resultados experimentais apresentados na literatura indicam que a fermentação contínua para produção de etanol a partir de glicose por *Zymomonas mobilis* pode exibir comportamento complexo. O conhecimento desse comportamento é importante para estabelecer estratégias de controle e otimização do processo.

No presente trabalho dois modelos matemáticos propostos por Daugulis *et al* (1997) e Jöbses *et al* (1985) foram implementados no simulador EMSO (*Environment for Modeling, Simulation and Optimization*) para simulação dinâmica da fermentação contínua e comparados dados experimentais de Camelo (2009). Concluiu-se que o modelo proposto por Jöbses *et al* (1985), necessita de alguns ajustes para descrição do comportamento oscilatório característico deste processo pois apresentou dificuldades na descrição do mesmo. Já o modelo proposto por Daugulis *et al* (1997) obteve mais sucesso na simulação do mesmo. Para adequação de ambos os modelos, foram propostas modificações nas suas estruturas. Contudo os resultados não foram satisfatórios para fermentações com concentração de substrato maior que 200g/L.

Nome do Grau: Engenharia de Bioprocessos

Nome da Ênfase: Biocombustíveis

Abstract of a Final Project presented to Escola de Química/UFRJ as partial fulfillment of the requirements for the degree of Bioprocess Engineer with emphasis on Petroleum and Natural Gas – Biofuel.

MODELING OF CONTINUOUS PRODUCTION OF ETHANOL BY *Zymomonas mobilis*

Bruna Cristina Oliveira

March, 2014

Supervisors: Prof. Maurício Bezerra de Souza Júnior, D.Sc.

Prof. Argimiro Resende Secchi, D.Sc.

Literature experimental results indicate that the continuous ethanol production by fermentation using glucose and *Zymomonas mobilis* may exhibit complex behavior. The knowledge of this behavior is important to develop appropriate control and optimization strategies.

In this work, two mathematical models proposed respectively by Daugulis *et al* (1997) and Jöbbses *et al* (1985) were implemented in EMSO (*Environment for Modeling, Simulation and Optimization*) for dynamic simulation of the process and compared with experimental data by Camelo (2009). The model proposed by Jöbbses *et al* (1985) needs some adjustments to describe the characteristic oscillatory behavior of this process because it presented difficulties in the description of model. By contrast, the model was proposed by Daugulis *et al* (1997) was more successful in the simulation of the fermentation. Changes were made in the structure of both models in order to suit them to the real process. However, the results were not satisfactory fermentations with higher substrate concentration 200g / L.

Name of Degree: Bioprocess Engineer

Name of Emphasis: Biofuels

SUMÁRIO

I - Introdução	1
I.1- Motivação	1
I.2- Objetivos	3
I.3- Organização do trabalho	3
II – Revisão bibliográfica	5
II.1- <i>Zymomonas mobilis</i>	5
II.2- Modelagem matemática em bioprocessos	6
II.3- Modelagem matemática em processos fermentativos com <i>Zymomonas mobilis</i> ..	7
II.3.1- Modelo de Jöbses <i>et al.</i> (1986).....	7
II.3.2- Modelo de Ghommidh <i>et al.</i> (1989).....	10
II.3.3 - Modelo de Jarzębski(1992)	12
II.3.4- Modelo de Daugulis <i>et al.</i> (1997)	13
III – Metodologia	18
III.1- Dados Experimentais	18
III.2- Modelos utilizados.....	18
III.3- Parâmetros estimados	19
III.4 - Programas.....	21
III.5- Métodos para estimação.....	21
III.5.1 – Métodos dos poliedros flexíveis.....	22
III.5.2 – Método de busca randômica adaptativa.....	23
III.6- Integradores.....	24
III.7- Função objetivo.....	25
IV – Resultados	26
IV.1- Simulação do processo pelo modelo proposto por Daugulis <i>et al.</i> (1997)	26
IV.2- Simulação do processo pelo modelo proposto por Jöbses <i>et al.</i> (1986)	32
V - Conclusões e sugestões para o trabalho	36
V.1- Conclusões	36
V.2- Sugestões	37
VI – Referência Bibliográfica	38
Apêndice	40

Apêndice A - Rotinas implementadas no MATLAB 7.6.0 (R2008a).....	40
Apêndice A.1- Arquivo com o modelo proposto por Daugulis <i>et al.</i> (1997)	40
Apêndice A.2- Arquivo com os dados de entrada do modelo proposto por Daugulis <i>et al.</i> (1997).....	41
Apêndice A.3- Rotina para ajuste dos parâmetros do modelo proposto por Daugulis <i>et al.</i> (1997).....	43
Apêndice A.4- Arquivo com o modelo proposto por Jöbsses <i>et al.</i> (1986)	45
Apêndice A.5- Arquivo com os dados de entrada do modelo proposto por Jöbsses <i>et al.</i> (1986).....	46
Apêndice A.6- Rotina de ajuste dos parâmetros do modelo proposto por Jöbsses <i>et al.</i> (1986).....	47
Apêndice B - Rotinas implementadas no EMSO	49
Apêndice B.1- Rotina para ajuste dos parâmetros do modelo	49
Apêndice B.2- Arquivo com o modelo proposto por Jöbsses <i>et al.</i> (1986).....	51
Apêndice B.3- Arquivo com o modelo proposto por Daugulis <i>et al.</i> (1997).....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1 - Déficit futuro estimado no mercado de etanol (bilhões de litros) – 2011 a 2015*(Milanez <i>et al.</i> 2012)	2
Figura II.1 - Etapas de desenvolvimento de um modelo matemático (Mendes <i>et al.</i> 2011)	7
Figura III.2–Esquema proposto por Ghommidh <i>et al.</i> , (1989).....	10
Figura III.3– Ilustração do método de Poliedros flexíveis(Secchi 2001)	23
Figura IV.1 - Resultado da estimação de parâmetros para FC01 utilizando o modelo proposto por Daugulis <i>et al.</i> (1997)/(a) consumo de substrato;(b) crescimento celular; (c) geração de produto	27
Figura IV.2 - Resultado da estimação de parâmetros para FC02 utilizando o modelo proposto por Daugulis <i>et al.</i> (1997)/(a) consumo de substrato;(b) crescimento celular; (c) geração de produto	28
Figura IV.3 - Resultado da estimação de parâmetros para FC03 utilizando o modelo proposto por Daugulis <i>et al.</i> (1997)/(a) consumo de substrato;(b) crescimento celular; (c) geração de produto	29
Figura IV.4 - Resultado da estimação de parâmetros para FC04 utilizando o modelo proposto por Daugulis <i>et al.</i> (1997)/(a) consumo de substrato;(b) crescimento celular; (c) geração de produto	30

Figura IV.5 - Resultado da estimação de parâmetros para FC05 utilizando o modelo proposto por Daugulis <i>et al.</i> (1997)/(a) consumo de substrato;(b) crescimento celular; (c) geração de produto	31
Figura IV.6 - Resultado da estimação de parâmetros para FC06 utilizando o modelo proposto por Daugulis <i>et al.</i> , (1997)/(a) Gráfico de consumo de substrato;(b)Gráfico de crescimento celular; (c)Gráfico de geração de produto	31
Figura IV.7- Resultado da estimação de parâmetros para FC01 utilizando o modelo proposto por Jöbses <i>et al.</i> (1986)/(a) consumo de substrato;(b) crescimento celular; (c)geração de produto.....	33
Figura IV.8- Resultado da estimação de parâmetros para FC02 utilizando o modelo proposto por Jöbses <i>et al.</i> (1986)(a) consumo de substrato;(b) crescimento celular; (c)geração de produto.....	33
Figura IV.9- Resultado da estimação de parâmetros para FC03 utilizando o modelo proposto por Jöbses <i>et al.</i> (1986)/(a) consumo de substrato;(b) crescimento celular; (c)geração de produto.....	34
Figura IV.10- Resultado da estimação de parâmetros para FC04 utilizando o modelo proposto por Jöbses <i>et al.</i> (1986)/(a) consumo de substrato;(b) crescimento celular; (c)geração de produto.....	34
Figura IV.11- Resultado da estimação de parâmetros para FC05 utilizando o modelo proposto por Jöbses <i>et al.</i> (1986)/(a) consumo de substrato;(b) crescimento celular; (c)geração de produto.....	35
Figura IV.12- Resultado da estimação de parâmetros para FC06 utilizando o modelo proposto por Jöbses <i>et al.</i> (1986)/(a) consumo de substrato;(b) crescimento celular; (c)geração de produto.....	35

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela III.1–Valores característicos de cada fermentação do trabalho de Camelo, (2009)	18
Tabela III.2–Valores dos parâmetros do modelo de Jöbses <i>et al.</i> (1986) dados como estimativa inicial	20
Tabela III.4–Valores originais dos parâmetros não estimados do modelo de Daugulis <i>et al.</i> (1997).....	21
Tabela IV.1– Parâmetros estimados do modelo Daugulis <i>et al.</i> , (1997) com os dados de Camelo (2009).....	26
Tabela IV.2– Parâmetros estimados do modelo Jöbses <i>et al.</i> (1986) com os dados de Camelo (2009).....	32

NOMENCLATURA

a	Parâmetros relacionados com a inibição de etanol no crescimento
b	Parâmetros relacionados com a inibição de etanol no crescimento
C_E	Concentração do componente E (g.L^{-1})
C_1	Constante empírica
C_2	Constante empírica
D	Taxa de diluição (h^{-1})
FC01	Fermentação Contínua 01
FC02	Fermentação Contínua 02
FC03	Fermentação Contínua 03
FC04	Fermentação Contínua 04
FC05	Fermentação Contínua 05
f_μ	Função introduzida como aproximação para define o efeito de Z no crescimento das células
m_s	Coefficiente de manutenção celular (h^{-1})
m_P	Coefficiente de manutenção celular considerando a formação de produto(h^{-1})
P_{ob}	Concentração de etanol acima do qual ocorre inibição a taxa de crescimento específica instantânea (g.L^{-1})
P_{ma}	Concentração de etanol acima do qual ocorre inibição a taxa de crescimento específica instantânea (g.L^{-1})
P_{mb}	Concentração máxima de etanol no qual há crescimento celular (g.L^{-1})
P_{me}	Concentração máxima de etanol no qual não ocorre inibição à geração de
P_c	Concentração crítica de produto (g.L^{-1})
P'_c	Concentração crítica de produto para células não viáveis (g.L^{-1})
P	Concentração de produto (g.L^{-1})
Q_P	Taxa específica de produção de etanol ($\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
$Q_{P_{max}}$	Taxa máxima específica de produção de etanol ($\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
S	Concentração de substrato (g.L^{-1})
S_F	Concentração de glicose na alimentação (g.L^{-1})
S_o	Concentração de glicose abaixo da qual não ocorre inibição

t	Tempo (h)
$Y_{P/S}$	Coefficiente de rendimento de glicose em etanol (g.g^{-1})
$Y_{X/S}$	Coefficiente de rendimento de glicose em células (g.g^{-1})
$Y_{P/X}$	Coefficiente de rendimento de biomassa em relação ao produto (g.g^{-1})
X	Concentração de biomassa (g.L^{-1})
Z	Média ponderada de segunda ordem da taxa de variação da concentração de etanol ($\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
K_s	Constante de saturação (g.L^{-1})
K_E	Constante de Monod (g.L^{-1})
K_1	Constante empírica (g.L^{-1})
K_2	Constante empírica (g.L^{-1})
K_i	Constante relacionada à inibição por substrato (g.L^{-1})
K_{mP}	Constante de saturação de substrato para taxa de produção de etanol (g.L^{-1})
W	Média ponderada de primeira ordem da taxa de variação da concentração de etanol ($\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
β	Parâmetro da equação que pondera o peso da história da taxa (h^{-1})
α	Parâmetro da equação que pondera o peso da história da taxa (h^{-1})
μ	Taxa específica de crescimento celular (h^{-1})
μ_{\max}	Taxa máxima específica de crescimento celular (h^{-1})
μ'_{\max}	Taxa máxima específica de crescimento celular de células não viáveis (h^{-1})
$\mu(S, P, Z)$	Taxa específica de crescimento dinâmico (h^{-1})
μ_P	Taxa específica de formação de produto (h^{-1})

SUBSCRITOS

0	Parâmetro ou variável inicial ou de entrada
e	Parâmetro ou variável de alimentação na corrente

I - Introdução

I.1- Motivação

O setor sucroalcooleiro se exprime como uma forma de alavancagem da indústria química no Brasil. As empresas deste setor consolidaram em seus portfólios de produtos o açúcar, o etanol e a bioeletricidade. O Brasil foi pioneiro no uso de bioetanol como combustível e com isso obteve uma tecnologia de produção de etanol à frente dos demais países. A atratividade do etanol ainda desencadeia grandes investimentos e pode ser explicada, por se tratar de um biocombustível com menor impacto ambiental, oriundo de fontes renováveis, com menor emissão de dióxido de carbono frente aos combustíveis fósseis e pela grande oferta de biomassa existente no país. Considera-se ainda uma possível escassez de petróleo, mesmo com a descoberta do pré-sal, que apontaria para o etanol como a energia alternativa melhor desenvolvida para substituí-lo. Um pacote de incentivos ao etanol, incluindo redução no PIS/Cofins ,está em tramitação dentro dos ministérios. Considerando que esse pacote de incentivos ocorrerá logo após o recente anúncio de retorno da mistura de etanol para o patamar de 25%, esta medida certamente provocará um aumento nos investimentos nesse setor.

Apesar do grande potencial do bioetanol, as perspectivas futuras em relação ao mesmo são preocupantes. Pesquisas feitas pelo Banco de Desenvolvimento Econômico e social (BNDES), evidenciam um risco de uma oferta de bioetanol não satisfatória em relação à demanda prevista até 2015. Se o problema de oferta de etanol persistir, é provável que haja desequilíbrios também no mercado de gasolina em curto prazo, dado que a capacidade nacional de refino não deve aumentar significativamente até 2015.(Milanez *et al.* 2012).

Pela análise do gráfico apresentado na Figura I.1 é possível verificar que a capacidade produtiva estimada em 2015 seria suficiente para rebater o risco de déficit citado anteriormente. Entretanto isso implicaria na redução da produção de açúcar em proveito da elevação na produção do biocombustível, o que seria pouco provável de ocorrer, visto que o preço desse alimento tende a se manter em patamares relativamente elevados nos próximos anos (Milanez *et al.* 2012) Além disso, o potencial da cana de açúcar, principal biomassa do setor sucroalcooleiro, é promissor para a produção de novos itens como os biocombustíveis de maior densidade energética e produtos

químicos de maior valor agregado. Essa diversificação produtiva possibilitará às empresas tornarem-se grandes biorrefinarias (Milanez *et al.* 2012). Porém, novamente, se este cenário se concretizar, ainda que esses novos itens fossem produzidos em escalas iniciais de produção mais reduzidas, poderá acirrar ainda mais a competição pela matéria-prima, o que também dificultaria a maximização da produção de etanol.

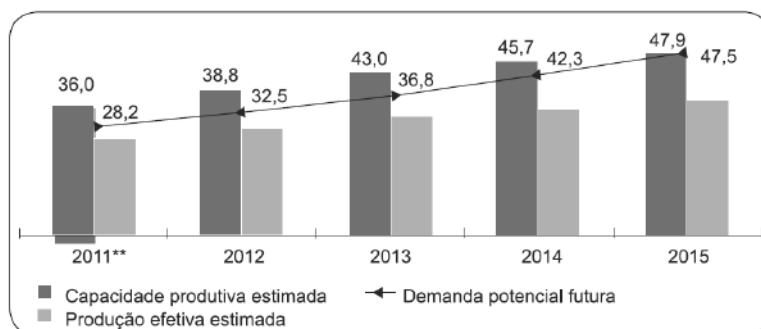


Figura I.1 - Déficit futuro estimado no mercado de etanol (bilhões de litros) – 2011 a 2015*(Milanez *et al.* 2012)

A busca por soluções que aprimorem a tecnologia de produção de etanol como forma de garantir a oferta deste produto é claramente observada quando se atenta às pesquisas científicas. As mesmas atuam em áreas que vão desde a descoberta de novas matérias primas, processos e microrganismos até o melhoramento genético de biomassas e microrganismos já utilizados na produção de etanol. Como destaque, pode-se atentar para estudos feitos com a bactéria *Zymomonas mobilis* como bioconversor em fermentações alcólicas que tem se destacado como uma alternativa à consagrada levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Garcia-Cruz *et al.* 2009).

O interesse que *Zymomonas mobilis* vem despertando, justifica-se pelo seu proeminente potencial na produção de etanol, produzindo cerca de 1,9 mol de etanol por mol de glicose, com taxa três a quatro vezes maior que *Saccharomyces cerevisiae* (Garcia-Cruz *et al.* 2009). Além disso, as condições simples para seu crescimento, a maior tolerância a elevadas concentrações de etanol e substrato, a elevadas temperaturas e maior taxa específica de produção de álcool e consumo de substrato acrescem as vantagens do uso da bactéria perante as leveduras(Garcia-Cruz 2009).

Não obstante, sua aplicação industrial ainda é irrelevante. Sua alta capacidade fermentativa se restringe a uma pequena faixa de tipos de substrato e embora a bactéria *Zymomonas mobilis* seja geralmente considerada segura, conforme Lin e Tanaka (2006), sua biomassa não é geralmente aceitável como alimentação animal, o que gera inevitável problema no descarte da

mesma. Além disso, fermentações alcoólicas em regime contínuo com *Zymomonas mobilis* tendem a manifestar comportamento oscilatório, causando uma diminuição na produção de etanol (Li *et al.* 1997; Mcllellan *et al.* 1995)

Em relação a ultima característica citada, as consequências desse fenômeno podem ir além da queda de rendimentos. Torna-se custoso fazer a modelagem matemática de um processo com comportamento semelhante a este e isto infere no desconhecimento do processo. O não conhecimento, por sua vez, inviabiliza qualquer tentativa de otimização de um processo fermentativo, visto que não é possível prever o comportamento que será assumido em relação à produtividade a partir de determinadas condições e parâmetros. Com o intuito de buscar soluções para os relatos acima, alguns trabalhos científicos se propuseram à construção de modelos matemáticos especificamente para fermentações alcoólicas sendo eles a base para no presente monografia.

I.2- Objetivos

O objetivo do presente trabalho é propor um simulador capaz de antever o comportamento dinâmico, que poderá ser oscilatório, observado em processos fermentativos contínuos com *Zymomonas mobilis*, utilizando glicose como substrato. Em vista disso, foi avaliado o comportamento das variáveis de estado na produção de etanol tais como, consumo de substrato, produção de etanol e produção de biomassa que são expressas pelos modelos apresentados no trabalho de Jöbses *et al.* (1986) e Daugulis *et al.* (1997).

I.3- Organização do trabalho

Pretendendo elucidar o desenvolvimento deste trabalho, este projeto final de curso foi dividida em cinco capítulos, finalizando com um apêndice e as referências utilizadas no mesmo. O objetivo, assim como suas motivações e a forma como foi estruturado, compõe este primeiro capítulo.

No segundo capítulo é feita uma revisão bibliográfica do comportamento complexo característico de bioprocessos com uma subsequente revisão dos principais modelos aplicados à fermentação de glicose por *Zymomonas mobilis*.

No terceiro capítulo encontra-se toda metodologia usada para modelagem do processo fermentativo com *Zymomonas mobilis*. É feita uma breve descrição dos dados experimentais usados nesse trabalho, dos parâmetros estimados assim como os métodos e programas usados para estimação e simulação do processo.

Os resultados alcançados com a modelagem e a simulação dos processos fermentativos com glicose por *Zymomonas mobilis* são apresentados e discutidos no capítulo quatro. As conclusões e sugestões geradas de posse dos resultados obtidos são expostas no quinto e último capítulo deste projeto final.

II – Revisão bibliográfica

II.1- *Zymomonas mobilis*

Quanto a sua fisiologia, a bactéria *Zymomonas mobilis* é Gram-negativa não esporulante e móvel. Sua forma física é de bastonete curto e grosso medindo de 2,0 a 6,0 µm de comprimento e 1,0 a 1,4 µm de largura. Elas podem ser encontradas mais comumente em pares, sendo também possível encontrá-las isoladas. Tem como característica, ser majoritariamente anaeróbia facultativa com algumas linhagens anaeróbias restritas (Falcão de Moraes 1983;Garcia-Cruz *et al* 2009). Em comparação com outros microrganismos, possuem rotas metabólicas simples sem variedades. O que se observa nessa bactéria, é a grande tendência de gerar energia pela degradação de substratos com altas taxas específicas de carbono. Este comportamento tem como consequência baixos rendimentos de biomassa em favor do direcionamento de uma significativa parte do substrato para o catabolismo do produto final (Toma *et al.* 2003;Garcia-Cruz 2009).

Uma das principais aplicações da *Zymomonas mobilis* em bioprocessos, ainda em constante estudo, é como bioconversor em fermentações alcólicas. Segundo Garcia-Cruz, (2009), para cada mol de glicose degradado, aproximadamente 1,9 mols de etanol, 1,8 mols de CO₂ e uma pequena quantidade de outros subprodutos como lactato, acetaldeído, ácidoacético, glicerol, acetoína, dihidroxicetona, sorbitol, manitol, levana e ácido glicônico são gerados.

O desempenho desta bactéria relatado na literatura, em processos descontínuos utilizando glicose como fonte de carbono, demonstra que neste tipo de processo, apesar da inibição causada pela concentração de substrato, altas concentrações de etanol podem ser obtidas. Pode se comprovar isso, observando o valor do rendimento em etanol, que normalmente é maior que 95% e do fator de conversão de glicose em biomassa que varia de 0,015 a 0,050. A taxa de produtividade é dependente da concentração inicial de substrato e varia em uma faixa de 5 a 7 g/L.h(Lee *et al.* 1979).

II.2- Modelagem matemática em bioprocessos

A tentativa de previsão do comportamento temporal de um processo a partir de determinadas variáveis transparece a busca por uma simulação dos processos químicos em geral. Estas simulações são possíveis por meio da modelagem matemática que pode ser definida como o ato de descrever matematicamente as reações que ocorrem no processo químico. Em decorrência disso, a elaboração de um modelo matemático torna-se de grande valia para compreensão do comportamento do sistema e de suas relações de causa e efeito. É a partir deste conhecimento que se torna praticável o planejamento de um experimento, controle de um processo através de correções necessárias e até a otimização do mesmo (Mendes *et al.* 2011).

Em bioprocessos a aplicação da modelagem matemática está na criação de pacotes computacionais de modelagem e simulação que permitem a análise de segurança e risco, o aumento de produtividade e controle do bioprocessos. Aliado aos conhecimentos fornecidos pela bioquímica a respeito das reações ocorridas no meio intracelular, a modelagem matemática é uma importante ferramenta para estudo do processo fermentativo e desenvolvimento de pesquisas (Schmidell *et al.* 2011).

Contudo a modelagem do processo fermentativo enfrenta dificuldades em sua aplicação. Atribui-se a isso, o fato do processo ser conduzido em um meio diluído, possuir baixas concentrações, baixas taxas de reação e por se tratar de uma mistura reacional complexa característica de sistemas bioquímicos. Há ainda a falta de informações necessárias para explicações de fenômenos importantes que, somados à limitação matemática, vão em detrimento da criação de um modelo fielmente representativo de todas as variáveis do processo real. Na Figura II.1 pode se concluir, através das etapas de elaboração de um modelo matemático, que o que se propõe ao elaborar um modelo para um processo fermentativo, segundo (Schmidell *et al.* 2001), é obter uma simulação ideal, ou seja, que tenha um comprometimento estatisticamente razoável com o grau de complexidade do processo e com solução economicamente desejável. É esperada uma busca por um conjunto de parâmetros que ajuste melhor o modelo ou mesmo reavaliações no próprio modelo para que ao final, o mesmo seja capaz de fornecer simulações com o nível de significância mínimo exigido (Mendes *et al.* 2011).

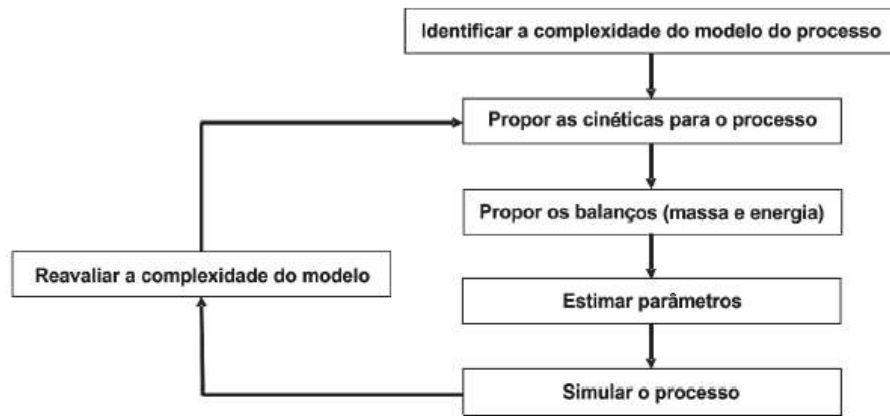


Figura II.1 - Etapas de desenvolvimento de um modelo matemático (Mendes *et al.*2011)

II.3- Modelagem matemática em processos fermentativos com *Zymomonas mobilis*

Os processos fermentativos com *Zymomonas mobilis* geralmente exprimem um comportamento oscilatório das variáveis de estados, o que dificulta a modelagem matemática especificamente deste processo. Trabalhos prévios propuseram modelos com a intenção de descrever esse comportamento, considerando possíveis inibições sofridas à biomassa pela concentração de substrato e produto. Os principais modelos estão descritos a seguir.

II.3.1- Modelo de Jöbses *et al.* (1986)

Classifica-se como modelo não estruturado e não segregado (Jöbses *et al.* 1986). Entende-se como modelo não estruturado, um modelo matemático que representa o material celular por uma única variável, negligenciando as variações nos componentes intracelulares. Modelos não segregados por sua vez, consideram a população celular homogênea tomando como hipótese que todas as células possuem o mesmo comportamento (Schmidell,*et al.* 2001).

No trabalho de Jöbses *et al.*(1986), a inibição por elevada concentração de substrato sofrida pela biomolécula é considerada pelo uso da equação da taxa de crescimento definida pela equação de Monod. A inibição pelo produto sofrida pela biomassa é tratada no trabalho de Jöbses *et al.*(1986) de maneira indireta. Considera-se um componente E interno à biomolécula, o qual possui a taxa de formação proporcional à concentração de etanol e a de substrato. Este componente chave sofre inibição com o aumento da concentração de etanol e como consequência, afeta a taxa máxima específica μ_m conforme a Equações II.2 e II.3. Essa resposta não é instantânea podendo ser observada em aproximadamente trinta horas de fermentação.

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

$$E = \frac{C_E}{C_X} \quad (\text{II.2})$$

$$\mu_{max} = \frac{\mu_{max}(\text{desconsiderando o componente } E)}{E} \quad (\text{II.3})$$

Este modelo é fenomenológico e composto por quatro equações que descrevem basicamente a quantidade de substrato consumida, a geração de biomassa, a geração de produto e a geração de um componente enzimático E .

A equação que descreve a concentração de substrato ao longo do processo considera que a taxa de consumo de substrato é composta por três termos básicos como pode ser observado na Equação II.4. O primeiro termo refere-se ao consumo de substrato para o crescimento microbiano. O segundo termo refere-se à fração do substrato utilizada para manutenção celular. Por fim, o último termo refere-se à quantidade de substrato não utilizada, determinada pela diferença entre a vazão de entrada e saída de substrato do reator (Jöbses *et al.* 1986).

$$\frac{dS}{dt} = \left(-\frac{\mu_{max}}{Y_{SX}} \right) \frac{SC_E}{K_s S} + m_s S + D(S_e - S) \quad (\text{II.4})$$

O crescimento da bactéria ao longo do processo é determinado em concordância com a Equação II.5, pela taxa de crescimento do microrganismo acrescida da quantidade de biomassa

que permanece no reator, a qual é fornecida pela diferença da vazão de entrada e de saída da mesma.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \frac{SC_E}{K_S + S} - DX \quad (\text{II.5})$$

O produto formado é semi-associado ao crescimento sendo regido pela Equação ordinária II.6. Considera-se a parcela de produto formado pela bactéria, a parcela de substrato destinado à manutenção celular levando em consideração a formação de produto e o termo referente à vazão de entrada e saída de etanol. O segundo termo possui o parâmetro m_p introduzido por Pirt (1975) que pode ser definido como um coeficiente específico de manutenção (Schmidell, *et al.* 2001).

$$\frac{dP}{dt} = \frac{\mu_{max}}{y_{PX}} \frac{SC_E}{K_S + S} + m_p X - DP \quad (\text{II.6})$$

A Equação II.7 representa a formação do componente E que é afetada pela concentração de substrato, de produto e do próprio E .

$$\frac{dC_E}{dt} = f(P) f(S) C_E \quad (\text{II.7})$$

O termo $f(S)$ é expresso pela equação de Monod (Equação II.1) e o $f(P)$ é um polinômio gerado experimentalmente com os coeficientes empíricos conforme aparece nas Equações II.8 e II.9.

$$f(P) = K_E (P - c_1)(P - c_2) \quad (\text{II.8})$$

$$\frac{dC_E}{dt} = K_E (P - c_1)(P - c_2) \frac{SC_E}{K_S + S} - DC_E \quad (\text{II.9})$$

II.3.2- Modelo de Ghommidh *et al.* (1989)

Trata-se de um modelo segregado e não estruturado que derivou de uma adaptação do modelo de Jöbses *et al.*(1986). No trabalho de Ghommidh *et al.* (1989), a população de microrganismos é dividida em três categorias, de acordo com a viabilidade fisiológica do mesmo. A primeira distinção foi feita para as células ditas viáveis e indicadas com um subíndice v . Estas são aptas à reprodução, geração de energia e de produtos através da degradação do substrato. Há também o grupo das células que ainda são capazes de gerar produto e energia, contudo são incapazes de reproduzir. Estas são ditas inviáveis e são representadas pelo subíndice nv . As células que não são viáveis sequer inviáveis, ou seja, incapazes de se reproduzirem e de converterem substrato em energia e produto, são representadas pelo subíndice d e consideradas células mortas.

O modelo proposto por Ghommidh *et al.* (1989), representado pelas Equações II.10 até a II.13, baseia-se na proposição de que a taxa de conversão de substrato em produto e em energia é constante para as células vivas. Essa taxa de conversão não teria correlação alguma com a taxa de crescimento. A Figura III.2 ilustra o esquema proposto por Ghommidh *et al.* (1989). Todavia em concentrações elevadas de etanol, a membrana celular sofre desnaturação inviabilizando a célula ou provocando morte celular.

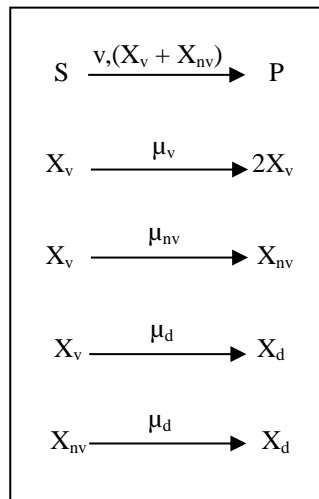


Figura III.2–Esquema proposto por Ghommidh *et al.* (1989)

$$\frac{dX_v}{dt} = (\mu_v - \mu_d - D)X_v \quad (\text{II.10})$$

$$\frac{dX_d}{dt} = \mu_d(X_v + X_{nv}) - DX_d \quad (\text{II.11})$$

$$\frac{dX_{nv}}{dt} = \mu_{nv}X_v - (\mu_d - D)X_{nv} \quad (\text{II.12})$$

$$\frac{dP}{dt} = \mu_p(X_v + X_{nv}) - DP \quad (\text{II.13})$$

O que se observa nas equações do modelo, é a inexistência de uma representação ordinária que descrevesse o consumo de substrato ao longo do processo. A falta de descrição da concentração do substrato é essencial para consideração de uma possível inibição da célula ao substrato. Apenas a inibição ao etanol sofrida pelo microrganismo foi contabilizada pelo efeito que o mesmo tem sobre a taxa específica de concentração celular (Equação II.14).

$$\mu = \mu_{max} \left(1 - \frac{P}{P_c} \right) \quad (\text{II.14})$$

O parâmetro P_c é definido como a concentração crítica de etanol, no qual qualquer concentração de produto acima dela, provoca a perda da capacidade produtiva de todas as células. Presume-se então que ou a célula chegará à mortalidade ou será não viável ($\mu_v = 0$ e $\mu_d = -\mu$). Do contrário, a taxa específica de crescimento celular assumirá o mesmo valor da taxa específica de crescimento celular das células viáveis e a taxa de crescimento específica das células mortas será nula (Ranzan, 2010).

A Equação II.15 refere-se a taxa de formação das células não viáveis formada por células viáveis em condições hostis. A taxa máxima de crescimento μ'_{max} , será menor que μ_{max} , já que parte ou toda a capacidade produtiva é perdida com a elevação da concentração de produto no meio. Contudo células viáveis ainda degradam substrato, o que permite concluir que a capacidade fermentativa desta é mais resistente quando comparada com células viáveis e, dessa forma P'_c é maior que P_c .

$$\mu_{nv} = \mu'_{max} \left(1 - \frac{P}{P'_c} \right) - \mu_v \quad (\text{II.15})$$

II.3.3 - Modelo de Jarzębski(1992)

O modelo sugerido por Jarzębski (1992) propôs modificações ao modelo apresentado no trabalho de Ghommidh *et al.*(1989). Contestou-se a inibição ao substrato, desconsiderada no modelo de Ghommidh *et al.*(1989), como um dos fatores que justificaria o comportamento oscilatório observado nas fermentações com *Zymomonas mobilis*. Baseando-se no trabalho de Bruce *et al.* (1991), a oscilação do processo fermentativo é apontada como efeito da aglutinação da inibição celular provocada pelo produto e da inibição celular provocada pelo substrato. A dedução é empírica, quando observado que concentrações elevadas de substrato eram insuficientes para prejudicar um microrganismo. Entretanto isso não é verdadeiro quando detectada a inibição pelo produto, o que infere a inibição do substrato, dependente da inibição pelo produto reciprocamente.

De posse dessas observações, Jarzębski (1992) inseriu um termo na equação de geração de células viáveis, que considera a geração de células não viáveis pelas células viáveis. A Equação II.13 foi reescrita semelhante à equação de geração de produto proposta por Jöbses *et al.*, (1986), resultando na Equação II.19. Além disso, uma nova equação ordinária, Equação II.20, foi inserida ao modelo para descrever o consumo de substrato. Nesta equação, nota-se que parte do substrato é convertida em geração de biomassa viável e outra parte é consumida para manutenção celular de células não viáveis. Nenhum termo que relacione o consumo de substrato utilizado pelas células viáveis em virtude da manutenção da mesma foi adicionado.

$$\frac{dX_v}{dt} = (\mu_v - \mu_d - \mu_{nv} - D)X_v \quad (\text{II.16})$$

$$\frac{dX_d}{dt} = \mu_d(X_v + X_{nv}) - DX_d \quad (\text{II.17})$$

$$\frac{dX_{nv}}{dt} = \mu_{nv}X_v - (\mu_d - D)X_{nv} \quad (\text{II.18})$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{\mu_v X_v}{y_{PX}} + m_P X_{nv} - DP \quad (\text{II.19})$$

$$\frac{dS}{dt} = (S_0 - S)D - \frac{\mu_v X_v}{y_{PX}} - m_S X_{nv} \quad (\text{II.20})$$

Em decorrência da inibição provocada pelo substrato, a Equação II.14 precisou ser adaptada para descrever a influência, tanto da inibição pelo produto quanto da inibição pelo substrato sobre a taxa específica de crescimento celular. A nova taxa específica de crescimento é apresentada na Equação II.21.

$$\mu_v = \mu_{max} \frac{S}{K_1 + S + \frac{S^2}{K_{iS}}} \left(1 - \frac{P}{P_c} \right) \quad (\text{II.21})$$

Jarzębski, (1992) também considerou a formação de células não viáveis como ocorreu no trabalho de Ghommidh *et al.*, (1989). Associando a Equação II.15 com a II.21, gerou-se a Equação (II.22).

$$\mu_{nv} = \mu'_{max} \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} \left(1 - \frac{P}{P'_c} \frac{\mu_{max} S}{K_s + S} \right) - \mu_v \quad (\text{II.22})$$

II.3.4- Modelo de Daugulis *et al.* (1997)

O modelo proposto no trabalho de Daugulis *et al.* (1997) sugere um novo conceito chamado taxa de crescimento específica dinâmica. Este termo foi inserido para avaliar a taxa de crescimento celular em um determinado instante, não sendo reflexo apenas das condições vividas neste mesmo instante, mas sim a um histórico vivenciado pela célula. Daugulis *et al.* (1997) baseou-se no trabalho de Li *et al.* (1995) o qual salienta que mudanças na concentração de etanol podem ser irrelevantes como fatores de inibição celular, mas uma instantânea elevação na concentração de etanol tem maior intensidade no efeito inibitório. Entretanto, existe um atraso entre a percepção da mudança do meio pela célula e a emissão de uma resposta metabólica a essa mudança.

O efeito inibitório expresso com atraso foi modelado como o efeito da média ponderada de segunda ordem da taxa de variação da concentração de etanol, chamada de Z definida pela

Equação II.23. O peso dessa média, é definido pela Equação II.24, onde τ representa o tempo histórico e t é o tempo atual.

$$Z(t) = \int_{-\infty}^t \frac{dP}{dt} \Big|_{\tau} \Psi_Z(\tau) d\tau \quad (\text{II.23})$$

$$\Psi_Z(\tau) = \beta^2 (t - \tau) e^{-\beta(t-\tau)} \quad (\text{II.24})$$

O máximo de $\Psi_Z(t)$ acontece quando $\tau = t - 1/\beta$, ou seja, $1/\beta$ horas antes. O que se pode inferir que a taxa de mudança da concentração de etanol a qual ocorre em $1/\beta$ horas antes tem a maior influência. O parâmetro β indica a magnitude do tempo de atraso pelo efeito inibitório.

O valor de Z influencia no crescimento celular como pode ser observado na Equação II.26. Quando a variação de produto assume valores positivos, a variável $Z(t)$ também assume valores positivos, indicando uma inibição ao crescimento celular. Quando ocorre o contrário, não há efeito inibitório. Deste modo, o comportamento que a variável $Z(t)$ assume é o de uma função descontínua. Entretanto, este tipo de função vem em detrimento do processo de estimação e da análise dinâmica do processo. Objetivando sanar esta dificuldade, a função hiperbólica $f_{\mu}(Z(t))$ (Equação II.25) foi introduzida ao modelo transformando a função descontínua em uma função contínua diferenciável.

$$f_{\mu}(Z(t)) = \frac{1}{2} \left(1 - \frac{e^{\lambda Z(t) - \delta} - e^{-\lambda Z(t) - \delta}}{e^{\lambda Z(t) - \delta} + e^{-\lambda Z(t) - \delta}} \right) \quad (\text{II.25})$$

A Equação II.25 é chamada fator de inibição, sendo as variáveis λ e δ parâmetros determinados por ajustes experimentais e que indicam o fator de inibição provocado pela variação da concentração de produto no meio. O fator de inibição pode assumir valores entre 0 e 1 e junto com a taxa específica, influencia a taxa específica de crescimento celular dinâmico, conforme visto na Equação II.26.

$$\mu(S, P, Z) = \mu(S, P) f_{\mu}(Z(t)) \quad (\text{II.26})$$

A taxa específica de crescimento usada no trabalho de (Camêlo, 2009) é proposta por Veeramallu and Agramal, (1990) é expressa pela Equação II.27.

$$\mu(S, P) = \frac{\mu_{max} S \left(1 - \frac{P}{P_{ma}}\right) f(P)}{K_S + \frac{S}{g(S)}} \quad (\text{II.27})$$

Sendo as funções $g(S)$ e $f(P)$ expressas da seguinte maneira:

$$\begin{aligned} g(S) &= 1 & \text{se} & & S \leq S_i \\ g(S) &= \frac{K_i - S_i}{(K_i - S_i)(S - S_i)} & \text{se} & & S \geq S_i \end{aligned} \quad (\text{II.28})$$

$$\begin{aligned} f(P) &= 1 & \text{se} & & P \leq P_{ob} \\ f(P) &= 1 - \left(\frac{P - P_{ob}}{P_{mb} - P_{ob}}\right)^b & \text{se} & & P_{ob} \leq P < P_{mb} \\ f(P) &= 0 & \text{se} & & P > P_{mb} \end{aligned} \quad (\text{II.29})$$

Em que:

- K_i = Parâmetro relacionado à inibição do substrato.
- K_S = Constante de Monod.
- P_{ma} = Concentração de etanol limitante no qual ocorre a inibição à taxa específica de crescimento.

- P_{ob} = Concentração de etanol limitante no qual ocorre a inibição à taxa específica de crescimento.
- P_{mb} = Concentração máxima de etanol limitante no qual ocorre a ao crescimento celular.

A taxa específica de produção de etanol (Equação II.30), foi modelada usando os trabalhos de Lee e Rogers, (1983), no qual a influência da inibição causada tanto pelo substrato quanto pelo produto são consideradas.

$$Q_P = \frac{Q_{Pmax}S}{K_{mP} + S} \left(1 - \left(\frac{P}{P_{me}} \right)^\alpha \right) \quad (II.30)$$

Nesta equação, Q_{Pmax} representa a taxa específica máxima de produção de etanol, K_{mP} é um parâmetro que expressa a saturação por substrato para a produção de etanol, P_{me} é a concentração crítica de etanol no qual acima dela, ocorre inibição à produção de etanol e α é o fator de inibição por etanol para a taxa de produção de etanol.

Semelhante a variável $Z(t)$, $W(t)$ (Equação II.31) também é uma variável que expressa o efeito da inibição ao produto, considerando o atraso na resposta, modelada como a média ponderada de primeira ordem da taxa de variação da concentração do produto. O peso desta média é representado pela Equação II.32.

$$W(t) = \int_{-\infty}^t \frac{dP}{dt} \Big|_{\tau} \Psi_W(\tau) d\tau \quad (II.31)$$

$$\Psi_W(\tau) = \beta e^{-\beta(t-\tau)} \quad (II.32)$$

Com isso, o trabalho de Daugulis *et al.*, (1997) apresentou um modelo composto por cinco equações. As Equações II.33 a II.35 são geradas a partir do de balanço de massa. As Equações II.36 e II.37 são obtidas através da diferenciação em relação ao tempo das Equações II.23 e II.31, respectivamente.

$$\frac{dX}{dt} = \mu(S, P, Z)X - DX \quad (\text{II.33})$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_e - S) - \frac{XQ_P}{y_{P/S}} \quad (\text{II.34})$$

$$\frac{dP}{dt} = Q_P X - DP \quad (\text{II.35})$$

$$\frac{dZ}{dt} = \beta(W - Z) \quad (\text{II.36})$$

$$\frac{dW}{dt} = \beta(Q_P X - DP - W) \quad (\text{II.37})$$

III – Metodologia

III-1- Dados Experimentais

As seis fermentações escolhidas no trabalho de Camêlo, (2009) foram conduzidas, a princípio, em regime batelada e a partir de um tempo t_F , conduzidas por fermentação contínua para que fosse possível estudar o comportamento dinâmico do processo em relação a diferentes concentrações de glicose. A vazão de alimentação (F) foi de 1mL/min, o volume do biorreator de 1L e a taxa de diluição (D) foi de 0,06 h⁻¹ para todas as fermentações. Entretanto os valores das variáveis iniciais S_0 , X_0 e P_0 , o tempo de duração da fermentação (t_{TOTAL}), o tempo de início da fermentação contínua (t_F) assim como o valor da concentração de substrato alimentado (S_e) diferem de fermentação para fermentação e são apresentadas na Tabela III.1.

Tabela III.1–Valores característicos de cada fermentação do trabalho de Camelo (2009)

	FC01	FC02	FC03	FC04	FC05	FC06
$S_0(\text{g/L})$	92,638	92,466	140	146	194,75	184,79
$P_0(\text{g/L})$	9,099	4,83	2,420	2,424	3,10	3,10
$X_0(\text{g/L})$	0,0290	0,051	0,0580	0,023	0,10	0,2710
$S_e(\text{g/L})$	100	200	150	200	200	200
$T_{total}(\text{h})$	81	99	71	95	104,50	94
$t_F(\text{h})$	18	22	16	24	36,50	37

III.2- Modelos utilizados

No trabalho de Camêlo(2009), o modelo proposto por Daugulis *et al.*(1997) foi usado para simular o comportamento do processo fermentativo por *Zymomonas mobilis*. A autora estima os parâmetros do modelo adotado, partindo dos próprios dados experimentais e tomando os valores originais dos parâmetros ajustados por Daugulis *et al.*(1997) como valor inicial. Entretanto não

foi possível obter um único conjunto de parâmetros para todas as fermentações. Além disso, os conjuntos de parâmetros encontrados por Camêlo (2009) não foram capazes de descrever as oscilações características deste tipo de fermentação. Dentre as possíveis causas do insucesso nas fermentações estão às limitações do modelo escolhido. De fato, Neto (2006) já havia relatado que havia ausência de multiplicidade de equilíbrios neste modelo, apresentando somente ciclos limites. Neto (2006) também constatou descontinuidades para intervalos da concentração de produto, o que requer modificações na estrutura do modelo.

Uma tentativa de modificar o modelo foi executada considerando o fator de conversão do substrato em produto como uma variável ao invés de considerá-lo com parâmetro. No entanto a modificação não gerou respostas relevantes. Outra alternativa foi buscar um modelo que fosse capaz de descrever o processo fermentativo por *Zymomonas mobilis* com eficácia. De antemão os modelos de Jarzębski, (1992) e Ghommidh *et al.* (1989) foram desconsiderados por inviabilizar a quantificação física de suas variáveis de estado. Além disso, ambos os modelos são ineficazes na descrição em simulações dinâmicas (Ranzan 2010).

Optou-se então por confrontar a simulação feita com o modelo de Daugulis *et al.*(1997) com a simulação feita com o modelo de Jöbsses *et al.*(1986). Alguns trabalhos já haviam feito uso deste segundo modelo e obtido resultados promissores. O modelo de Jöbsses *et al.*(1986) não prevê inibição ao crescimento causada por concentrações de substrato. Entretanto a estrutura do modelo parece apropriada para modelagem e controle de processos devido a presença de multiplicidades de estados estacionários e por apresentar oscilação sustentada em baixos valores de taxa de inibição(Ranzan 2010).

III.3- Parâmetros estimados

Os parâmetros estimados em cada modelo estão apresentados nas Tabelas III.2 e III.3. O conjunto de valores dos parâmetros usado como estimativa inicial no modelo de Jöbsses *et al.*(1986) são os mesmo adotados pelo autor.

Devido ao não fornecimento do valor original para a concentração do componente E no trabalho de Jöbsses *et al.*(1986), foi necessário estimar a concentração inicial de E . O valor inicial de C_E para estimação foi estipulado por tentativa e erro e também está representado na Tabela III.2.

Em relação ao conjunto de parâmetros característico do modelo de Daugulis *et al.* (1997) foram usados, como estimativa inicial, os mesmos gerados por Camêlo (2009), a qual os obteve tomando os valores dos parâmetros encontrados no próprio trabalho de Daugulis *et al.* (1997) como estimativa inicial. Os demais parâmetros que não foram estimados no modelo de Daugulis *et al.* (1997), são os mesmos fornecidos no trabalho original do autor (Tabela III.4)

Tabela III.2–Valores dos parâmetros do modelo de Jöbjes *et al.*(1986) dados como estimativa inicial

Parâmetro	Valor inicial	Unidade
K_e	0,00383	$m^6/kg^2.h$
K_s	0,5	kg/m^3
c_1	59,2085	kg/m^3
c_2	70,5565	kg/m^3
μ_{max}	0,41	h^{-1}
m_s	2,16	$kg/kg.h$
m_p	1,1	$kg/kg.h$
y_{sx}	0,8612	kg/kg
y_{px}	0,3045	kg/kg
C_{E0}	0,0001	g/L

Tabela III.3–Valores dos parâmetros do modelo de Daugulis *et al.*(1997) dados como estimativa inicial

	Valor inicial para FCO1, FCO2, FCO3 e FCO4	Valor inicial para FCO5 e FCO6	Unidade
α	3,320	1,3	
β	1,000	0,06	
λ	1,000	3,8	
δ	0,568	7,53	
a	2,687	0,410	
b	0,051	1,70	
Q_{pmax}	4,900	7,6	$g/g.h$
Y_{PS}	0,232	0,486	g/g

Tabela III.4–Valores originais dos parâmetros não estimados do modelo de Daugulis *et al.*(1997)

Parâmetros	Valores
$\mu_{max}(1/h)$	0,41
$P_{ob}(g/L)$	59
$P_{ma}(g/L)$	217
$P_{mb}(g/L)$	108
$P_{me}(g/L)$	120
$K_s(g/L)$	0,5
$K_i(g/L)$	200
$K_{pm}(g/L)$	0,2

III.4 - Programas

Os parâmetros passaram por um primeiro ajuste utilizando o MATLAB 7.6.0 (R2008a) para que fosse possível recorrer a um método de estimação que permitisse uma busca global. O resultado dessa estimação foi refinado fazendo uso de um simulador gratuito chamado EMSO que significa *Environment for Modeling, Simulation, and Optimization*.

O simulador EMSO, desenvolvido por Rafael de Pelegrini Soares, trata-se de um ambiente gráfico de linguagem orientada a objetos onde o usuário pode modelar processo sem estado de equilíbrio dinâmico ou complexo simplesmente selecionando e conectando os blocos do modelo. O usuário pode optar por desenvolver novos modelos utilizando a linguagem de modelagem EMSO ou usar modelos contidos na Biblioteca de modelagem EMSO chamada EML. EML é uma biblioteca de código aberto de modelos escritos na linguagem de modelagem EMSO (Soares e Secchi, 2003).

III.5- Métodos para estimação

Dois métodos foram usados. O primeiro método foi o de busca randômica adaptativa formulado por Secchi e Perlingeiro,(1989) implementado no MATLAB 7.6.0 (R2008a) para que fosse feito uma busca global de um conjunto de parâmetros ótimo. Em seguida, novas estimativas, partindo do conjunto de parâmetros obtido pela busca global, foram realizadas. O objetivo foi que

o conjunto de parâmetros fosse refinado de modo a alcançar uma melhor adequação do modelo ao processo. Para isso empregou-se o método dos poliedros flexíveis (Nelder e Mead 1964) implementado no simulador EMSO.

III.5.1 – Métodos dos poliedros flexíveis

O método dos poliedros flexíveis (Nelder e Mead 1964) minimiza uma função com n variáveis pela formação de um poliedro com $n+1$ vértices. O vértice que remeter ao maior valor da função objetivo sofrerá uma reflexão sendo substituído por um novo vértice colinear com o vértice antigo e o centroide da fase oposta. Deste modo um novo poliedro é formado e todo o procedimento se repetirá até que o limite de tolerância seja atendido (Nascimento *et al.* 1997). As coordenadas do centroide são determinadas pela Equação III.1 (Secchi 2001).

$$x_{0,j} = \frac{1}{n} \left[\sum_{i=1}^{n+1} x_{i,j} - x_{h,j} \right] \quad (\text{III.1})$$

Com :

- $j = 1, 2, 3, \dots, n$
- $x_{h,j}$ = pior vértice

Este método é composto por três outras etapas além da reflexão. São elas a expansão, a redução e a contração, as quais servem para deformar o poliedro em cada iteração. A expansão proporciona um aumento do poliedro para acelerar a busca na direção do mínimo. A contração e a redução proporcionam uma diminuição do poliedro, sendo que na redução são modificados todos os pontos, menos o melhor; e na contração é modificado apenas o pior ponto. A Figura III.1 faz uma representação gráfica do método dos poliedros flexíveis (Secchi 2001) .

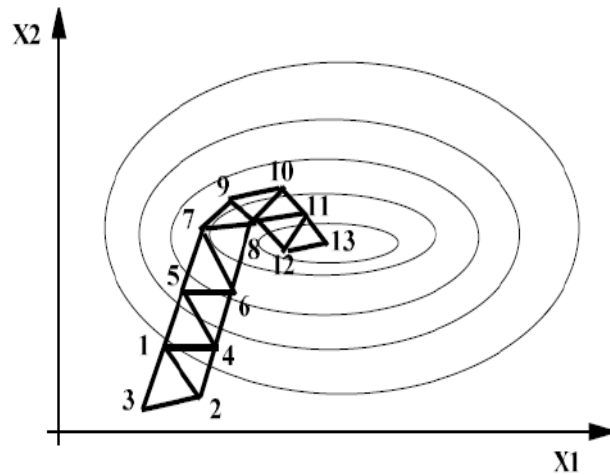


Figura II.3– Ilustração do método de Poliedros flexíveis(Secchi 2001)

III.5.2 – Método de busca randômica adaptativa

O método adotado, como forma de obter um ajuste inicial dos parâmetros, foi o método de busca randômica adaptativa formulado por Secchi e Perlingeiro,(1989). Trata-se de um método não determinístico que se baseia em uma busca aleatória memorizada tendo como característica, uma varredura global da solução. O domínio que deve conter todos os pontos memorizados é regido pela Equação III.2 (Moraes 2011).

$$x_i^{k+1} = x_i^k + \frac{R_i}{\delta} [b_i(a_i\phi_i - 1)]^\delta \quad (\text{III.2})$$

Sendo:

- x^k = o melhor ponto da última amostragem
- ϕ = vetor de números aleatórios sorteados no intervalo [0,1]
- R_i = o vetor dos eixos da hiperelipse
- δ = parâmetro de forma da distribuição das amostras
- a = vetor de assimetria da distribuição
- b = vetor de direção da assimetria

A escolha deste método é justificada por não ser baseado na derivada da função, o que o torna mais eficaz em problemas multimodais, já que reduz o risco de se alcançar um mínimo local ao invés de um mínimo global.

De maneira simplificada, o algoritmo de busca aleatória adaptativa passa pelas seguintes etapas (Moraes 2011):

1. Amostragem de pontos aleatórios com a Equação III.2;
2. Ordenação das amostras com base no valor da função objetivo;
3. Memorização dos melhores pontos das amostras;
4. Verificação dos critérios de convergência;
5. Análise de redundância dos pontos (baseado em uma métrica de análise);
6. Resgate de um ponto da memória;
7. Verificação da tendência da busca;
8. Ajuste dos parâmetros da busca (a , b e δ);
9. Análise do critério de parada;
10. Ordenação dos ótimos.

O critério de parada, analisado na etapa 9, pode ser quando o número máximo de iterações for atingindo ou o valor ótimo local for localizado ou quando ocorre redundância dos pontos.

III.6- Integradores

O integrador utilizado no MATLAB 7.6.0 (R2008a) foi o ode15s. No simulador EMSO o método usado foi o DASSLC. O integrador DASSLC (*Differential-Algebraic System Solver in C*), é uma versão modificada do código DASSL, que utiliza um método de predição-correção com fórmulas BDF (*Backward Differentiation Formula*) de passo e ordem variáveis (Secchi e Pereira 1997).

III.7- Função objetivo

A função objetivo reflete um resíduo envolvendo os valores estimados e os valores experimentais. A função erro o problema tratado neste trabalho na etapa da otimização global está representada matematicamente pela Equação III.3, que tem como objetivo prover um boa estimativa inicial dos parâmetros para estimação determinística.

$$FO = \sum_i \left[\left(\frac{y_{estimado}}{y_{experimental}} \right) - 1 \right]^2 \quad (III.3)$$

Sendo:

- $y_{estimado}$ = vetor com os valores estimados das variáveis X, S, P
- $y_{experimental}$ = vetor com os valores experimentais das variáveis X, S, P

Apesar de ser eleito o modo mais apropriado de obter o resíduo, segundo Schmidell,*et.al* (2001), a fórmula visualizada na Equação III.3 tende a gerar resíduos elevados para valores pequenos da variável experimental.

No simulador EMSO, a função objetivo é descrita matematicamente pela Equação III.4 .

$$FO = \sum_i \left[\frac{(y_{experimental} - y_{estimado})^2}{\sigma_i^2} \right] \quad (III.4)$$

Sendo:

- $y_{estimado}$ = vetor com os valores estimados das variáveis X, S, P.
- $y_{experimental}$ = vetor com os valores experimentais das variáveis X, S, P;
- δ_i = desvio padrão do instrumento de medida;

IV – Resultados

IV.1- Simulação do processo pelo modelo proposto por Daugulis *et al.* (1997)

O conjunto de parâmetros obtido para cada fermentação pode ser visualizado na Tabela IV.1. Logo em seguida é possível visualizar graficamente o comportamento previsto utilizando os parâmetros já ajustados.

Tabela IV.1– Parâmetros estimados do modelo Daugulis *et al.*. (1997) com os dados de Camelo (2009)

Parâmetro	FC01	FC02	FC03	FC04	FC05	FC06
α	1,997	4,309	1,087	1,401	4,404	4,043
β (1/h)	1,904	0,032	1,689	1,908	2,282	2,825
λ (L*h/g)	0,748	3,368	0,449	0,730	0,006	0,436
δ	5,043	0,766	3,056	1,860	0,088	0,776
a	1,062	3,383	1,931	2,083	0,449	0,237
b	0,826	0,537	0,063	0,171	0,113	0,155
Q_{pmax} (1/h)	10,000	6,062	10,464	5,659	2,868	2,915
Y_{PS}	0,336	0,262	0,406	0,397	0,368	0,399

A fermentação 01 foi alimentada com uma concentração de substrato inferior a 200g/L. Conforme encontrado no trabalho de Camelo (2009), fermentações com *Zymomonas mobilis* com concentrações de substrato inferior a 200g/L não apresentam comportamento oscilatório, o que pode ser comprovado na Figura IV.1.

Apesar de o resultado ser satisfatório, observa-se falhas na simulação do regime batelada em relação ao comportamento do produto. A concentração de produto estimada foi inferior ao valor real. Provavelmente o valor relativamente baixo da variável “a” gerou valores de taxa de

produção de produto inferiores que consequentemente desencadeou em baixas concentrações de produto.

A concentração de produto também não conseguiu alcançar o maior valor experimental. É possível que isso tenha ocorrido devido à concentração de biomassa que também não alcançou os valores experimentais mais altos, já que pela Equação III.34, a concentração de biomassa contribui positivamente para a formação de etanol.

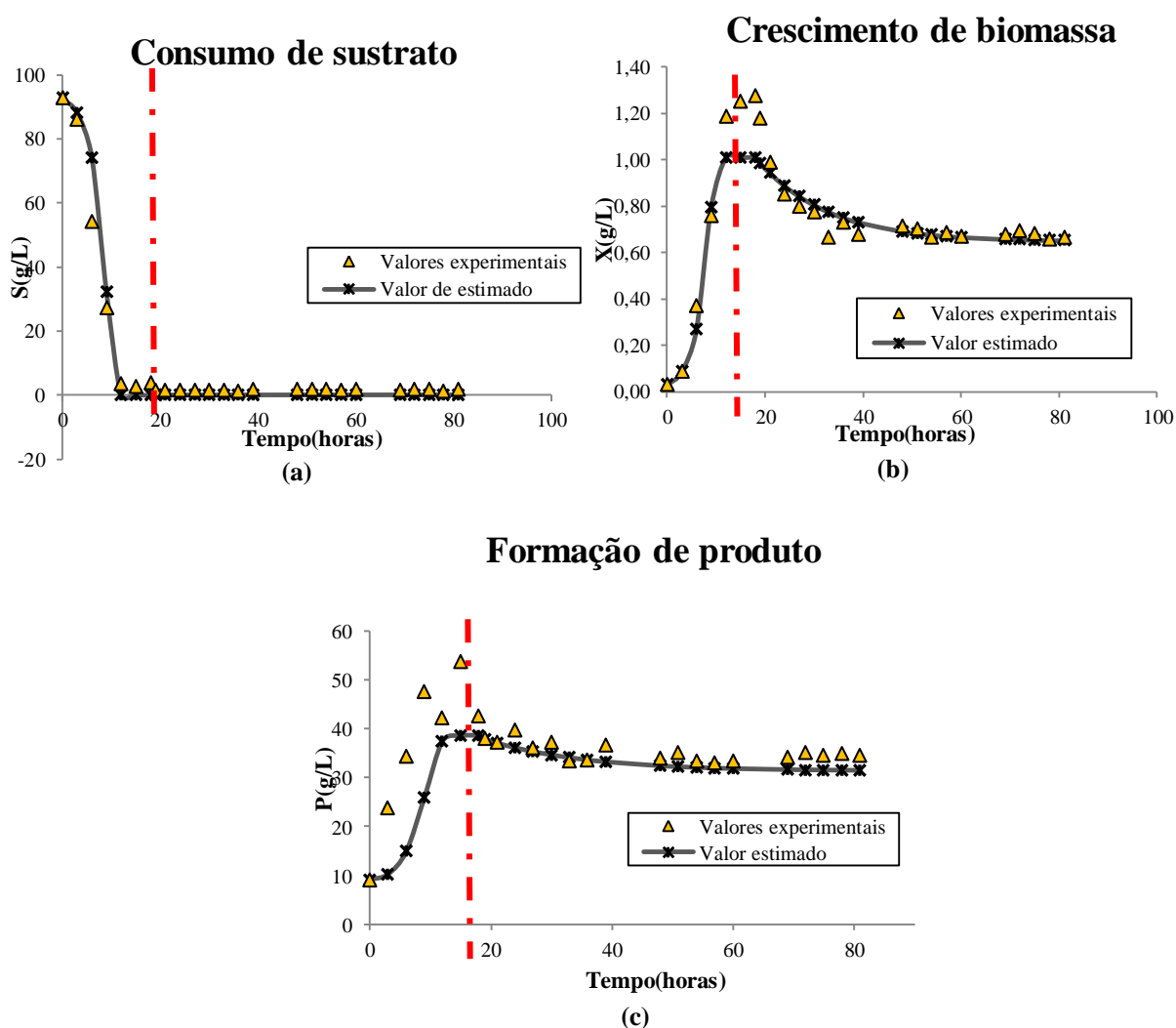


Figura IV.1 - Resultado da estimação de parâmetros para FC01 utilizando o modelo proposto por Daugulis *et al.* (1997)/(a) consumo de sustrato;(b) crescimento celular; (c) geração de produto

De modo semelhante ao que ocorreu com FC01, a taxa de produção de etanol baixa na fermentação 02 provocou valores de concentração de etanol baixos (Figura IV.2).

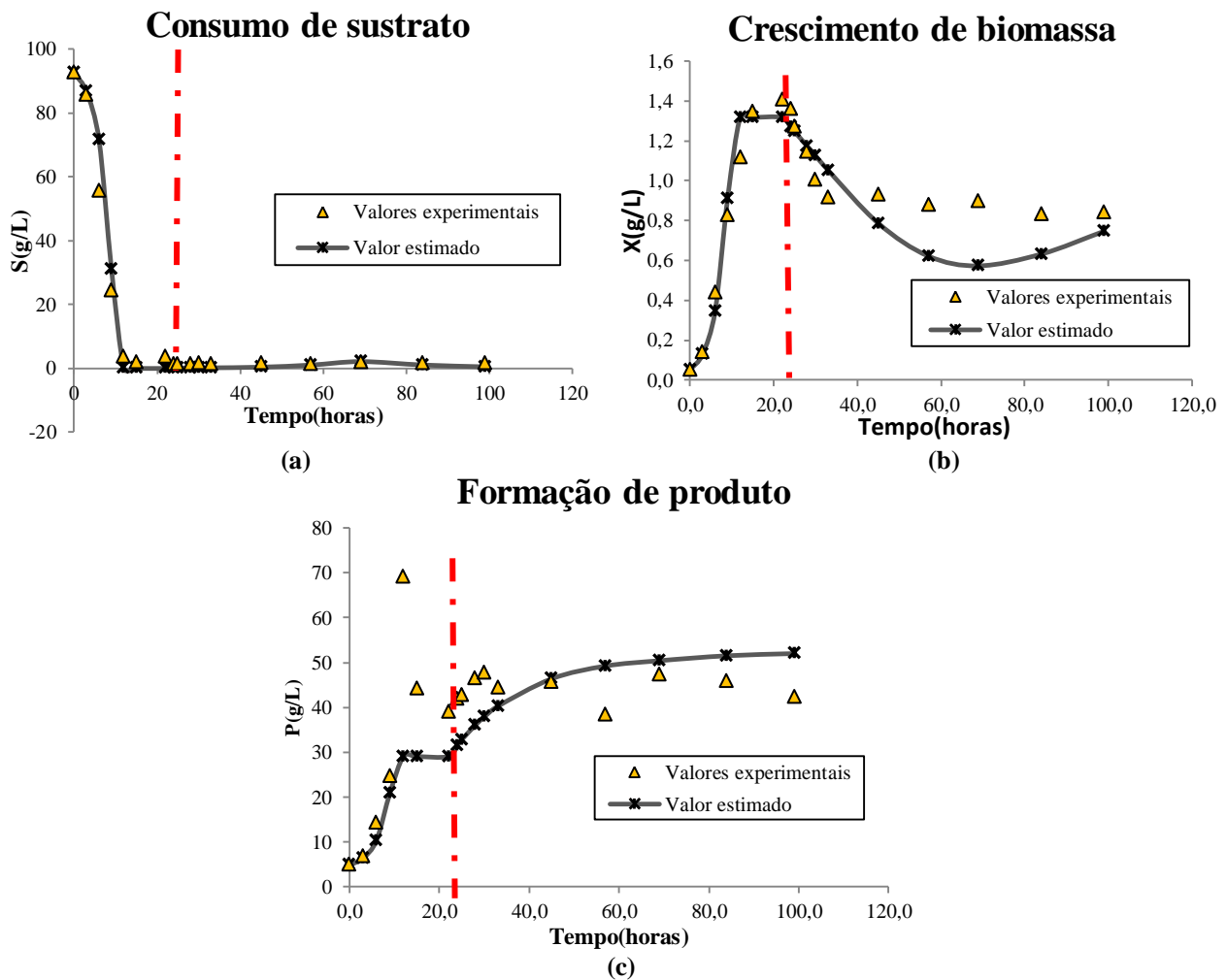


Figura IV.2 - Resultado da estimação de parâmetros para FC02 utilizando o modelo proposto por Daugulis *et al.*(1997)/(a) consumo de substrato;(b) crescimento celular; (c) geração de produto

O modelo de Daugulis *et al.* (1997) mostrou se satisfatório na fermentação 03 (Figura IV.3). Entretanto o modelo não foi capaz de prever a pequena queda na produção de etanol no regime contínuo. Os valores elevados de etanol ocasionaram, depois de um tempo, a queda na concentração de biomassa.

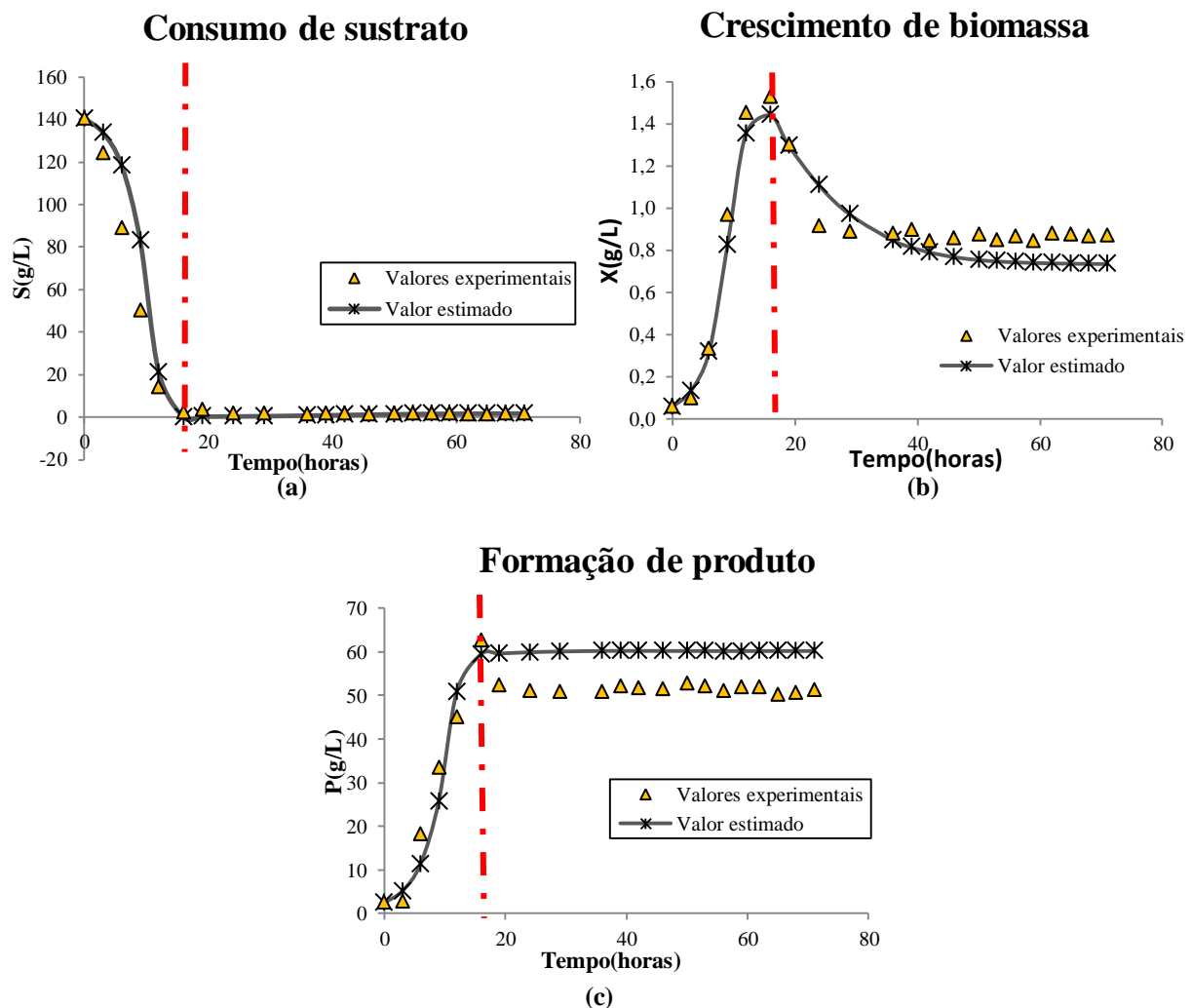


Figura IV.3 - Resultado da estimação de parâmetros para FC03 utilizando o modelo proposto por Daugulis *et al.* (1997)/(a) consumo de sustrato; (b) crescimento celular; (c) geração de produto

Na fermentação 04 a simulação do comportamento da concentração de produto não foi promissora (Figura IV.4). Os valores estimados de etanol foram acima do valor real favorecido pela concentração de biomassa. Entretanto, apesar da alta concentração de produto e da inibição ao crescimento provocada por etanol, visto que P é maior que P_{ob} , a concentração de biomassa prevista correspondeu satisfatoriamente ao processo real.

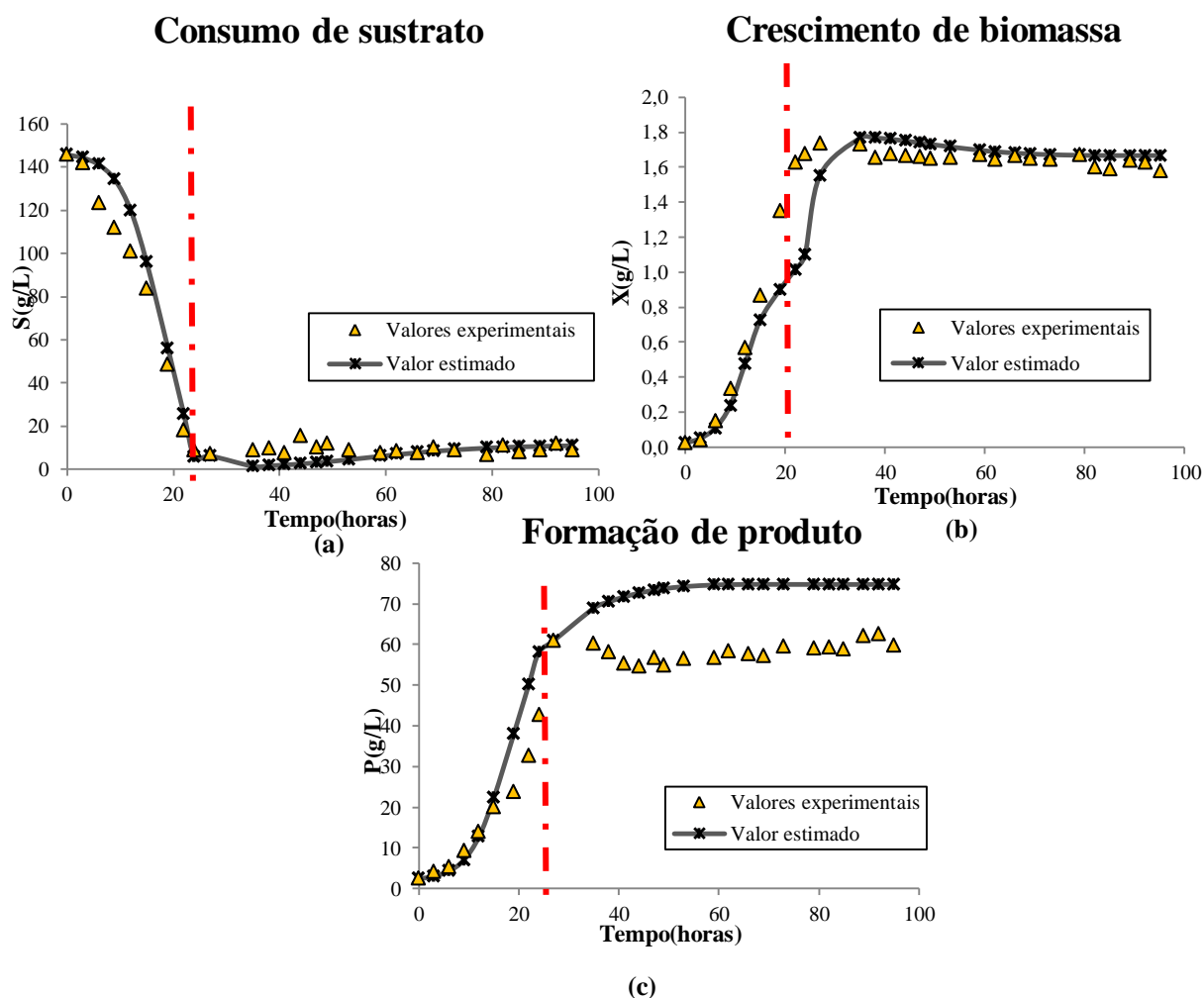


Figura IV.4 - Resultado da estimação de parâmetros para FC04 utilizando o modelo proposto por Daugulis *et al.*(1997)/(a) consumo de substrato;(b) crescimento celular; (c) geração de produto

Nas fermentações 05 e 06 o modelo de Daugulis *et al.*(1997) mostrou dificuldades em prever as oscilações sustentadas. O que se observa nas Figuras IV.5 e IV.6, é que em ambas fermentações foi no comportamento do substrato que o modelo teve o seu pior desempenho . De fato, as oscilações também aparecem nos valores estimados, porém não seguem na mesma amplitude ao longo do processo.

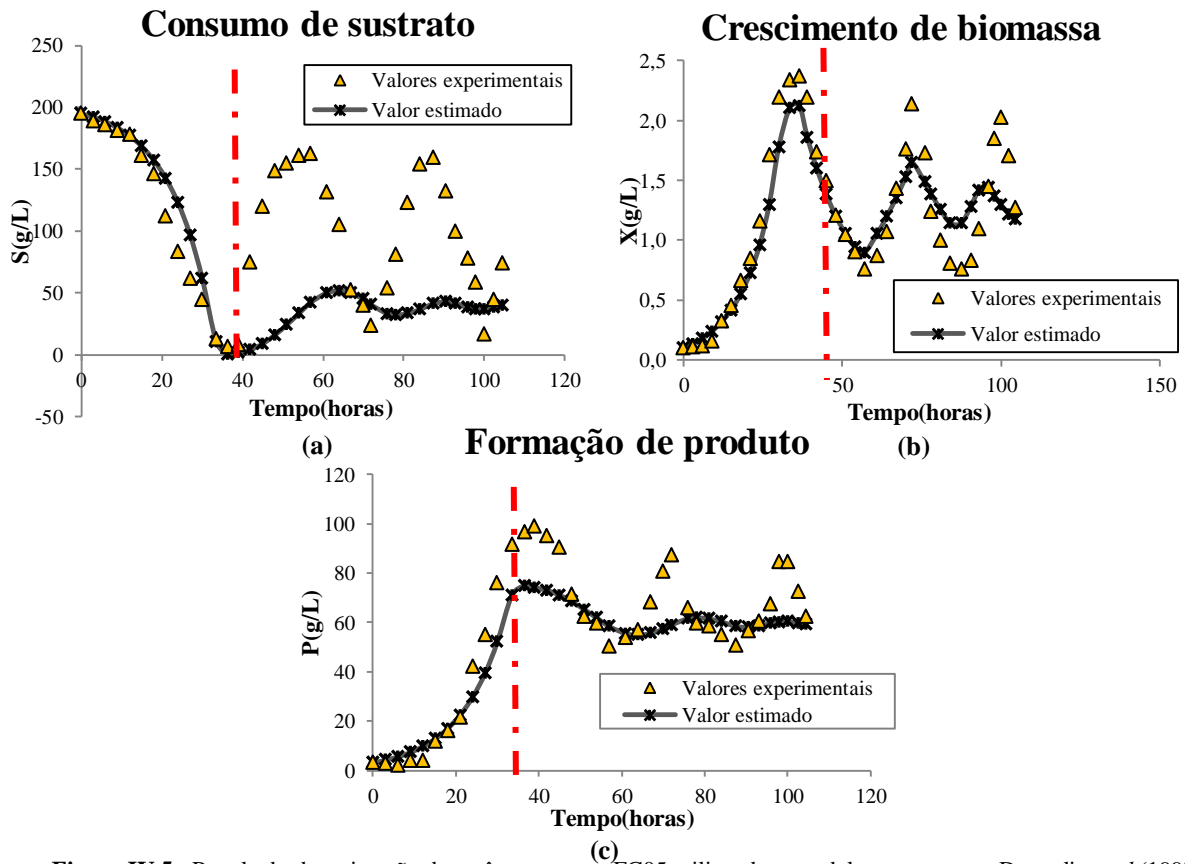


Figura IV.5 - Resultado da estimação de parâmetros para FC05 utilizando o modelo proposto por Daugulis *et al.* (1997)/(a) consumo de substrato;(b) crescimento celular; (c) geração de produto

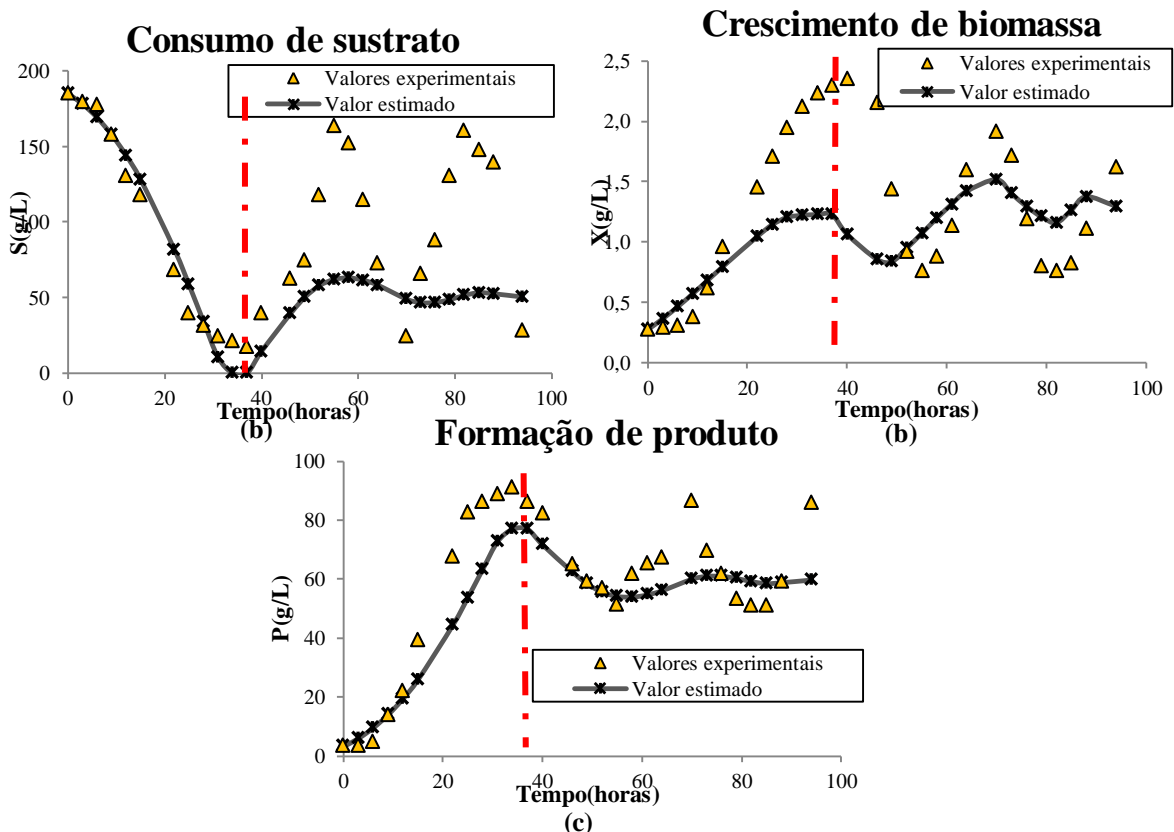


Figura IV.6 - Resultado da estimação de parâmetros para FC06 utilizando o modelo proposto por Daugulis *et al.* (1997)/(a) Gráfico de consumo de substrato;(b)Gráfico de crescimento celular; (c)Gráfico de geração de produto

IV.2- Simulação do processo pelo modelo proposto por Jöbses *et al.*(1986)

Os parâmetros estimados estão representados pela Tabela IV.2 e as simulações estão apresentadas graficamente em seguida. Analisando os gráficos é possível constatar que o modelo de Jöbses *et al.*(1986) não é capaz de prever de forma satisfatória o comportamento das variáveis de estado da maneira como foi implementado. Principalmente para concentrações de substrato acima de 200g/L, como ocorreu nas fermentações 05 e 06, onde o comportamento oscilatório aparece. O modelo apresentou significativas falhas que inviabilizam sua aplicação no desenvolvimento de estratégias de controle.

Confrontando com os resultados obtidos pelo modelo de Daugulis *et al.*(1997), observa-se que os resultados para o modelo proposto por Daugulis *et al.*(1997) foram mais promissores que o proposto por Jöbses *et al.*(1986). Possivelmente considerar a inibição ao crescimento celular causada por substrato em sua estrutura, favoreceu o melhor desempenho do modelo Daugulis *et al.*(1997) em relação ao modelo de Jöbses *et al.*(1986).

Tabela IV.2– Parâmetros estimados do modelo Jöbses *et al.*(1986) com os dados de Camelo (2009)

Parâmetro	FC01	FC02	FC03	FC04	FC05	FC06
$K_e(L^2/g^2/h)$	1,66E-04	1,18E-04	5,88E-05	2,06E-05	3,08E-05	4,14E-05
$K_s(g/L)$	3,558	3,787	3,971	3,759	7,998	3,996
$c_1(g/L)$	214,961	82,762	222,226	68,290	166,650	155,136
$c_2(g/L)$	40,619	103,432	74,916	320,039	71,335	59,013
$\mu_{max}(1/h)$	0,995	1,000	0,991	0,998	0,998	0,220
$m_s(1/h)$	2,575	2,599	2,600	2,095	1,016	0,508
$m_p(1/h)$	0,017	1,701	3,003	1,009	2,477	2,001
y_{sx}	0,011	0,007	0,012	0,014	0,010	0,003
y_{px}	0,022	0,030	2,410	0,063	0,803	0,008
$C_{E0}(g/L)$	0,00016	0,00022	0,00034	0,00026	0,00027	0,00096

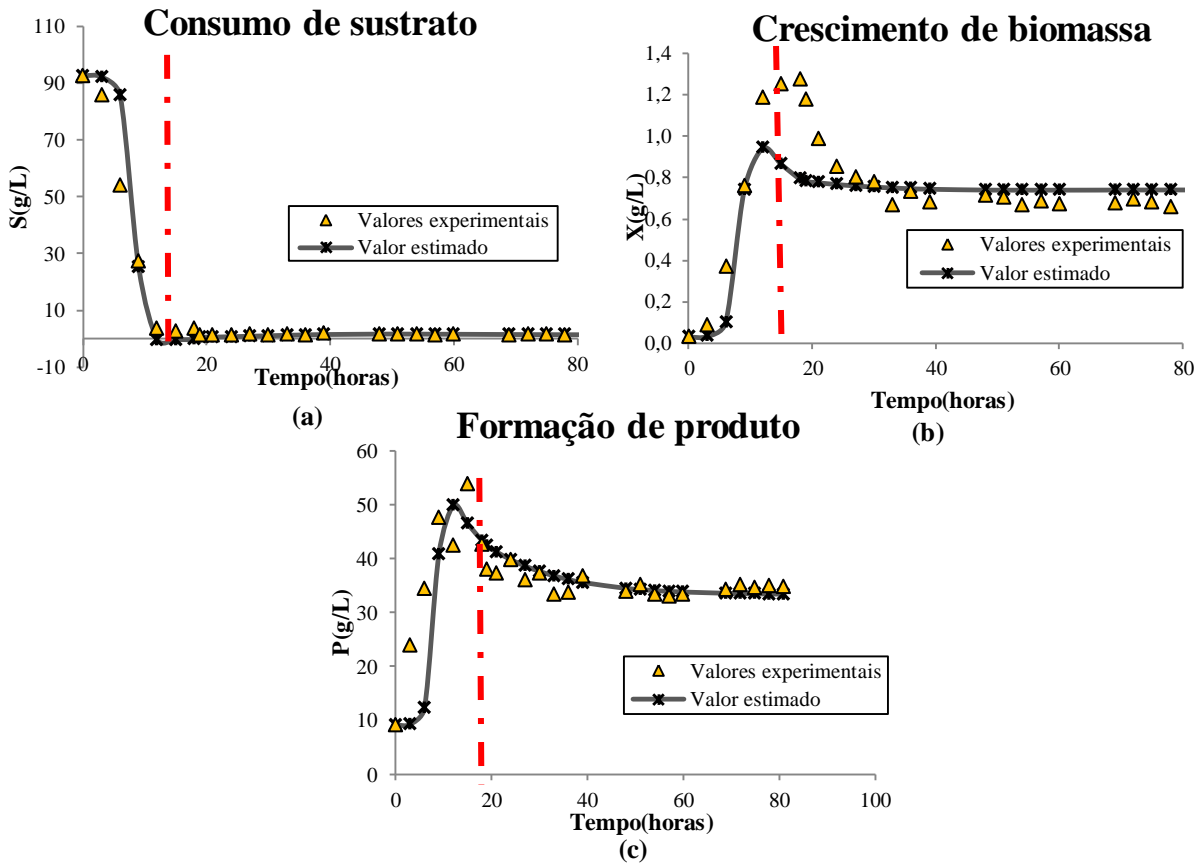


Figura IV.7- Resultado da estimação de parâmetros para FC01 utilizando o modelo proposto por Jöbbses *et al.*(1986)/(a) consumo de substrato;(b) crescimento celular; (c)geração de produto

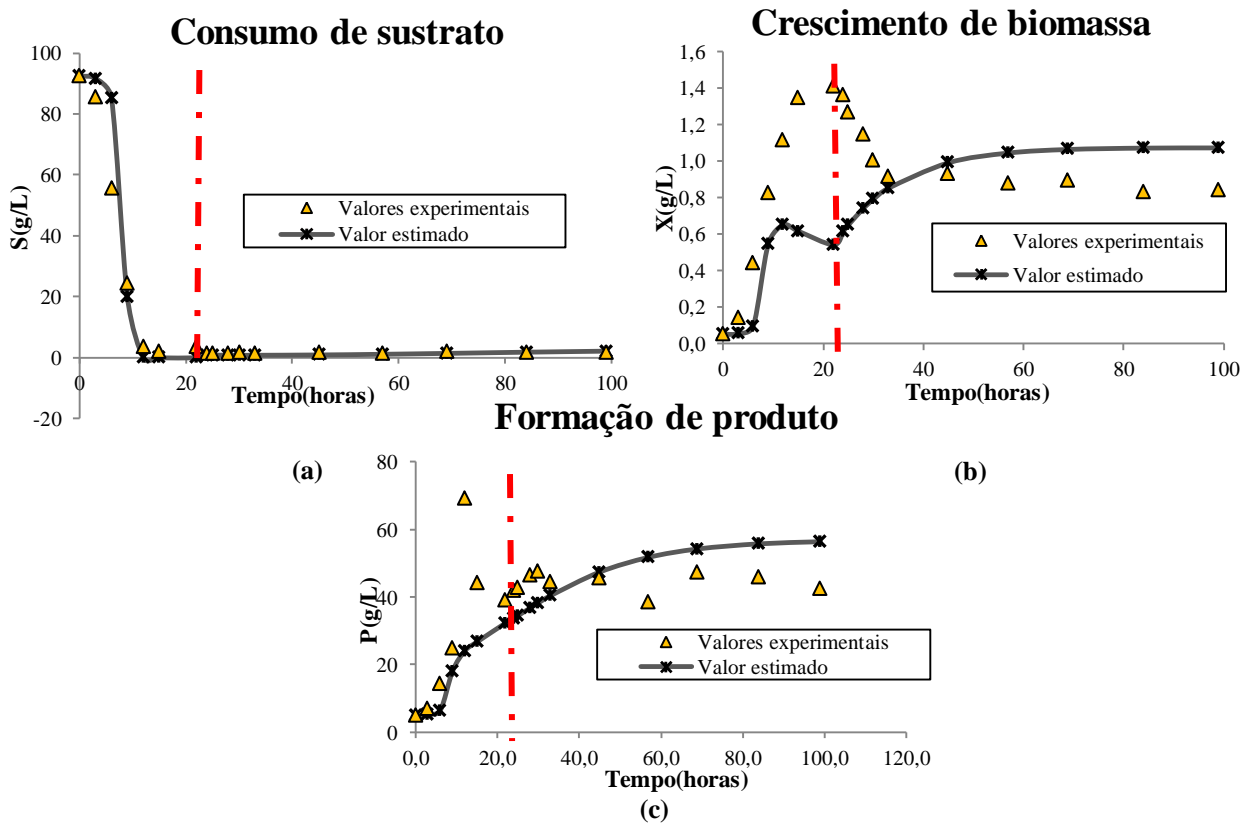


Figura IV.8- Resultado da estimação de parâmetros para FC02 utilizando o modelo proposto por Jöbbses *et al.*(1986)/(a) consumo de substrato;(b) crescimento celular; (c)geração de produto

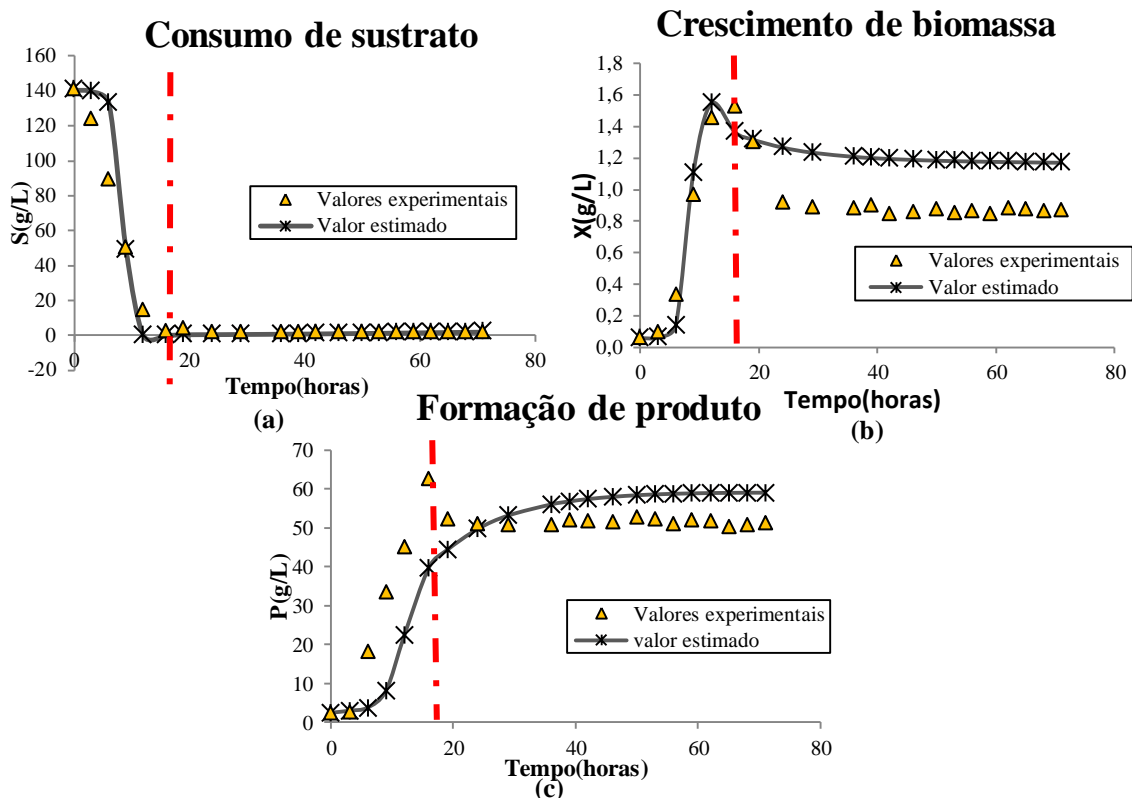


Figura IV.9- Resultado da estimação de parâmetros para FC03 utilizando o modelo proposto por Jöbses *et al.*(1986)/(a) consumo de substrato;(b) crescimento celular; (c)geração de produto

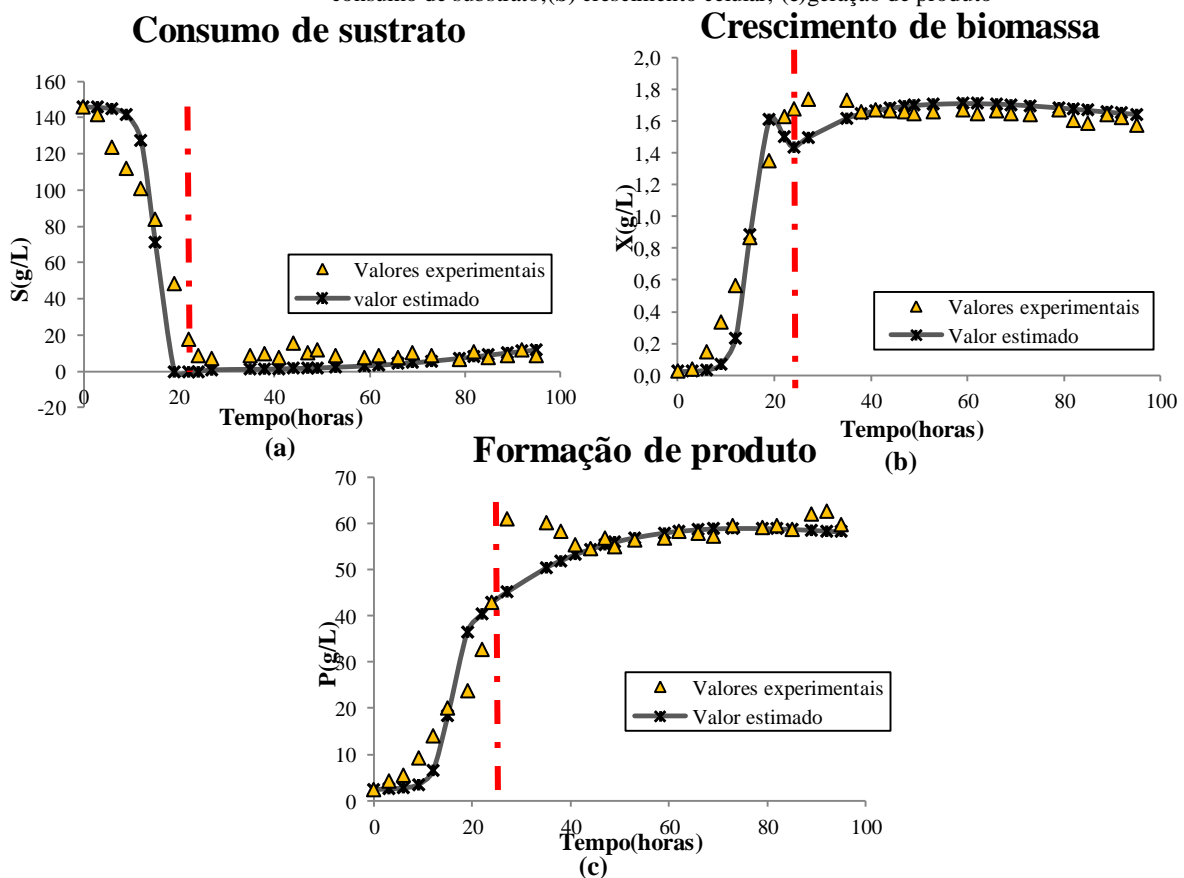


Figura IV.10- Resultado da estimação de parâmetros para FC04 utilizando o modelo proposto por Jöbses *et al.*(1986)/(a) consumo de substrato;(b) crescimento celular; (c)geração de produto

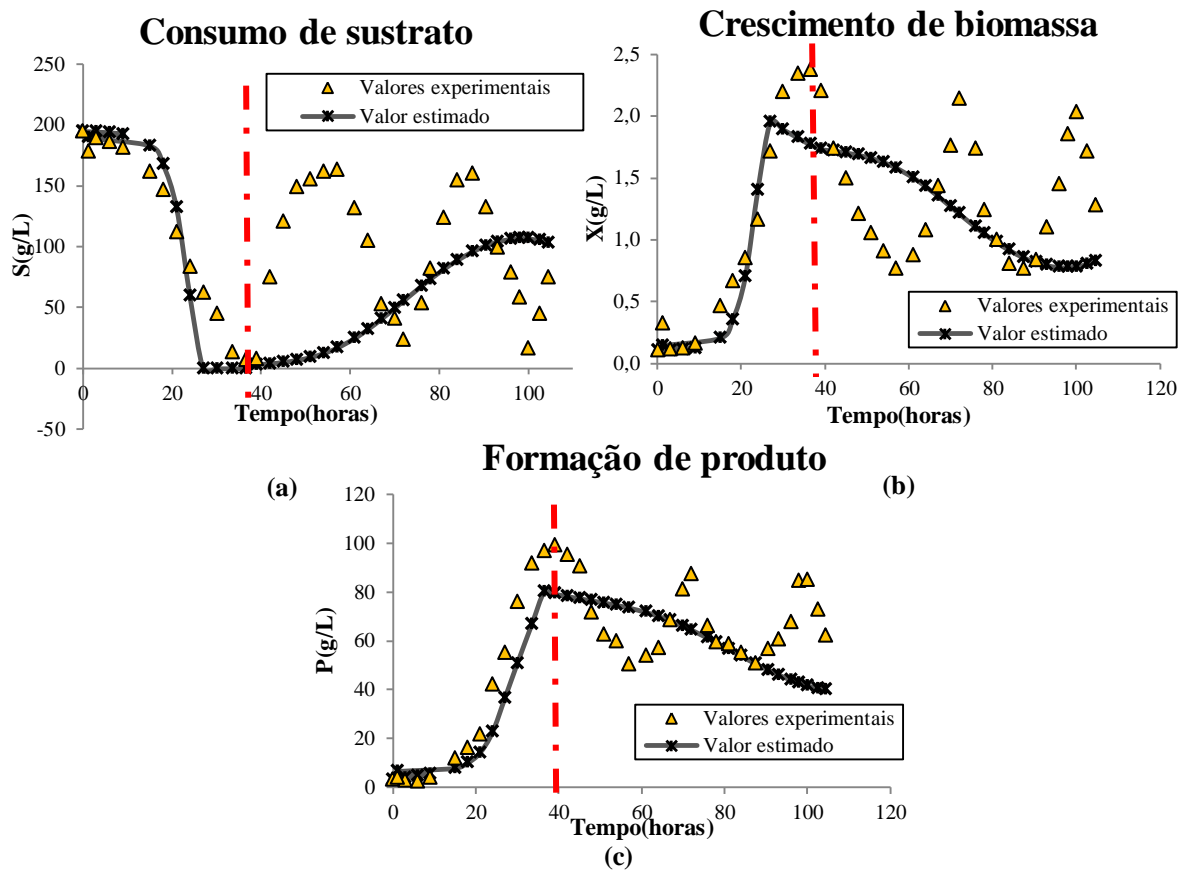


Figura IV.11- Resultado da estimação de parâmetros para FC05 utilizando o modelo proposto por Jöbses *et al.*(1986)/(a) consumo de substrato;(b) crescimento celular; (c)geração de produto

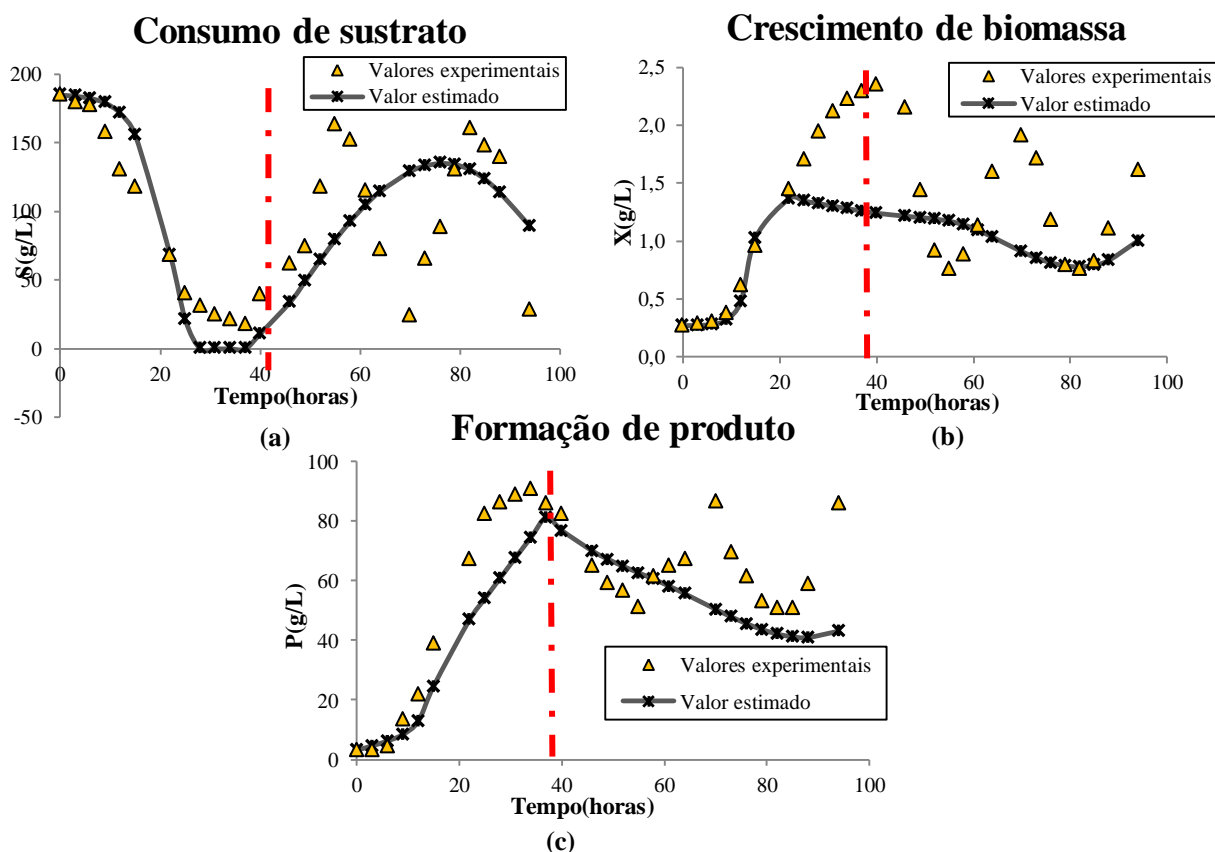


Figura IV.12- Resultado da estimação de parâmetros para FC06 utilizando o modelo proposto por Jöbses *et al.*(1986)/(a) consumo de substrato;(b) crescimento celular; (c)geração de produto

V - Conclusões e sugestões para o trabalho

V.1- Conclusões

As fermentações 01, 03 e 04, ambos os modelos obtiveram desempenhos semelhantes e satisfatórios. As simulações também mostraram que a descrição do processo inicial em regime batelada foi mais eficaz que o processo em regime contínuo.

Entretanto o modelo sugerido por Daugulis *et al.*(1997) mostrou-se superior ao modelo desenvolvido por Jöbses *et al.* (1986) para descrever as oscilações, ou seja, nas fermentações 05 e 06. Todavia a amplitude alcançada nas simulações da concentração de substrato, obtidas com o modelo de Jöbses *et al.* (1986), foram maiores quando comparadas ao modelo de Daugulis *et al.*(1997).

A inibição indireta representada pelo componente E , no modelo de Jöbses *et al.*, (1986) contribuiu para a rigidez nas simulações das fermentações. Visto que a elevação ou a redução da concentração deste elemento provocou um rápido crescimento celular, já previsto pela Equação II.1, que acarretou em um rápido consumo de substrato. O esgotamento do substrato inviabiliza o surgimento do comportamento oscilatório ao longo da fermentação.

Na fermentação 02 a modelagem também não obteve o hesito esperado. Tanto o modelo estruturado por Daugulis *et al.*(1997) quanto o modelo estruturado por Jöbses *et al.* (1986) tiveram dificuldades de descrever o comportamento da concentração de produto mesmo sem a presença de oscilações. O valor máximo alcançado pela concentração de produto não foi alcançado por nenhum dos modelos e ambos previram, de forma incorreta, um atraso no alcance do equilíbrio.

Foi possível obter apenas um conjunto de parâmetros para a fermentação 05 e outro para a fermentação 06, o que pode ser considerado vantajoso em relação aos resultados obtidos por

Camelo (2009), a qual gerou um conjunto de parâmetros para a parte da fermentação em regime batelada e outra para fase em regime contínuo.

A modificação proposta ao modelo de Daugulis *et al.*(1997), descrevendo o Coeficiente de rendimento de glicose em etanol ($y_{P/S}$) como uma variável linear dependente da concentração de biomassa e não como um parâmetros, não apresentam resultados relevantes sendo esta opção descartada.

V.2- Sugestões

Uma análise dos diagramas de bifurcação dos modelos matemáticos utilizados é relevante, já que tanto o modelo proposto por Daugulis *et al.*(1997) quanto o proposto por Jöbses *et al.* (1986) são modelos contínuos compostos por mais de três equações diferenciais não lineares havendo, portanto a possibilidade de ocorrência de caos (Willians 1997). Os fenômenos de bifurcação e caos são observados em sistemas não lineares e são caracterizados como um termo de mudança qualitativa no diagrama de fase de um sistema dinâmico provocado pela variação de algum parâmetro de controle. A presença de uma bifurcação pode alterar tanto a estabilidade do sistema quanto o número de soluções no equilíbrio (Bequette, 1998). Em decorrência do que foi apresentado e dos resultados apresentados no presente trabalho, torna-se de suma importância que os posteriores trabalhos executem esta análise.

A análise estatística dos parâmetros estimados e do modelo seria interessante visto que serve como ferramenta para análise da confiabilidade dos parâmetros estimados e também para julgar se o modelo é adequado ou não para prever determinado processo.

Por fim, os dados mostram que ambos os modelos tem potencial para serem usados em modelagem e controle de processos fermentativos com *Zymomonas mobilis*. Justifica se então a criação de pesquisas que objetivem desenvolver propostas de modificações na estrutura de ambos, visando uma melhor adequação dos mesmos ao processo fermentativo em questão.

VI – Referência Bibliográfica

BEQUETTE, B. W., Process Dynamics: Modeling and Numerical Methods, **Prentice Hall**, Inc. New Jersey, 1998.

BRUCE, L.; AXFORD, D.; CISZEK, B.; DAUGULIS, A., Extractive fermentation by *Zymomonas mobilis* and the control of oscillatory behavior. **Biotechnology letters**, v. 13, n. 4, p. 291–296, 1991.

CAMÊLO, A. C. R., Investigação do comportamento dinâmico na produção contínua de etanol por *Zymomonas mobilis*, **Tese de Doutorado**, COPPE- PEQ/UFRJ, Universidade Federal do rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2009.

DAUGULIS, A J.; MCLELLAN, P. J.; LI, J., Experimental investigation and modeling of oscillatory behavior in the continuous culture of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 56, n. 1, p. 99–105, 1997.

FALCÃO DE MORAIS, J. O., *Zymomonas mobilis* e o seu emprego como agente de fermentação alcoólica, **Revista do Instituto de Antibióticos**, 1, pp 169-182, 1982.

GARCIA-CRUZ, C. H.; Ernandes F. M. P. G., *Zymomonas mobilis*: um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 30, p. 361–380, 2009.

GHOMMIDH, C.; VAIJA, J.; BOLARINWA, S.; NAVARRO, J., Oscillatory behaviour of *Zymomonas* in continuous cultures: A simple stochastic model. **Biotechnology Letters**, v. II, n. 9, p. 659–664, 1989.

JARZĘBSKI, A., Modelling of oscillatory behaviour in continuous ethanol fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 2, p. 137–142, 1992.

JÖBSES, I. M.; EGBERTS, G. T.; LUYBEN, K. C.; ROELS, J. A., Fermentation kinetics of *Zymomonas mobilis* at high ethanol concentrations: Oscillations in continuous cultures. **Biotechnology and bioengineering**, v. 28, n. 6, p. 868–77, 1986.

LEE, K. J.; ROGERS, P. L., The fermentation kinetics of ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **The Chemical Engineering Journal**, v. 27, n. 2, p. B31–B38, 1983.

LEE, K.; TRIBE, D.; ROGERS, P., Ethanol production by *Zymomonas mobilis* in continuous culture at high glucose concentrations. **Biotechnology Letters**, v. 1, n. 2, p. 421–426, 1979.

LI, J.; MCLELLAN, P.; DAUGULIS, A., Inhibition effects of ethanol concentration history and ethanol concentration change rate on *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology letters**, v. 17, n. 3, p. 321–326, 1995.

- MENDES, A. J. B.; VALDMAN, B.; SOUZA, M., Uma revisão de modelagem matemática em bioprocessos. parte I: Fundamentos básicos e classificação. **Ciência e Tecnologia**, p. 40–59, 2011.
- MILANEZ, A.; NYKO, D.; GARCIA, J., O déficit de produção de etanol no Brasil entre 2012 e 2015: determinantes, consequências e sugestões de política. **BNDES SETORIAL**, p. 277–302, 2012.
- MORAES, A. O. S., Desenvolvimento e implementação de versões paralelas do algoritmo do enxame de partículas em clusters utilizando MPI, **Dissertação de mestrado**, COPPE/PEQ, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2011.
- NASCIMENTO JÚNIOR; CAIRO, L.; TAKASHI Y., Inteligência Artificial em Controle e Automação, **Editora Edgard Blucher LTDA**, São Paulo, SP, Brasil, 2000.
- NELDER, J. A.; MEAD R., A simplex method for function minimization. **Computer Journal**; p. 308–313, 1965.
- NETO, A. M. R., Investigação do Comportamento Dinâmico das *Zymomonas mobilis* em CSTBR's Perfeitamente Agitados Através de diagramas de Bifurcação. **Dissertação Mestrado**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 2006
- PIRT, S.J., Principles of Microbe and Cell Cultivation. London: **Blackwell Scientific Publication**, 1975
- RANZAN, C., Fermentação Contínua de *Zymomonas mobilis*: Modelagem, Ajuste de Parâmetros e Inferências a Partir do Consumo de Hidróxido de Sódio Fermentação Contínua de *Zymomonas mobilis*, **Dissertação de mestrado**, Departamento de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade federal do rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, RGS, 2010.
- SCHMIDELL, W.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U.A., Biotecnologia Industrial. São Paulo, **Edgard Blücher Ltda**, vol.4, 2001.
- SECCHI, A. Otimização de processos, **Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química**, v. 9, 2001.
- SOARES, R. D. P.; SECCHI, A. R., EMSO : A New Environment for Modelling, Simulation and Optimisation. Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RGS, Brasil, 2003.
- VEERAMULLU, U.; AGRAWALL, P., A structured kinetic model for *Zymomonas mobilis* ATCC10988, **Biotechnology Bioengineering**, **36:694-704, 1990**.
- WILLIAMS, G. P., Chaos theory tamed, Joseph Henry Press. Washington, 1997
- TOMA, M. M.; KALNENIEKS, U.; BERZINS, A.; VIGANTS, A.; RIKMANIS, M.; VIESTURS, U., The effect of mixing on glucose fermentation by *Zymomonas mobilis* continuous culture, **Process Biochemistry**, London, v. 38, p. 1347-1350, 2003.

Apêndice

Apêndice A - Rotinas implementadas no MATLAB 7.6.0 (R2008a)

Apêndice A.1- Arquivo com o modelo proposto por Daugulis *et al.*(1997)

```
Function dx=daugulis(t,x)
```

```
dx=zeros(5,1);
```

```
global mumax pob pma pmb pme ks ki kpm si alpha beta lambda delta a b qpmax yps V F
```

```
%\Modelo Daugulis//
```

```
%Volume do reator
```

```
V=1;
```

```
% Tempo de início da fermentação contínua
```

```
ti = VALOR DO TEMPO DE INÍCIO DA FERMENTAÇÃO CONTÍNUA;
```

```
%Variáveis de entrada da vazão
```

```
if t < ti
```

```
se = 0; %* 'g/l';
```

```
F = 0; %* 'l/h';
```

```
else
```

```
se = VALOR DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO ALIMENTADA;%*'g/l';
```

```
F = 0.06;% * 'l/h'
```

```
end
```

```
%Definindo taxa de diluição
```

```
D = F/V;
```

```
%Equação de fb
```

```
if x(3) <= pob
```

```
fp = 1;
```

```
end
```

```
if x(3) >= pob
```

```
if x(3) < pmb
```

```
fp = 1 - ((x(3)-pob)/(pmb-pob))^b;
```

```

        end
    end

    if x(3) > pmb
        fp = 0;
    end

%Equação de gs
    if x(1) <= si
        gs = 1;
    end

    if x(1) >= si
        gs = ((ki-si)/((ki-si)+(x(1)-si)));
    end

%Equações auxiliares
    mu1 = (mumax*x(1)*(1-((x(3)/pma)^a))*fp)/(ks +(x(1)/gs));
    fmu = 0.5*((1-(exp(lambda*x(4)-delta)-exp(-lambda*x(4)+delta))/(exp(lambda*x(4)-delta)+exp(-lambda*x(4)+delta))));
    qp = ((qpmax*x(1))/(kpm+x(1)))*(1-(x(3)/pme)^alpha);

%Equações do modelo
    %Cinética de consumo de substrato
    dx(1) = (D*(se-x(1)))-((qp*x(2))/yps);%dsdt
    %Cinética de crescimento celular
    dx(2) = mu1*fmu*x(2) - D*x(2);%dxdt
    %Cinética da formação do produto
    dx(3) = qp*x(2)-D*x(3);%dpdt
    %Média ponderada da taxa de mudança da concentração de etanol
    dx(4) = beta*(x(5)-x(4));%dzdt
    %Efeito da média ponderada de primeira ordem da taxa de variação da concentração de etanol
    dx(5) = beta*(qp*x(2)-D*x(3)-x(5));%dwdt

end

```

Apêndice A.2- Arquivo com os dados de entrada do modelo proposto por Daugulis *et al.*(1997)

```

function J = daugulis_in(d0)

global alpha beta lambda delta a b qpmax yps

```

`%\%%\Simulação do processo modelo Daugulis%\%%`

`%Entrada dos parâmetros estimados no modelo estimacaodaugulis1a`

```
alpha = d0(1);
beta = d0(2);
lambda = d0(3);
delta = d0(4);
a = d0(5);
b = d0(6);
qpmax = d0(7);
ypsp = d0(8);
```

`% Valores iniciais`

```
x0 = CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA INICIAL;
s0 = CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO INICIAL;
p0 = CONCENTRAÇÃO DE PRODUTO INICIAL;
z0 = 0;
w0 = 0;
```

`% Tempo de fermentação`

```
tspan = [VETOR CONTENDO OS TEMPOS QUE OCORRERAM AS MEDIÇÕES];
n=length(tspan);
```

`% Resolução do sistema de equações ordinárias`

```
[t,x]=ode15s(@daugulis,tspan,[s0 x0 p0 z0 w0]);
```

`% Valor experimentais`

```
Xexp = [VETOR VALOR EXPERIMENTAL DAS CONCENTRAÇÕES DE
BIOMASSA];
Sexp = [VETOR VALOR EXPERIMENTAL DAS CONCENTRAÇÕES DE
SUBSTRATO];
Pexp = [VETOR VALOR EXPERIMENTAL DAS CONCENTRAÇÕES DE
PRODUTO];
```

`%\%%\Cálculo do erro J%\%%`

`%Formando a matrix de resíduos`

```
if t(end) < tspan(end)
    res=ones(3,n)*1e10;
else
    yexp = [Xexp; Sexp; Pexp];
    ymod = [x(:,2)'; x(:,1)'; x(:,3)'];
    res = (ymod./yexp) - 1;
```

```
end
```

```
%Formando o J  
J = res(:)'*res(:)
```

Apêndice A.3- Rotina para ajuste dos parâmetros do modelo proposto por Daugulis *et al.*(1997)

```
%////////////////////////////////////Estimacao de parametros////////////////////////////////////
```

```
clearall  
clc
```

```
global alpha beta lambda delta a b qpmaxyps
```

```
%Parâmetros a serem estimados  
% alpha beta lambda delta a b qpmaxyps
```

```
alpha0 = VALOR INICIAL;  
beta0 = VALOR INICIAL;  
lambda0 = VALOR INICIAL;  
delta0 = VALOR INICIAL;  
a0 = VALOR INICIAL;  
b0 = VALOR INICIAL;  
qpmax0 = VALOR INICIAL;  
yps0 = VALOR INICIAL;
```

```
%Chute inicial  
d0 = [alpha0 beta0 lambda0 delta0 a0 b0 qpmax0 yps0];
```

```
%Limites de Busca  
Lb=[VETOR COM OS LIMITES INFERIORES DE BUSCA PARA d0];  
Ub=2*[ VETOR COM OS LIMITES INFERIORES DE BUSCA PARA d0]  
  
RESIDUAL=[];
```

```
%Chamada da rotina para a estimacao de parametros  
[d,Ot,nS]=buscarndb('daugulis_in',d0,-1,1,20,Lb,Ub,[],1e-4,2000,ones(1,np),[],5)
```

```
% Valor do parâmetro encontrado
```

```

alpha = d(1)
beta = d(2)
lambda = d(3)
delta = d(4)
a = d(5)
b = d(6)
qpmax = d(7)
yps = d(8)
Ot
RESIDUAL

```

```
d = [alpha;beta;lambda;delta;a;b;qpmax;yps];
```

%\Obtenção e plotagem dos resultados obtidos de posse dos parâmetrosestimados/

```

% Valores iniciais
x0 = CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA INICIAL;
s0 = CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO INICIAL;
p0 = CONCENTRAÇÃO DE PRODUTO INICIAL;
z0=0;
w0=0;

% Tempo de fermentação
tspan = [ VETOR CONTENDO OS TEMPOS QUE OCORRERAM AS
MEDIÇÕES];

% Resolução do sistema de equações ordinárias
[t,x]=ode15s(@daugulis,tspan,[s0 x0 p0 z0 w0]);

% Valor experimentais
Xexp = [ VETOR VALOR EXPERIMENTAL DAS CONCENTRAÇÕES DE
BIOMASSA];
Sexp = [ VETOR VALOR EXPERIMENTAL DAS CONCENTRAÇÕES DE
SUBSTRATO];
Pexp = [ VETOR VALOR EXPERIMENTAL DAS CONCENTRAÇÕES DE
PRODUTO];

% Representação dos resultados
figure(1)
subplot(3,1,1)
plot(t,x(:,1),'r-',tspan ,Sexp,'k^')
title('Variação da concentração de substrato')

subplot(3,1,2)
plot(t,x(:,2),'b-',tspan ,Xexp,'mo')

```

```

title('Variação da concentração de biomassa')

subplot(3,1,3)
plot(t,x(:,3),'c-',tspan ,Pexp,'g*')
title('Variação da concentração de produto')

```

Apêndice A.4- Arquivo com o modelo proposto por Jöbsses *et al.*(1986)

```

function dx=jobses(t,x)
dx=zeros(4,1);

global ke ks c1 c2 mimax ms mp ysx ypx V F se

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%Modelo Jobses%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Volume do reator
V=1;

% Tempo de início da fermentação contínua
ti = VALOR DO TEMPO DE INÍCIO DA FERMENTAÇÃO CONTÍNUA;

% Variáveis de entrada da vazão
if t < ti
    se = 0; %* 'g/l';
    F = 0; %* 'l/h';
else
    se = VALOR DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO ALIMENTADA;%*'g/l';
    F = 0.06;% * 'l/h'
end

%Definindo taxa de diluição
D = F/V;

%Equações do modelo
% Cinética de consumo de substrato
dx(1) = (-mimax/ysx)*((x(4)*x(1))/(ks+x(1)))- ms*x(2)+ D*(se-x(1));% dsdt
% Cinética de crescimento celular
dx(2) = mimax*((x(4)*x(1))/(ks+x(1)))-D*x(2);% dxdt
% Cinética da formação do produto
dx(3)= (mimax/ypx)*((x(4)*x(1))/(ks+x(1)))+ mp*x(2) + D*x(3);% dpdt
% Cinética de formação do componente E
dx(4) = ke*(x(3)-c1)*(x(3)-c2)*((x(4)*x(1))/(ks+x(1))) + D*x(4);% dcedt

end

```

Apêndice A.5- Arquivo com os dados de entrada do modelo proposto por Jöbbses *et al.*(1986)

```
function J = jobses_in(a0)
```

```
global ke ks c1 c2 mimax ms mp ysx ypx
```

```
%\%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%\Simulação do processo modelo Jobses\%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%\
```

```
%Entrada dos parâmetros estimados no modelo
```

```
ke = a0(1)/100;
ks = a0(2);
c1 = a0(3)*100;
c2 = a0(4)*100;
mimax = a0(5);
ms = a0(6);
mp = a0(7);
ysx = a0(8);
ypx = a0(9);
Ce0=a0(10)/1e4;
```

```
%Valores iniciais
```

```
x0 = CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA INICIAL;
s0 = CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO INICIAL;
p0 = CONCENTRAÇÃO DE PRODUTO INICIAL;
```

```
% Tempo de fermentação
```

```
tspan = [VECTOR CONTENDO OS TEMPOS QUE OCORRERAM AS MEDIÇÕES];
n=length(tspan);
```

```
% Resolução do sistema de equações ordinárias
```

```
[t,x]=ode15s(@jobses,tspan,[s0 x0 p0 Ce0]);
```

```
%Valor experimentais
```

```
Xexp = [VECTOR VALOR EXPERIMENTAL DAS CONCENTRAÇÕES DE
BIOMASSA];
Sexp = [VECTOR VALOR EXPERIMENTAL DAS CONCENTRAÇÕES DE
SUBSTRATO];
Pexp = [VECTOR VALOR EXPERIMENTAL DAS CONCENTRAÇÕES DE PRODUTO]
```


%Limites de Busca

Lb=[VETOR COM OS LIMITES INFERIORES DE BUSCA PARA a0];
Ub=2*[VETOR COM OS LIMITES INFERIORES DE BUSCA PARA a0]

RESIDUAL=[];

%Chamada da rotina para a estimacao de parametros

[a,Ot,nS]=buscarndb('jobses_in',a0,-1,1,20,Lb,Ub,[],1e-4,2000,ones(1,np),[],5)

% Valor do parâmetro encontrado

ke = a(1)/100
ks = a(2)
c1 = a(3)*100
c2 = a(4)*100
mimax = a(5)
ms = a(6)
mp = a(7)
ysx = a(8)
ypx = a(9)
Ce0 = a(10)/1e4
Ot

RESIDUAL

a = [ke;ks;c1;c2;mimax;ms;mp;ysx;ypx;Ce0];

%\Obtenção e plotagem dos resultados obtidos de posse dos parâmetros estimados/

% Valores iniciais

x0 = CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA INICIAL;
s0 = CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO INICIAL;
p0 = CONCENTRAÇÃO DE PRODUTO INICIAL;

%Tempo de fermentação

tspan = [VETOR CONTENDO OS TEMPOS QUE OCORRERAM AS
MEDIÇÕES];

% Resolução do sistema de equações ordinárias

[t,x]=ode15s(@jobses,tspan,[s0 x0 p0 Ce0]);

% Valor experimentais

Xexp = [VETOR VALOR EXPERIMENTAL DAS CONCENTRAÇÕES DE
BIOMASSA];

```
Sexp = [VETOR VALOR EXPERIMENTAL DAS CONCENTRAÇÕES DE
SUBSTRATO];
Pexp = [VETOR VALOR EXPERIMENTAL DAS CONCENTRAÇÕES DE
PRODUTO];
```

```
% Representação dos resultados
```

```
figure(1)
subplot(3,1,1)
plot(t,x(:,1),'r-',tspan ,Sexp,'k^')
title('Variação da concentração de substrato')

subplot(3,1,2)
plot(t,x(:,2),'b-',tspan ,Xexp,'mo')
title('Variação da concentração de biomassa')

subplot(3,1,3)
plot(t,x(:,3),'c-',tspan ,Pexp,'g*')
title('Variação da concentração de produto')
```

Apêndice B - Rotinas implementadas no EMSO

Apêndice B.1- Rotina para ajuste dos parâmetros do modelo

```
using "Modelo";
```

```
FlowSheet Modelo camelo
```

```
PARAMETERS
    ti as time_h;
```

```
DEVICES
```

```
    alimentacao as corrente;
    R1 as Modelo;
```

```
CONNECTIONS
```

```
    Alimentação to R1.entrada;
```

```
SET
```

```
    #Dando valores aos parâmetros do modelo
        R1.PAR = VALOR INICIAL *' unidade do parâmetro';
    #Volume do biorreator
        R1.V = 1 *'l';
```

```

#Início da alimentação
ti = VALOR DO TEMPO DE INÍCIO DA FERMENTAÇÃO
CONTÍNUA*'h';

```

EQUATIONS

```

if time < ti then
    alimentacao.VAR = variáveis de estado de cada modelona alimentação*
'unidade da variável de estado';
else
    alimentacao.VAR = variáveis de estado de cada modelo na alimentação *
'unidade da variável de estado';
end

```

INITIAL

```

R1.VAR= variáveis de estado de cada modelo no tempo nulo * 'unidade da variável
de estado';

```

OPTIONS

```

TimeStart = 0.0;
TimeStep = VALOR DO PASSO DE TEMPO;
TimeEnd = TEMPO TOTAL DE FERMENTAÇÃO;
TimeUnit= 'h';
# DAESolver(File="dasslc");
end

```

EstimationEstparametros as modelocamelo

ESTIMATE

```

# R1.VAR = parâmetro a ser estimado
# START = chute inicial
# LOWER = limite inferior de busca dos parâmetros
# UPPER = limite superior de busca dos parâmetros

```

#PARAMETER	START	LOWER	UPPER	UNIT
R1.VAR	-	-	-	- ;

EXPERIMENTS

```

#DATA FILE WEIGTH
"estimacao_de_modelocamelo.dat" 1;

```

OPTIONS

```

#NPL é Problema de otimização não linear
NLPSolver(

```

```

MaxIterations = 1000,
    File = "complex"
);

```

End

Apêndice B.2- Arquivo com o modelo proposto por Jöbses *et al.* (1986)

```
using "types";
```

```
Model corrente
```

```
VARIABLES
```

```

X as conc_mass(Brief="concentração celular", DisplayUnit='g/l');
S as conc_mass(Brief="concentração do substrato", DisplayUnit='g/l');
P as conc_mass(Brief="concentração do produto", DisplayUnit='g/l');
Ce as conc_mass (Brief= "concentração do produto chave", DisplayUnit ='g/l');
F as flow_vol(Brief="vazão volumétrica", DisplayUnit='l/h');

```

```
end
```

```
Model Modelo(Jöbses)
```

```
PARAMETERS
```

```

Ke as positive(Brief="constante de Monod", Unit = 'l^2/g^2/h');
Ks as conc_mass(Brief="constante de Monod",DisplayUnit='g/l');
c1 as conc_mass(Brief=" constante empírica",DisplayUnit='g/l');
c2 as conc_mass(Brief=" constante empírica",DisplayUnit='g/l');
mimax as positive (Brief="taxa máxima de crescimento celular", Unit='1/h');
ms as positive(Brief="Fator manutenção a partir do consumo substrato",
Unit='1/h');
mp as positive(Brief="Fator manutenção baseado na formação produto",
Unit='1/h');
Ysx as Real(Brief="Fator rendimento substrato em biomassa");
Ypx as Real(Brief="Fator rendimento biomassa em produto");
V as volume;

```

```
VARIABLES
```

```

# Variáveis de entrada-input
    in entrada as corrente;

```

```

#Varáveis de saída-output
    out saída as corrente;

```

```

X as conc_mass(Brief="concentração celular",DisplayUnit='g/l');
S as conc_mass(Brief="concentração do substrato",DisplayUnit='g/l');
P as conc_mass(Brief="concentração do produto",DisplayUnit='g/l');
Ce as conc_mass (Brief= "concentração do produto chave", DisplayUnit ='g/l');

```

```

#Variáveis auxiliares
  D as positive(Brief="taxa de diluição", Unit='1/h');

EQUATIONS
  "balanco de massa global"
    entrada.F = saida.F;

# Definindo a taxa de diluição
  D = entrada.F/V;

#Equações de balanço material
  "Cinética de consumo de substrato"
    diff(S)=-mimax/Ysx*Ce*S/(Ks+S)-ms*X+D*(entrada.S-S);
  "Cinética de crescimento celular"
    diff(X) = mimax*Ce*S/(Ks+S)+D*(entrada.X-X);
  "Cinética da formação do produto"
    diff(P) = mimax/Ypx*Ce*S/(Ks+S) + mp*X + D*(entrada.P - P);

# mistura perfeita
saida.X = X;
saida.S = S;
saida.P = P;
saida.Ce = Ce;

end

```

Apêndice B.3- Arquivo com o modelo proposto por Daugulis *et al.*(1997)

```

using "types";

Model corrente
  VARIABLES
    X as conc_mass(Brief="concentração celular", DisplayUnit='g/l');
    S as conc_mass(Brief="concentração do substrato", DisplayUnit='g/l');
    P as conc_mass(Brief="concentração do produto", DisplayUnit='g/l');
    Z as reaction_mass(Brief="média ponderada da taxa de mudança da concentração
de etanol", DisplayUnit='g/l/h');
    W as reaction_mass(Brief="média ponderada da taxa de variação da concentração
de etanol", DisplayUnit='g/l/h');
    F as flow_vol(Brief="vazão volumétrica", DisplayUnit='l/h');

end

```

Model Modelo(Daugulis)

PARAMETERS

```
mumax as Real(Brief="taxa específica máxima de crescimento",Unit='1/h');
Pob as conc_mass(Brief="concentração mínima de etanol para que ocorra inibição
pelo produto", DisplayUnit='g/l');
Pma as conc_mass(Brief="semelhante a Pob verificar");
Pmb as conc_mass(Brief="Concentração de etanol máxima em que mu1 não se
anula");
Pme as conc_mass(Brief="máxima concentração de etanol para que ocorra inibição
pelo produto");
Ks as conc_mass(Brief="parâmetro para taxa específica de consumo de
substrato",DisplayUnit='g/l');
Ki as conc_mass(Brief=" parâmetro para taxa específica de consumo de
substrato",DisplayUnit='g/l');
Kpm as conc_mass(Brief=" parâmetro para taxa de produção do
etanol",DisplayUnit='g/l');
Si as conc_mass(Brief="[C]min p/ que ocorra uma inibição no crescimento pelo
substrato");
alpha as Real(Brief="expoente que representa a inibição do etanol em relação a
produção de etanol");
beta as Real(Brief="expoente que representa a inibição do etanol em relação a
produção de etanol", Unit='1/h');
lambda as Real(Brief="expoente que representa a inibição do etanol em relação a
produção de etanol", Unit='1*h/g');
delta as Real(Brief="expoente que representa a inibição do etanol em relação a
produção de etanol");
a as Real(Brief="par. para taxa esp. de crescimento instantânea");
b as Real(Brief="par. para taxa esp. de crescimento instantânea");
qpm as Real(Brief="Taxa máxima esp. de produção de etanol",Unit='1/h');
yps as Real(Brief="coeficiente de rendimento do etanol em relação a glicose");
V as volume;
```

VARIABLES

```
# Variáveis de entrada-input
in entrada as corrente;

#Varáveis de saída-output
out saída as corrente;

X as conc_mass(Brief="concentração celular",DisplayUnit='g/l');
S as conc_mass(Brief="concentração do substrato",DisplayUnit='g/l');
P as conc_mass(Brief="concentração do produto",DisplayUnit='g/l');
Z as reaction_mass(Brief="média ponderada da taxa de mudança da concentração
de etanol",DisplayUnit='g/l/h');
W as reaction_mass(Brief="média ponderada da taxa de variação da concentração
de etanol",DisplayUnit='g/l/h');

#Variáveis auxiliares
```

```

D as positive(Brief="taxa de diluição", Unit='1/h');

# equações auxiliares
gs as Real(Brief="função gs");
fp as Real(Brief="função da conc. de etanol");
mu1 as positive (Brief="taxa de crescimento celular instantânea",
Unit='1/h');

fmu as positive(Brief="função de Z");
qp as Real (Brief="Taxa esp. de produção de etanol",Unit='1/h');

EQUATIONS
"balanco de massa global"
  entrada.F = saida.F;

# Definindo a taxa de diluição
  D = entrada.F/V;

#Condicional para a concentração de etanol (g/L)
  if P <= Pob then
    "função da concentração de etanol" fp = 1;
  else if P > Pob and P <= Pmb then
    "função da concentração de etanol" fp = 1 - ((P - Pob) / (Pmb - Pob))^b;
  else
    "função da concentração de etanol" fp = 0;
  endend

#Condicional para a concentração de substrato (g/L)
  if S <= Si then
    "função gs" gs = 1;
  else
    "função gs" gs = (Ki - Si) / (Ki - 2 * Si + S);
  end

"taxa de crescimento celular instantânea"
  mu1 = (mumax * S * (1 - (P / Pma)^a) * fp) / (Ks + (S / gs));
"função de Z"
  fmu = 0.5 * ((1 - (exp(lambda * Z - delta) - exp(-
lambda * Z + delta))) / (exp(lambda * Z - delta) + exp(-lambda * Z + delta))));
"Taxa esp. de produção de etanol"
  qp = (qpmax * S / (Kpm + S)) * (1 - (P / Pme)^alpha);

"Cinética de crescimento celular"
  diff(X) = mu1 * fmu * X + D * (entrada.X - X);
"Cinética de consumo de substrato"
  diff(S) = D * (entrada.S - S) - qp * X / yps;
"Cinética da formação do produto"
  diff(P) = qp * X + D * (entrada.P - P);

```


"Variação da média ponderada da taxa de mudança da concentração de etanol em função do tempo"

$$\text{diff}(Z) = \text{beta} * (W - Z);$$

"Variação da média ponderada da taxa de variação da concentração de etanol"

$$\text{diff}(W) = \text{beta} * (\text{qp} * X + D * (\text{entrada} * P - P) - W);$$

mistura perfeita

$$\text{saida} * X = X;$$

$$\text{saida} * S = S;$$

$$\text{saida} * P = P;$$

$$\text{saida} * Z = Z;$$

$$\text{saida} * W = W;$$

end