

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA (PEQ-UFS)

CAROLINE LEITE DA SILVA

**ESTUDO DA DINÂMICA DA FERMENTAÇÃO EM PROCESSO BATELADA E
SEMICONTÍNUO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL**

São Cristóvão (SE)

2016

CAROLINE LEITE DA SILVA

**ESTUDO DA DINÂMICA DA FERMENTAÇÃO EM PROCESSO BATELADA E
SEMICONTÍNUO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Química,
como requisito à obtenção do título de
Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Luz Pagano

Coorientadora: Profa. Dra. Cristina Ferraz Silva

São Cristóvão (SE)

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S586e Silva, Caroline Leite da
Estudo da dinâmica da fermentação em processo batelada em semicontínuo para produção de etanol / Caroline Leite da Silva ; orientador Rogério Luz Pagano - São Cristóvão, 2016.
88 f. : il.

Dissertação (mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2016.

1. Engenharia química.
 2. Álcool.
 3. Cinética química.
 4. Estimativa de parâmetros.
 5. Fermentação.
 6. *Saccharomyces cerevisiae*.
- I. Pagano, Rogério Luz orient.
II. Título.

CDU 661.722:663.14

CAROLINE LEITE DA SILVA

**ESTUDO DA DINÂMICA DA FERMENTAÇÃO EM PROCESSO BATELADA E
SEMICONTÍNUO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL**

Dissertação de Mestrado aprovada no programa de Pós-Graduação em Engenharia Química
da Universidade Federal de Sergipe em 29 de agosto de 2016.

BANCA EXAMINADORA



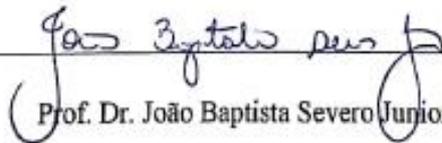
Prof. Dr. Rogério Luz Pagano – Orientador

(PEQ/UFS)



Prof. Dra. Cristina Ferraz Silva – Coorientadora

(PEQ/UFS)



Prof. Dr. João Baptista Severo Junior

(DEQ/UFS)



Prof. Dr. José Jailton Marques

(PEQ/UFS)

AGRADECIMENTOS

Muito feliz de estar escrevendo os agradecimentos, isto significa que eu finalmente terminei de escrever o texto da dissertação (ufa!). Nem sei por onde começar a agradecer, eu realmente não teria chegado a defesa dessa dissertação sozinha. Foram muitas dificuldades enfrentadas e superadas e muito conhecimento adquirido ao longo destes dois anos. Vou começar agradecendo aos meus orientadores: Professor Rogério e Professora Cristina por todo o conhecimento compartilhado, toda a paciência que tiveram comigo ao longo de todo o trabalho e por todas as soluções propostas e discussões diante das dificuldades enfrentadas. Sigo agradecendo à turma de mestrado 2014.2 formada pela imensidão de quatro alunas: Simonise, Carol e Sharlene, obrigada por dividirem comigo as aventuras das matérias obrigatórias e por sempre estarem dispostas a ouvir sobre a evolução do meu trabalho. Por falar em disciplinas: obrigada aos professores Marcelo Barros, Roberto Rodrigues, Antônio Martins, Domingos Fabiano, Gabriel Silva e Pedro Leite por reforçarem o conhecimento adquirido na graduação, bem como nos agregarem ainda mais conhecimento. Agradeço também a todos do Laboratório de Bioquímica onde tive bastante trabalho e enfrentei muitos desafios: obrigada Diego, por ser sempre tão prestativo e estar presente quando reagentes de alta periculosidade resolvem, misteriosamente, transbordar de balões volumétricos; Alana, obrigada por adaptar métodos possíveis para o meu trabalho e me ajudar a sobreviver às piadas ruins de João; obrigada Ian, por ser tão inteligente, entender tanto de microrganismos e questionar aspectos importantes do meu trabalho; e obrigada João por todas as noites perdidas ao meu lado no laboratório quando precisei acompanhar uma fermentação alcoólica de 60 h em triplicata, também por me incentivar na modelagem dizendo: “a modelagem você conclui em uma semana, é muito simples”, (foi quase isso) e por ser esse amigo incrível que você é: “todo mundo deveria ter um amigo igual a você”. E quando se trata de modelagem preciso agradecer a todos do Laboratório de Modelagem e Simulação, por me aturarem reclamar milhões de vezes sobre a tal modelagem, principalmente sobre região de confiança: Lucas, obrigada por tentar resolver os problemas dos meus códigos, sempre consertar a impressora e pelas zoeiras #lucasdazoeira, o laboratório não seria tão legal sem as suas zoeiras; Sávio, obrigada pelos confeitos, por ser meu psicólogo particular e pelo apoio dizendo “que triste só você trabalha com FORTRAN aqui agora”; Keila, obrigada por ser assim tão forte, você me inspira a ser mais forte a cada dia; obrigada André e Taline por me ajudarem com o FORTRAN; Mestre Léo obrigada por ser esse ser humano tão prestativo; e Felipe obrigada por sempre formatar meu notebook e resolver os problemas do

meu computador. Dedico um agradecimento especial aos professores Gisélia, Jailton, João Severo, André Ramos, Francine Padilha e Antônio Silva Santos por sugerirem correções e mudanças tão pertinentes ao trabalho; ao Professor Edilson, por algumas vezes me disponibilizar seu laboratório e equipamentos; à Danilo, Douglas e Dona Ednalva por serem sempre tão prestativos quando precisei de algo para meus experimentos. Enfim, agradeço a todos aqueles que estiveram comigo durante essa jornada, torcendo por mim (Ligador, Geisa, Cris, May, Alê, Helen, Layla, Carol, Ro, Jenni, Lukinhas, Sara, Clara, Jamille, Jamille, Rosa, Wallace, Jhon, Walber, Wanderley); a minha vó Izabel por todo incentivo e cuidado comigo e a Deus por me dar forças e me cercar de pessoas tão incríveis.

RESUMO

O etanol é uma fonte de energia renovável e é considerada uma das melhores alternativas diante das mudanças climáticas causadas, em parte, pelo uso de combustíveis fósseis. Os processos biotecnológicos são os principais responsáveis pela produção mundial de etanol. Neste trabalho a produção de etanol realizada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* em reator batelada e semicontínuo foi estudada com o objetivo de analisar a dinâmica deste processo fermentativo. Esse estudo foi realizado por meio da proposição de modelos matemáticos capazes de prever o comportamento das concentrações de biomassa, substrato e produto ao longo do tempo de fermentação, bem como estimar os parâmetros dos modelos propostos. O processo fermentativo foi realizado em biorreator isotérmico de volume útil igual a 1 L, a uma temperatura de 32 °C, sob agitação de 175 rpm e pH igual a 3,0. O tempo de fermentação foi de 15 h para o processo em batelada e 60 h para o processo semicontínuo. Para o estudo do reator batelada foram propostos cinco modelos, nos quais as variações com o tempo das concentrações de biomassa, substratos e produto foram baseadas nos balanços de massa para cada componente no reator. No primeiro modelo a cinética da fermentação foi baseada na cinética clássica proposta por Monod; no segundo foi baseada em uma cinética microbiana ponderada pela concentração máxima de microrganismo; o terceiro modelo foi proposto na tentativa de prever o comportamento de decaimento celular observado experimentalmente; no quarto modelo o crescimento microbiano foi ponderado pela concentração máxima de produto; e por fim, o quinto modelo levou em consideração parâmetros de consumo de substrato e formação de produto pelas leveduras. O modelo avaliado para prever o comportamento da fermentação semicontínua foi baseado nos balanços de massa propostos para este biorreator, juntamente com a equação cinética de Monod. Todos os modelos foram implementados em FORTRAN, resolvidos com a aplicação da sub-rotina DASSL e os parâmetros cinéticos de cada modelo foram estimados por meio do programa ESTIMA, onde a função-objetivo adotada foi a de mínimos quadrados. O menor valor encontrado para a função-objetivo foi o critério adotado para escolha do modelo que melhor se ajustou aos dados experimentais. No reator batelada o modelo clássico proposto com base na cinética de Monod foi o que apresentou melhor ajuste aos dados experimentais, o valor da função-objetivo foi igual 0,5291. Os valores estimados dos parâmetros deste modelo foram estatisticamente significativos e fisicamente realísticos e descreveram com boa precisão os dados experimentais: $\mu_{\text{máx}} = 0,1155 \text{ h}^{-1}$; $K_1 = 0,8984 \text{ h}^{-1}$; $K = 0,4738 \text{ h}^{-1}$; $Y_{X/S} = 0,0242$; $Y_{X/P} = 0,0451$ e $K_S = 24,3852 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Os parâmetros estimados para o biorreator semicontínuo também foram fisicamente realísticos e estatisticamente significativos e seus valores foram: $\mu_{\text{máx}} = 0,1195 \text{ h}^{-1}$; $K_1 = 0,3999 \text{ h}^{-1}$; $K = 0,2725 \text{ h}^{-1}$; $Y_{X/S} = 0,0102$; $Y_{X/P} = 0,0207$ e $K_S = 121,6581 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; o valor de função-objetivo foi igual a 7,475. Os resultados obtidos indicam que o biorreator semicontínuo pode ser utilizado na fermentação alcoólica, podendo operar durante tempos superiores aos relatados para o biorreator batelada operando nas mesmas condições, sem que se faça necessário o preparo de um novo inóculo. Os resultados também sugeriram a possível ocorrência de arraste de células viáveis durante o processo de descarga e recarga, que poderia ser evitado com o reciclo dessas células.

PALAVRAS-CHAVE: etanol; modelo cinético; estimação de parâmetros.

ABSTRACT

Ethanol is a renewable energy source and it is considered one of the best alternatives to climate change caused, in part, by the use of fossil fuels. Biotechnological processes are primarily responsible for the worldwide production of ethanol. In this work the ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* yeast in a batch and semi-continuous reactor was studied with the objective of analyzing the dynamics of this fermentation process. This study was carried out through the proposition of mathematical models capable of predicting the behavior of the biomass, substrate and product concentration along the fermentation time, as well as estimating the parameters of the proposed models. The fermentation process was carried out in an isothermal bioreactor with a working volume equal to 1 L, at a temperature of 32 °C, under agitation of 175 rpm and pH equal to 3.0. The fermentation time was equal to 15 h for the batch process and 60 h for the semi-continuous process. For the study of the batch reactor, five models were proposed, in which the variations with time of the biomass, substrates and product concentrations were based on the mass balance for each component in the reactor. In the first model the fermentation kinetic was based on the classical kinetic proposed by Monod; in the second it was based on microbial kinetic weighted by the maximum concentration of microorganism; the third model was proposed in an attempt to predict the behavior of cell decay observed experimentally; in the fourth model the microbial growth was weighted by the maximum concentration of product; and finally, the fifth model took into account parameters of substrate consumption and formation of product by the yeasts. The model evaluated to predict the behavior of the semi-continuous fermentation was based on the proposed mass balance for this bioreactor, along with the Monod kinetic equation. All the models were implemented in FORTRAN, solved with the application of the DASSL subroutine and the kinetic parameters of each model were estimated through the ESTIMA program, where the objective function was least squares. The lowest value found for the objective function was the criterion adopted to choose the model that best fit the experimental data. In the batch reactor the classic model proposed based on the Monod kinetics was the one that presented the best fit to the experimental data and the value of the objective function was 0.5291. The estimated values of the parameters of this model were statistically significant and physically realistic and accurately described the experimental data: $\mu_{\text{máx}} = 0.1155 \text{ h}^{-1}$; $K_1 = 0.8984 \text{ h}^{-1}$; $K = 0.4738 \text{ h}^{-1}$; $Y_{X/S} = 0.0242$; $Y_{X/P} = 0.0451$ e $K_S = 24.3852 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. The estimated parameters for the semi-continuous bioreactor were also physically realistic and statistically significant and their values were: $\mu_{\text{máx}} = 0.1195 \text{ h}^{-1}$; $K_1 = 0.3999 \text{ h}^{-1}$; $K = 0.2725 \text{ h}^{-1}$; $Y_{X/S} = 0.0102$; $Y_{X/P} = 0.0207$ e $K_S = 121.6581 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; the objective function value was equal to 7.475. The results indicate that the semi-continuous bioreactor can be used in alcoholic fermentation, and it can operate for longer times than those reported for the batch bioreactor operating under the same conditions, without the need to prepare a new inoculum. The results also suggested the possible occurrence of cell wash out during the discharge and recharge process, which could be avoided by recycling these cells.

KEYWORDS: ethanol; Kinect model; parameter estimation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Produção Global de Etanol em 2015	16
Figura 2 - Sequência de reações enzimáticas na fermentação alcoólica conduzida por <i>S. cerevisiae</i>	20
Figura 3 - Curvas de ajustes dos resultados de uma experiência idealizada de fermentação ..	22
Figura 4 - Curva de crescimento do microrganismo em cultivo descontínuo: (A) em ordenadas lineares; (B) em ordenadas logarítmicas	25
Figura 5 - Resultados experimentais e simulação da concentração celular.	26
Figura 6 - Resultados experimentais e simulação da concentração celular.	27
Figura 7 - Esquema de operação do reator batelada	29
Figura 8 - Esquema de operação do reator batelada alimentada	30
Figura 9 - Esquema de operação do reator contínuo	31
Figura 10 – (a) Banho-maria com circulação; (b) Biorreator isotérmico; (c) Agitação	37
Figura 11 - Esquema de operação do reator semicontínuo	43
Figura 12 - Resultados experimentais do processo descontínuo: médias e desvios padrões. ...	48
Figura 13 - Região de confiança do MMI	50
Figura 14 - Região de confiança do MMII.....	51
Figura 15 - Região de confiança do MMIII	51
Figura 16 - Região de confiança MMIV	52
Figura 17 - Região de confiança MMV	52
Figura 18 - MMI: valores experimentais x valores preditos pelo modelo	54
Figura 19 - MMII: valores experimentais x valores preditos pelo modelo.....	54
Figura 20 - MMIII: valores experimentais x valores preditos pelo modelo	55
Figura 21 - MMIV: valores experimentais x valores preditos pelo modelo	55

Figura 22 - MMV: valores experimentais x valores preditos pelo modelo.....	56
Figura 23 - Resultados experimentais da concentração de biomassa no processo semicontínuo: médias e desvios padrões.	57
Figura 24 - Resultados experimentais da concentração de sacarose no processo semicontínuo: médias e desvios padrões.	57
Figura 25 - Resultados experimentais da concentração de glicose no processo semicontínuo: médias e desvios padrões.	58
Figura 26 - Resultados experimentais da concentração de etanol no processo semicontínuo: médias e desvios padrões.	58
Figura 27 - Região de confiança Reator semicontínuo	59
Figura 28 – Reator semicontínuo - Biomassa: valores experimentais x valores preditos pelo modelo.....	60
Figura 29 - Reator semicontínuo - Sacarose: valores experimentais x valores preditos pelo modelo.....	61
Figura 30 - Reator semicontínuo - Glicose: valores experimentais x valores preditos pelo modelo.....	61
Figura 31 - Reator semicontínuo - Etanol: valores experimentais x valores preditos pelo modelo	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Equações cinéticas.....	23
Tabela 2 - Equações dos Modelos Matemáticos adotados para o Reator Batelada.....	42
Tabela 3 - Equações adimensionais dos modelos propostos.....	45
Tabela 4 - Equações das constantes dos modelos adimensionais.....	47
Tabela 5 - Parâmetros a serem estimados	47
Tabela 6 - Valores adimensionais dos parâmetros e limites de confiança do modelo linearizado	49
Tabela 7 - Valores das funções objetivo dos modelos propostos no estudo do reator batelada	50
Tabela 8 - Valores dos parâmetros estimados com suas respectivas unidades	53
Tabela 9 - - Valores adimensionais dos parâmetros e limites de confiança do modelo linearizado para o reator semicontínuo.	59
Tabela 10 - Valores dos parâmetros estimados para o reator semicontínuo e suas respectivas unidades.....	60

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	6
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
SUMÁRIO	11
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Objetivo Geral	15
1.2. Objetivos Específicos	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. Produção de Etanol	16
2.1.1. Fermentação Alcoólica	17
2.1.2. Aspectos Cinéticos	21
2.2. Modelagem Matemática	27
2.2.1. Balanços de Massa	28
2.3. Estimação de Parâmetros	33
2.3.1. Enxame de Partículas - Particle Swarm Algorithms (PSO)	35
2.3.2. Região de Confiança	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1. Processo Fermentativo	37
3.2. Métodos Analíticos	38
3.2.1. Concentração de Biomassa	38
3.2.2. Concentração de Sacarose e Glicose	39
3.2.3. Concentração de Etanol	40
3.3. Modelagem Matemática	42

3.3.1. Reator Batelada	42
3.3.2. Reator Semicontínuo	43
3.4. Estimação dos Parâmetros Cinéticos	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1. Processo Fermentativo Descontínuo	48
4.2. Processo Fermentativo Semicontínuo	56
5. CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXO A.....	70
APÊNDICE A	72
APÊNDICE B	73
APÊNDICE C	75
APÊNDICE D	84

1. INTRODUÇÃO

O crescimento do uso de energias renováveis foi marcante na década de 90, acelerado nos anos 2000 e, no fim de 2015, recebeu um grande impulso com a 21ª Conferência das Nações Unidas sobre Mudança Climática (COP 21) que aconteceu em Paris, onde 195 países concordaram em manter o aquecimento global abaixo de 2°C, com esforços de que este valor não ultrapasse 1,5°C. Segundo Naidoo (2015), diretor executivo da organização ambiental Greenpeace, a aprovação do texto final da COP 21 representa o fim da era dos combustíveis fósseis e destaca as energias renováveis como a principal solução para as mudanças climáticas (GREENERGY, 2010; REN21, 2013; REN21, 2014; REN21, 2016).

As energias renováveis hoje são economicamente competitivas com os combustíveis fósseis em muitos mercados e sua tecnologia está bem estabilizada em todo o mundo como uma importante fonte de energia. O uso de biocombustíveis líquidos (etanol e biodiesel) representam a medida de maior impacto no uso das energias renováveis na demanda global para o transporte. Entre 2014 e 2015 a produção global de etanol cresceu 4%, atingindo a marca de 98,3 bilhões de litros e níveis recordes nos Estados Unidos e Brasil, que registrou um aumento de 10% na produção, alcançando a marca 28,2 bilhões de litros (REN21, 2016).

Biocombustíveis líquidos são geralmente produzidos através da fermentação de açúcares. A tecnologia de conversão de matérias-primas açucaradas e ricas em amido em etanol é bem estabelecida e comercialmente viável (SCOVRONICK e WILKINSON, 2014). O processo fermentativo mais utilizado para a produção de etanol é o processo em batelada alimentada com reciclo de células e uma alternativa a este processo é a fermentação contínua baseada num sistema de 3 a 5 reatores em série, também operando com reciclo de células (DIAS *et al.*, 2015). Neste estudo foi dado enfoque ao processo fermentativo semicontínuo, que é pouco estudado. Esse processo opera com choques de carga de substrato, onde, ao final de um período fermentativo, uma fração de volume entre 30 e 60% do líquido fermentado é retirada e se procede instantaneamente o preenchimento do reator com nova carga de substrato, empregando-se uma vazão muito elevada. Ao final de um novo período de fermentação, esse procedimento se repete (SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

Muitos microrganismos podem ser explorados para a produção de etanol, dentre eles estão fungos como o *Mucor indicus* (AGHBASHLO *et al.*, 2016; LEWANDOWSKA *et al.*, 2016), bactérias como *Zymomonas mobilis* (OMORI *et al.*, 2011) e leveduras como

Kluyveromyces marxianus (SANSONETTI *et al.*, 2011). No entanto, a levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* ainda permanece como a principal espécie na produção industrial de etanol (BENJAPHOKEE *et al.*, 2012; JIMÉNEZ-ISLAS *et al.*, 2014).

Um argumento muito comum contra o etanol é que a sua energia equivalente é menor que a dos combustíveis de petróleo. É necessário aproximadamente 1,5 litro de etanol para se igualar a 1 litro de gasolina em termos de energia calorífica. Diante disso, existe um grande interesse no estudo de todas as etapas envolvidas na produção de etanol com o objetivo de reduzir seus custos de produção e torná-lo economicamente competitivo frente aos combustíveis fósseis (KRYLOVA *et al.*, 2008; MUSSATTO *et al.*, 2010; RENZI, 2016). A modelagem matemática da cinética do processo fermentativo pode representar uma etapa importante no desenvolvimento e redução de custos de processos bioquímicos, tendo em vista que os modelos matemáticos são importantes ferramentas de interpretação de dados experimentais e de compreensão, projeto, otimização e controle do processo fermentativo (RIVERA *et al.*, 2006; DODIĆ *et al.*, 2012; DA ROS *et al.*, 2013; ENZWEILER *et al.*, 2014).

Sistemas bioquímicos homogêneos com comportamento transiente são representados por equações diferenciais não-lineares, juntamente com condições iniciais e de contorno. Estas equações definem a relação entre as variáveis dependentes e independentes do processo e normalmente apresentam um grande conjunto de parâmetros que devem ser estimados de modo a tornar mínima, tanto quanto for possível, a diferença entre os dados previstos pelo modelo e os dados experimentais (VOLESKY e VOTRUBA, 1992; DA ROS *et al.*, 2013; ALBERTON *et al.*, 2015). O procedimento de estimação de parâmetros envolve três etapas básicas: definir a função-objetivo adequada ao problema; encontrar o ponto ótimo da função-objetivo formulada (minimização da função-objetivo); e, por fim, formular uma interpretação estatística precisa dos parâmetros obtidos e da qualidade da previsão efetuada com o auxílio do modelo (SCHWAAB e PINTO, 2007).

No caso de modelos que apresentem não linearidades, a minimização da função-objetivo torna-se mais laboriosa de ser realizada pelos métodos determinísticos, como o método de Newton e algumas considerações devem ser assumidas: (i) a definição das aproximações iniciais dos valores dos parâmetros; (ii) a existência de um mínimo local; (iii) a forma da função-objetivo; e (iv) a interação entre os parâmetros (SCHWAAB *et al.*, 2008; DA ROS *et al.*, 2013). Para transpor tais dificuldades, os métodos heurísticos surgem como uma alternativa eficiente e robusta. Dentre eles, destacam-se o método de Monte Carlo, o Algoritmo Genético, o Recozimento Simulado e o Enxame de Partículas, que será aplicado neste trabalho (SCHWAAB, 2005; SCHWAAB e PINTO, 2007).

O Enxame de Partículas faz uma analogia com o comportamento gregário de animais (pássaros, peixes, abelhas etc.), onde as partículas do enxame trocam informações entre si para encontrar o ótimo global da função-objetivo. Este método se destaca por sua simplicidade, eficiência e robustez. Uma característica interessante do enxame de partículas é uma busca de caráter global no início do procedimento que, ao longo das iterações, torna-se local, quando ocorre a convergência final das partículas (KENNEDY e EBERHART, 1995; SCHWAAB, 2005; SCHWAAB e PINTO, 2007).

1.1. Objetivo Geral

Realizar o estudo experimental e teórico da dinâmica da fermentação alcoólica em processo batelada e semicontínuo por *S. cerevisiae*, bem como estimar os parâmetros cinéticos envolvidos.

1.2. Objetivos Específicos

- Determinar os parâmetros experimentais da fermentação alcoólica em processo batelada e semicontínuo por *S. cerevisiae*;
- Verificar o ajuste dos dados obtidos a modelos matemáticos da literatura;
- Propor o modelo matemático, com base na cinética da fermentação, e realizar a simulação do processo de fermentação batelada e semicontínua para produção de etanol;
- Realizar a estimação dos parâmetros envolvidos nos processos em estudo através do algoritmo enxame de partículas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produção de Etanol

A produção e o uso de biocombustíveis líquidos é a medida de maior impacto no uso de energias renováveis no transporte e possui papel importante na redução das emissões de gases do efeito estufa (LIN e TANAKA, 2006; REN21, 2016). Segundo a organização sem fins lucrativos Renewable Energy Policy Network for the 21st Century, REN21 (2016), a produção global de etanol continua crescendo significativamente e os processos biotecnológicos são responsáveis por cerca de 95% desta produção. As matérias-primas mais utilizadas na fermentação alcoólica são a cana-de-açúcar, a beterraba e o milho; e todo o etanol brasileiro é produzido a partir da cana-de-açúcar. (LIN e TANAKA, 2006; ROSILLO-CALLE e WALTER, 2006; GREENERGY, 2010; REN21, 2016).

Em 2015, os países que mais investiram na produção de etanol foram os Estados Unidos, Brasil, China, Alemanha e Tailândia, sendo que os Estados Unidos e o Brasil representaram 86% da produção global, conforme pode ser visualizado na Figura 1. O Brasil é o maior exportador de etanol e o segundo maior produtor, depois dos Estados Unidos. Sendo que a maior parcela da produção é utilizada como combustível, em substituição a 40% do consumo de gasolina; e aproximadamente 20% é exportada para os Estados Unidos (BALAT e BALAT, 2009; REN21, 2016). No Brasil cerca de 90% dos veículos de passageiros possuem a tecnologia *flex-fuel*, que é a ação mais bem sucedida de uso de combustíveis renováveis no mundo e permite a utilização de gasolina, etanol ou qualquer mistura entre eles (EPE, 2010; BAEYENS, *et al.*, 2015; ANFAVEA, 2016; SCOVRONICK, *et al.*, 2016).



Figura 1 - Produção Global de Etanol em 2015
Fonte: Adaptado de REN21 (2016)

2.1.1. Fermentação Alcoólica

De uma forma geral, a fermentação alcoólica pode ser operada das seguintes formas: descontínua simples (batelada), descontínua alimentada (batelada alimentada), semicontínua e contínua (SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001). A fermentação descontínua é o modo mais simples de funcionamento de um biorreator e serve de base para comparações de eficiências atingidas entre os diferentes processos, mas a sua baixa eficiência industrial estimula o surgimento de formas alternativas (MACAULEY-PATRICK e FINN, 2008; SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

A fermentação descontínua pode levar a baixos rendimentos e/ou produtividades, quando o substrato adicionado de uma só vez no início da fermentação exerce efeitos de inibição. Por outro lado, este processo apresenta menores riscos de contaminação (se comparados com processos contínuos de fermentação) e grande flexibilidade de operação (CARVALHO e SATO, 2011; MACAULEY-PATRICK e FINN, 2008).

Dodić *et al.* (2012) estudaram a cinética de fermentação alcoólica em reator batelada na produção de etanol a partir de suco de beterraba e alcançaram uma taxa de produção máxima de etanol de $4,17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ em 10 h de processo fermentativo. Jiménez-Islas *et al.* (2014) avaliaram a produção de etanol a partir de suco de beterraba por *S. cerevisiae* sob condições de stress térmico e ácido em biorreator batelada e as duas linhagens de levedura estudadas durante o trabalho produziram etanol com alto rendimento, $0,1799 \text{ g}$ biomassa/g etanol, e alta produtividade volumétrica, $2,09 \text{ g etanol}/(\text{L}\cdot\text{h})$.

O processo descontínuo alimentado ou batelada alimentada é definido como uma técnica em processos microbianos, onde um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo e em que os produtos aí permanecem até o final da fermentação. É um processo que possui flexibilidade de utilização de diferentes vazões de enchimento de dornas com meio nutriente e é possível controlar a concentração de substrato no fermentador, de modo que, por exemplo, seja evitada a inibição devido à alta concentração de substrato (CARVALHO e SATO, 2001a).

Converti *et al.* (2003) operaram biorreator do tipo batelada alimentada com o intuito de modelar a fermentação alcoólica de melaço de cana e atingiram a concentração de $58,6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de etanol após 7 h de fermentação. Alfenore *et al.* (2002) estudaram o reator batelada alimentada para a produção de etanol a partir de glicose por meio da *S. cerevisiae*. Neste estudo foi implementada uma técnica de alimentação exponencial de vitaminas ao longo da fermentação e alcançaram melhorias no crescimento celular, na taxa específica de produção de etanol e a

concentração de células viáveis responderam positivamente à estratégia nutricional. A produção máxima de etanol atingida foi de $9,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Laopaiboon *et al.* (2007) realizaram um estudo comparativo entre os reatores batelada e batelada alimentada na fermentação alcoólica de sorgo sacarino pela *S. cerevisiae* e seus resultados sugeriram que o reator batelada alimentada apresentou melhorias na eficiência da produção de etanol em termos de concentração de etanol e rendimento de produto.

O processo contínuo é um método capaz de prolongar a fase exponencial de um organismo e opera em regime permanente, garantindo que vários fatores permaneçam constantes ao longo do tempo de fermentação, tais como o volume da cultura, a concentração de biomassa, as concentrações de produto e substrato, bem como os parâmetros físicos do sistema, tais como pH, temperatura e oxigênio dissolvido (MACAULEY-PATRICK e FINN, 2008). O sistema contínuo de fermentação é extremamente versátil quanto às possibilidades de operação, tais como: em um único estágio, com múltiplos estágios, sem reciclo de células, com reciclo de células, com uma única alimentação e com múltiplas alimentações (FACCIOTTI, 2001). Com relação à sua aplicação nos processos bioquímicos, a fermentação contínua é, geralmente, baseada num sistema de 3 a 5 reatores em série com reciclo de células (DIAS *et al.*, 2015).

Amillastre *et al.* (2012) avaliaram o impacto da temperatura na cinética de produção de etanol por *S. cerevisiae* em biorreator batelada alimentada e contínuo e observaram que para ambos reatores, temperaturas acima de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ favorecem a formação do glicerol. Fan *et al.* (2015) estudaram o processo contínuo de fermentação alcoólica em circulação fechada (*continuous and closed-circulating fermentation*, CCCF) em biorreator membrana por *S. cerevisiae* e observaram que a concentração total de células aumentou continuamente ao longo do tempo e em torno de 160 h de fermentação atingiu seu valor máximo, $26,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ no primeiro ensaio e $38,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ no segundo ensaio. Após centenas de horas de fermentação foi observada a fase de morte celular devido ao acúmulo de metabólitos secundários que apresentaram efeito de inibição do crescimento celular.

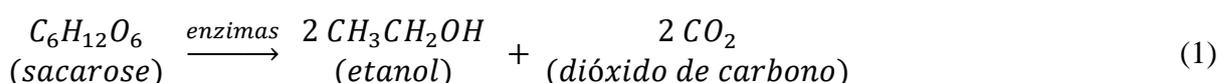
O sistema semicontínuo, de interesse para o presente estudo, diferencia-se do descontínuo alimentado pelo fato de operar com choques de carga de substrato realizados com a retirada de um volume entre 30 e 60% de meio fermentado e adição instantânea do mesmo volume de meio estéril contendo substrato. É denominado semicontínuo pela ideia de volume constante e possibilidade de operar continuamente por meio da repetição do procedimento de descarga e recarga do biorreator. Este preenchimento instantâneo, na prática, requer altas vazões de recarga e/ou biorreator com volume de produção relativamente pequeno, fatores que

dificultam a sua aplicação. Com frequência este processo acaba recaindo no processo descontínuo alimentado, motivo pelo qual alguns autores não utilizam a designação de semicontínuo (SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001). De qualquer maneira, trata-se de uma técnica distinta e que possui vantagens significativas, como a possibilidade de operar o fermentador por longos períodos (às vezes, alguns meses) sem que seja necessário preparar um novo inóculo; a possibilidade de aumentar a produtividade do reator apenas modificando-se o cronograma de trabalho; e a possibilidade de, uma vez conhecidas as melhores condições de operação, conseguir produtividade significativamente maior do que a obtida em processo descontínuo (BORZANI, 2001).

Staniszewski *et al.* (2009) utilizaram este processo fermentativo para conversão de lactose em etanol a partir de enzimas e *S. cerevisiae* imobilizadas. O experimento foi finalizado após 20 dias de fermentação e atingiu a produção máxima de etanol igual a 6,19 % (v/v). Os resultados indicaram que a retirada/recarga de 70% do volume do reator se mostrou mais produtiva que retiradas de 60 ou 80%.

Dentre os microrganismos aptos à produção de etanol estão incluídos fungos como o *Mucor indicus* (AGHBASHLO *et al.*, 2016; LEWANDOWSKA *et al.*, 2016), bactérias como *Zymomonas mobilis* (OMORI *et al.*, 2011) e leveduras como *Kluyveromyces marxianus* (SANSONETTI *et al.*, 2011). As leveduras da espécie *S. cerevisiae* são os microrganismos mais utilizados na produção de etanol em escala industrial, por possuírem boa capacidade fermentativa; serem microrganismos seguros e aptos a utilizar sacarose e glicose como substratos; e serem capazes de suportar concentrações de etanol superiores a 18% no caldo fermentado. (LIN e TANAKA, 2006; BAI *et al.*, 2008; MUSSATTO *et al.*, 2010; BENJAPHOKEE *et al.*, 2012; JIMÉNEZ-ISLAS *et al.*, 2014).

A transformação do açúcar em etanol e CO₂ realizada pela *S. cerevisiae* envolve doze reações em sequência ordenada, cada uma delas catalisada por uma enzima específica. Um esquema representando a sequência dessas reações está apresentado na Figura 2. De forma simplificada esta transformação pode ser expressa por (LIMA *et al.*, 2001):



Alguns fatores podem influenciar no comportamento do metabolismo celular, como: pH, temperatura, concentração de açúcar e nutrientes e linhagem do microrganismo (JIMÉNEZ-ISLAS *et al.*, 2014).

atingida entre as temperaturas de 30 e 45 °C e que com o aumento da temperatura o tempo máximo de fermentação diminuiu, porém, sob temperaturas muito elevadas (50 °C), o crescimento celular diminuiu significativamente. Acerca da influência da concentração de substrato: maiores concentrações conduziram à maior produção de etanol, mas também conduziram a um maior tempo de fermentação.

Por fim, com relação à influência do pH, mudanças no valor de pH podem induzir mudanças no caminho fermentativo. Então, os autores observaram que o pH deve ser mantido entre 4,0 e 5,0. Amillastre *et al.* (2012) avaliaram a influência da temperatura na fermentação alcoólica e concluíram que, sob temperaturas superiores a 36 °C, houve maior formação de glicerol. Jiménez-Islas *et al.* (2014) analisaram a produção de etanol sob condições de *stress* térmico e ácido, foram avaliados os pH 2,8 e 5,5 e as temperaturas de 30 e 37 °C e concluíram que em pH igual a 2,8 e temperatura 30 °C, houve maior formação de levedura e consumo de substrato em um menor tempo de fermentação. Steckelberg (2001) estudou 19 cepas isoladas de leveduras *S. cerevisiae* de vários processos instalados em diferentes regiões do país e observou que as cepas apresentaram características distintas entre si, deste modo a cepa mais adequada para uma fermentação depende do que a unidade se propõe a produzir. Benjaphokee *et al.* (2012) estudaram a performance de uma linhagem de *S. cerevisiae* multi-tolerante gerada através da técnica de hibridização esporo-a-célula. Essa linhagem apresentou tolerância a alta temperatura (41°C), e também apresentou alta tolerância a pH ácido (pH até 3) e a altos teores de etanol (46 g·L⁻¹).

2.1.2. Aspectos Cinéticos

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste em analisar o comportamento, ao longo do tempo, dos valores de concentração das variáveis: microrganismo ou biomassa, (X); produtos do metabolismo ou metabólitos (P); e nutrientes ou substratos do meio de cultura (S). Os valores experimentais de X, P e S, respectivamente, em função do tempo, permitem que sejam traçadas as curvas de ajuste ilustradas na Figura 3 (HISS, 2001).

Por intermédio das curvas de ajuste $X = X(t)$, $P = P(t)$ e $S = S(t)$, é possível descrever quantitativamente uma fermentação, identificando, por exemplo, a duração do processo, em geral baseada no instante em que X e P atingem valores máximos, representados na Figura 3 por X_m e P_m ; e S atinge seu valor final, S_f , próximo a zero. É inviável a adaptação do arranjo experimental para a escala industrial sem o conhecimento da cinética fermentativa. Além desse aspecto, vale ressaltar que o estudo da cinética permite uma comparação quantitativa entre

diferentes condições de cultivo, por meio de parâmetros de transformação, tais como: as velocidades instantâneas de transformação e os fatores de conversão, obtidos também através das curvas de ajuste (HISS, 2001).

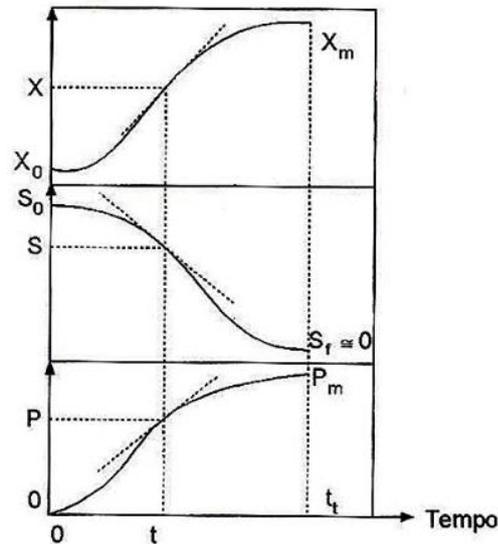


Figura 3 - Curvas de ajustes dos resultados de uma experiência idealizada de fermentação

Fonte: Hiss (2001).

As velocidades instantâneas de crescimento do microrganismo (r_X), o consumo de substrato (r_S) e a formação de produto (r_P) para um tempo t estão ilustradas na Figura 3 pelos valores das inclinações tangentes às respectivas curvas e podem ser representadas pelas Equações (2) a (4) (HISS, 2001).

$$r_X = \frac{dX}{dt} \quad (2)$$

$$r_S = -\frac{dS}{dt} \quad (3)$$

$$r_P = \frac{dP}{dt} \quad (4)$$

Devido ao fato de que a concentração microbiana, X , aumenta durante um cultivo descontínuo, aumentando conseqüentemente a concentração do complexo enzimático responsável pela transformação do substrato, S , no produto, P , é mais lógico analisar os valores das velocidades instantâneas com relação à referida concentração microbiana. Esta análise pode ser feita através das taxas específicas de crescimento de biomassa, μ_X , consumo de substrato, μ_S , e formação de produto, μ_P , expressas nas Equações (5) a (7) (HISS, 2001):

$$\mu_X = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (5)$$

$$\mu_S = \frac{1}{X} \cdot \left(-\frac{dS}{dt} \right) \quad (6)$$

$$\mu_P = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (7)$$

Considerando um determinado tempo t de fermentação, os valores correspondentes de X, S e P podem ser relacionados entre si através dos fatores de conversão definidos por (HISS, 2001):

$$Y_{X/S} = \frac{X-X_0}{S_0-S} \cong \frac{dX}{dS} \cong \frac{\mu_X}{\mu_S} \quad (8)$$

$$Y_{X/P} = \frac{X-X_0}{P-P_0} \cong \frac{dX}{dP} \cong \frac{\mu_X}{\mu_P} \quad (9)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P-P_0}{S_0-S} \cong \frac{dP}{dS} \cong \frac{\mu_P}{\mu_S} \quad (10)$$

$$Y_{X/S} = Y_{X/P} \cdot Y_{P/S} \quad (11)$$

Com o intuito de explicar a influência da concentração de substrato e/ou produto sobre a velocidade específica de crescimento celular, várias equações cinéticas têm sido propostas, algumas delas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Equações cinéticas

Equações Cinéticas		Equação
$\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_S + S}$	Monod (1979)	(12)
$\mu_x = \frac{S^n}{K_{SS} + S^n}$	Moser (1985)	(13)
$\mu_x = \mu_{m\acute{a}x} \left(1 - \exp\left(-\frac{S}{K_{SS}}\right) \right)$	Teissier (1936)	(14)
$\mu_x = \mu_{m\acute{a}x} \left(1 - \frac{P}{P_{max}} \right)$	Ghose e Tyagi (1979)	(15)
$\mu_x = \mu_{m\acute{a}x} \left(\frac{S}{K_{SX} + S} \right) (1 - K_{PX} \cdot P)$	Hinshelwood, (BIROL <i>et al.</i> , 1998)	(16)
$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \left(1 - \frac{X}{X_{m\acute{a}x}} \right)$	Dódic <i>et al.</i> (2012)	(17)

Sendo $\mu_{\text{máx}}$ a máxima velocidade específica de crescimento ou reprodução; K_s a constante de saturação, que representa a concentração de substrato na qual a velocidade máxima de crescimento é a metade do seu valor máximo (HISS, 2001); $X_{\text{máx}}$ a máxima concentração microbiana; $P_{\text{máx}}$ a máxima concentração de produto; e n , K_{SS} , K_{SX} , K_{PX} , outros parâmetros cinéticos dos modelos.

A equação empírica proposta Monod, Equação (12), tem sido comumente empregada para explicar a influência da concentração do substrato sobre a velocidade específica de crescimento. Amillastre *et al.* (2012) aplicaram a equação de Monod modificada considerando a inibição por etanol para definir a taxa específica de crescimento como uma função do substrato limitante em fermentação alcoólica e concluíram que o modelo pode ser aplicado como uma ferramenta eficiente de otimização de processos industriais com base no coeficiente de correlação obtidos igual a 0,96. Porém alguns casos, o modelo de Monod não é adequado para fornecer uma boa representação dos dados experimentais e outros modelos bioquímicos foram propostos, como os modelos de Moser, Teissier, Ghose e Tyagi e Hinshelwood (BIROL *et al.*, 1998; ENSWEILER *et al.*, 2014).

Birol *et al.* (1998) testaram vários modelos cinéticos com o intuito de descrever matematicamente a fermentação alcoólica por meio de *S. cerevisiae* imobilizada, dentre eles os modelos de Monod, Moser, Teissier, Ghose e Tyagi e Hinshelwood; e concluíram que os modelos de Monod e Hinshelwood foram os mais apropriados ao descrever o comportamento do processo fermentativo. Jin *et al.* (2012) utilizaram o modelo cinético de Hinshelwood para descrever o processo fermentativo de *S. cerevisiae* imobilizada crescendo em meios com diferentes concentrações iniciais de sorgo sacarino. O modelo de Hinshelwood apresentou consistência nos valores dos parâmetros e alto valor de coeficiente de correlação, 0,9976.

O crescimento microbiano é comumente acompanhado com base na curva que representa o crescimento de células ao longo do tempo, em sistema descontínuo. Para isso, um meio de cultura favorável, em condições que permitam o crescimento celular, é inoculado com uma população de células viáveis. O comportamento dos valores de concentração celular ao longo do tempo fornece a curva de crescimento microbiano.

A Figura 4 ilustra as fases no crescimento microbiano: (1) Fase “lag” ou de adaptação na qual a célula sintetiza as enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes presentes no meio. Nesta fase inicial não há reprodução celular, ou seja, a concentração de células é constante, $X = X_0$. (2) Fase de transição, se observa o início da reprodução celular propriamente dita, porém nem todos os microrganismos completaram a fase anterior simultaneamente. (3) Fase exponencial ou logarítmica, onde os microrganismos já estão adaptados ao meio e há

presença de nutrientes em excesso. A população inteira começa a se dividir em um intervalo regular médio de tempo. Nesta fase a taxa de crescimento microbiano é constante e máxima. (4) Fase linear de crescimento, que contrariamente à fase exponencial, a taxa de crescimento não é constante. A presença desta fase indica limitação no transporte de nutrientes do meio para o interior da célula. (5) Fase de desaceleração devido ao esgotamento de um ou mais compostos essenciais ao metabolismo celular e acúmulo de metabólitos inibidores. (6) Fase estacionária, onde a concentração celular se mantém constante e alcança seu valor máximo, X_m . (7) Fase de morte ou declínio caracterizada pela perda irreversível da capacidade de divisão celular e morte celular, causando uma diminuição na concentração de células viáveis (HISS, 2001).

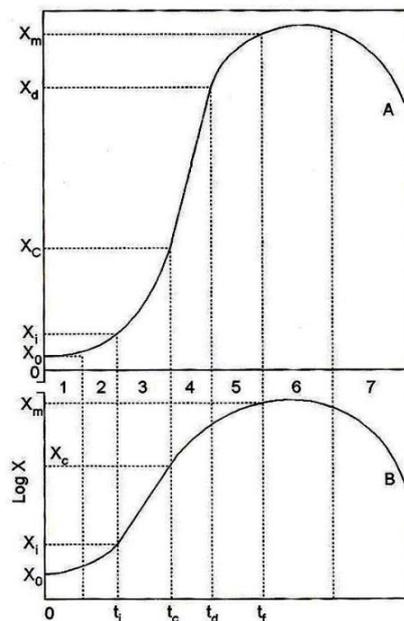


Figura 4 - Curva de crescimento do microrganismo em cultivo descontínuo: (A) em ordenadas lineares; (B) em ordenadas logarítmicas

Fonte: Hiss (2001).

Phisalaphong *et al.* (2006) propuseram uma equação para o comportamento transiente celular ao longo do processo de fermentação alcoólica. Na equação proposta, Equação (18), inseriram o parâmetro k_d com o objetivo de prever a fase de morte celular. Apesar dos dados experimentais apresentarem uma leve queda na concentração de células na parte final do experimento, é possível notar, por meio do gráfico apresentado na Figura 5, que o modelo matemático proposto pelos autores não foi eficiente no sentido de prever uma tendência de decaimento de concentração de concentração celular.

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - k_d) \cdot X \quad (18)$$

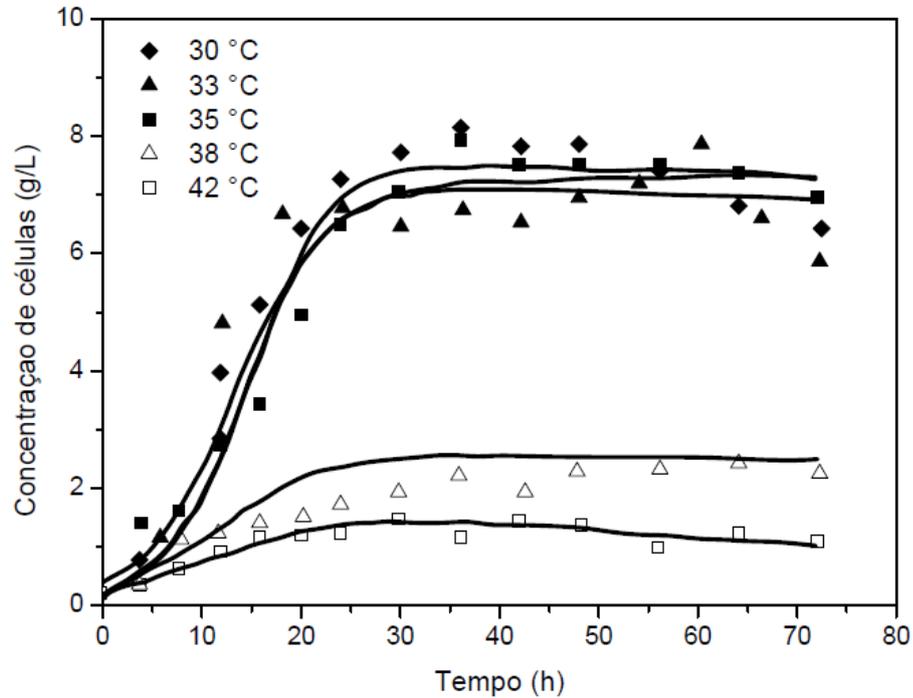


Figura 5 - Resultados experimentais e simulação da concentração celular.

Fonte: Phisalaphong *et al.* (2006), com adaptações.

Fan *et al.* (2015) estudaram a cinética da fermentação contínua por *S. cerevisiae* e propuseram um termo integral para prever a fase de morte celular, Equação (19), a partir do gráfico apresentado pelos autores (Figura 6) é possível inferir que o modelo se ajustou aos dados experimentais.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_0 \cdot X \left(1 - \frac{X}{X_\infty} \right) - \int_0^t K_0 X(t) dt \quad (19)$$

Sendo K_0 o termo responsável pela morte celular; X_∞ a concentração máxima de microrganismo e μ_0 a taxa específica de crescimento celular.

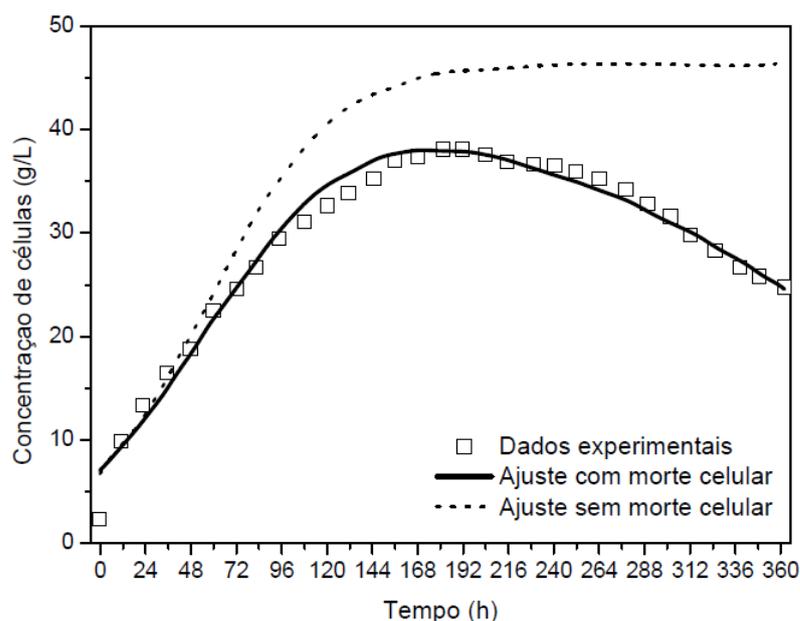


Figura 6 - Resultados experimentais e simulação da concentração celular.

Fonte: Fan *et al.* (2015), com adaptações.

2.2. Modelagem Matemática

Segundo Volesky e Votruba (1992) modelagem é o processo no qual o analista propõe um conjunto de relações matemáticas, juntamente com condições de contorno e iniciais, de modo a estabelecer relações entre as variáveis do processo. A modelagem matemática de processos fermentativos pode ser definida como a tentativa de representar os balanços de massa para cada componente no biorreator, associados às complexas transformações bioquímicas que ocorrem no processo e às velocidades com que essas transformações ocorrem (BONOMI e SCHMIDELL, 2001; SCHWAAB *et al.*, 2008). Um sistema biológico envolve leis físico-químicas, bioquímicas e genéticas que, somada às limitações matemáticas, o torna complexo. Então, a modelagem matemática compreende a conversão deste sistema complexo em um sistema análogo e simplificado que torne mais fácil a análise, predição, extrapolação, manipulação e otimização do sistema. Dessa forma, os modelos, em geral, fornecem uma representação fiel de apenas algumas das propriedades do processo (VOLESKY e VOTRUBA, 1992; BONOMI e SCHMIDELL, 2001; CHOU e VOIT, 2009).

Segundo Chou e Voit (2009), a complexidade da modelagem matemática de sistemas biológicos pode ser descrita, de modo geral, através de cinco aspectos: (i) os processos e interações biológicas são não-lineares e complexos, portanto, é necessário que a estrutura matemática compreenda estas não-linearidades; (ii) a resposta dinâmica dos sistemas biológicos

implica em modelos quase sempre compostos por um conjunto de equações diferenciais; (iii) sistemas biológicos reais são normalmente compostos de diferentes níveis de componentes e interações, que exigem estruturas matemáticas com capacidade de serem ampliadas para modelos biológicos cada vez maiores; (iv) sistemas biológicos podem ter características estocásticas quando poucas moléculas estão envolvidas, portanto, o modelo matemático deve estar apto a representar comportamentos estocásticos quando estes forem dominantes no processo; e (v) reações biológicas raramente ocorrem em meio homogêneo, mas estão comumente restritos a superfícies, canais, organelas ou compartimentos.

Além destes aspectos, os sistemas de fermentação bioquímicos são altamente sensíveis a variações em condições operacionais e, para assegurar o alcance do máximo rendimento em produto, é necessário garantir um controle eficaz para que as condições dentro do biorreator permaneçam essencialmente programadas em torno de uma condição ótima especificada. Assim, os modelos matemáticos são importantes ferramentas para a otimização e controle de processos biotecnológicos; e reduzem potencialmente os custos do processo por meio da sua compreensão e consequente eliminação de etapas experimentais desnecessárias, porque permite o estudo de vários parâmetros da processo através da simulação (RIVERA *et al.*, 2006; MENDES *et al.*, 2011; DODIĆ *et al.*, 2012; DA ROS *et al.*, 2013; ENZWEILER *et al.*, 2014).

2.2.1. Balanços de Massa

Como já dito, os modelos matemáticos para processos biológicos podem ser propostos com base nos balanços de massa para cada componente do biorreator (BONOMI e SCHMIDELL, 2001), que podem ser obtidos a partir da equação geral de balanço molar para qualquer espécie j que está entrando, saindo, reagindo e/ou acumulando no interior do volume do sistema, V , Equação (20) (FOGLER, 2009):

$$\frac{dN_j}{dt} = F_{j0} - F_j + \int r_j \cdot dV \quad (20)$$

Sendo N_j , o número de mols da espécie j no sistema no tempo t ; F_0 e F , as vazões molares de entrada e saída da espécie j ; e r_j , a velocidade de reação da espécie j .

- *Reator batelada*

Considerações

- Hipótese de mistura perfeita;
- Volume constante, um reator batelada não tem entrada nem saída de reagentes enquanto a reação está ocorrendo: $F_0 = F = 0$.

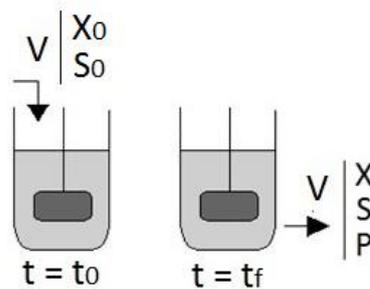


Figura 7 - Esquema de operação do reator batelada

A. Biomassa

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (21)$$

B. Substrato

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu \cdot X}{Y_{X/S}} \quad (22)$$

C. Produto

$$\frac{dP}{dt} = \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/P}} \quad (23)$$

- *Reator batelada alimentado*

Considerações

- Hipótese de mistura perfeita;

- (ii) No reator batelada alimentado há entrada de meio de cultura (substrato) e/ou nutrientes durante a fermentação e o volume, neste caso, não permanece constante, $\frac{dV}{dt} = F_0$;
- (iii) Durante o processo fermentativo não há vazão de saída, $F = 0$ e após o processo, o reator é completamente esvaziado.

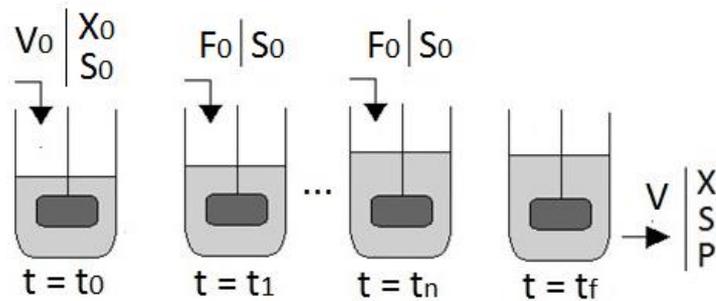


Figura 8 - Esquema de operação do reator batelada alimentada

A. Biomassa

$$\frac{dX}{dt} = X(\mu - D) \quad (24)$$

Sendo $D = F_0/V$ a vazão específica de diluição.

B. Substrato

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot (S_m - S) - \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/S}} \quad (25)$$

Sendo S_m a concentração de substrato no mosto de alimentação.

C. Produto

$$\frac{dP}{dt} = \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/P}} - P \cdot D \quad (26)$$

- *Reator contínuo*

Considerações

- (i) Mistura perfeita;
- (ii) Volume constante, $F_0 = F$;
- (iii) Estado estacionário, $\frac{dX}{dt} = \frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = 0$.

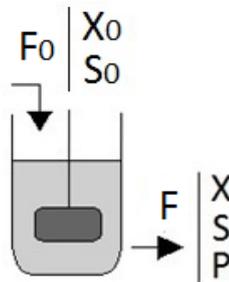


Figura 9 - Esquema de operação do reator contínuo

A. Biomassa

$$\mu = D \quad (27)$$

B. Substrato

$$D(S_0 - S) = \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/S}} \quad (28)$$

C. Produto

$$D \cdot P = \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/P}} \quad (29)$$

Além dos balanços de massa para cada reator, o comportamento das concentrações de interesse no processo pode ser expresso por meio de equações de crescimento populacional: tais como, o modelo de crescimento exponencial, Equação (30), o modelo de crescimento logístico, Equação (31) e o modelo de crescimento de Gompertz, Equação (32).

$$\begin{cases} \frac{dP}{dt} = rP \\ P(0) = P_0, r > 0 \end{cases} \quad (30)$$

$$\begin{cases} \frac{dP}{dt} = rP \left(1 - \frac{P}{P_\infty}\right) \\ P(0) = P_0, r > 0 \end{cases} \quad (31)$$

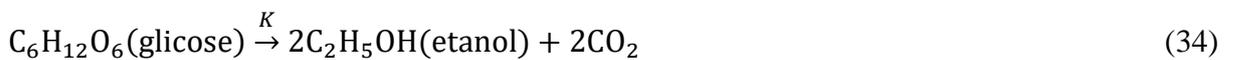
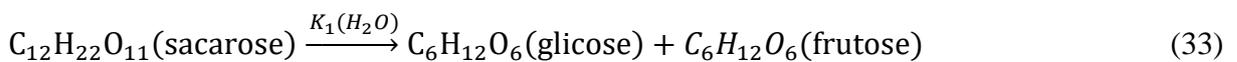
$$\begin{cases} \frac{dP}{dt} = r \cdot P \cdot \ln\left(\frac{P_\infty}{P}\right) \\ P(0) = P_0, r > 0 \end{cases} \quad (32)$$

Sendo P_∞ , a concentração máxima de produto e r um parâmetro de proporcionalidade.

Dodić *et al.* (2012) utilizaram uma equação de crescimento logístico modificada para modelar o crescimento de células de levedura e um modelo modificado de Gompertz para descrever a formação de etanol durante uma fermentação alcoólica em batelada. De acordo com os autores os modelos exibiram um bom ajuste aos dados experimentais, resultando em um coeficiente de correlação igual a 0,997.

- Glicose

Para descrever o comportamento da glicose (S_1) durante o processo fermentativo foi desenvolvida uma equação baseada na taxa de reação para a glicose no sistema de reações da fermentação alcoólica:



Sob a hipótese de que estas reações são elementares, tem-se:

$$r_{\text{glicose}} = \frac{dS_1}{dt} = K_1 \cdot S - K \cdot S_1 \quad (35)$$

Sendo K_1 e K (h^{-1}) as constantes cinéticas das reações (34) e (35), respectivamente.

2.3. Estimação de Parâmetros

De acordo com Schwaab e Pinto (2007), a estimação de parâmetros consiste na variação dos parâmetros de um modelo referência até que a predição deste modelo se torne o mais próximo possível dos dados experimentais, respeitadas as incertezas da medição. A escolha da estrutura do modelo influencia no grau de complexidade, viabilidade e praticabilidade da estimação de parâmetros (CHOU e VOIT, 2009). O problema de estimação de parâmetros compreende as etapas de determinação da função-objetivo; minimização da função-objetivo proposta de modo a encontrar o melhor conjunto possível de parâmetros para o modelo; e por fim, análise estatística precisa dos parâmetros ajustados (SCHWAAB e PINTO, 2007).

A função-objetivo mede a distância existente entre os dados experimentais e os dados previstos pelo modelo. Pode ser difícil decidir que função está mais próxima dos dados experimentais quando uma transformação matemática precisa não está disponível, por isso é tão importante introduzir uma definição precisa da função-objetivo (SCHWAAB e PINTO, 2007; CHOU e VOIT, 2009; DA ROS *et al.*, 2013). O método da máxima verossimilhança, Equação (36), é um procedimento que descreve a região de confiança e a partir dele são deduzidas, por exemplo, a função de mínimos quadrados e a função ponderada de mínimos quadrados. O método foi formulado sob as hipóteses de modelo perfeito e experimento bem feito (SCHWAAB *et al.*, 2008). Segundo Schwaab (2005) “o método de máxima verossimilhança maximiza a probabilidade de serem observados, no modelo proposto, os valores experimentais efetivamente obtidos”. (SCHWAAB, 2005; SCHWAAB e PINTO, 2007).

$$S(\theta) = \frac{(2\pi)^{-NE/2}}{\sqrt{\det(V_e)}} \exp \left[-\frac{1}{2} (z^e - z^m)^T \cdot V_e^{-1} \cdot (z^e - z^m) \right] \quad (36)$$

Sendo $S(\theta)$ a curva de densidade de probabilidade, que descreve a probabilidade de se encontrarem as medidas experimentais, z^e , dados os valores reais, z^m , e uma medida da variância dos erros experimentais, V_e .

A função de mínimos quadrados, Equação (37), busca minimizar as diferenças quadráticas dos desvios observados entre as medidas experimentais e calculadas, mas quando a diferença na grandeza das variáveis medidas é significativa ou mesmo quando os erros associados às medições experimentais são diferentes, a utilização da função de mínimos quadrados se torna inadequada. Neste caso, pode ser utilizada a função de mínimos quadrados

ponderada pela variância, Equação (38), que permite uma análise estatística mais rigorosa dos resultados da estimação e leva em consideração a diferença relativa da ordem de grandeza das variáveis (SCHWAAB, 2005; SCHWAAB e PINTO, 2007).

$$F_{obj} = \sum_{i=1}^{NE} (y_i^e - y_i^m)^2 \quad (37)$$

$$F_{obj} = \sum_{i=1}^{NE} \sum_{j=1}^{NY} \frac{(y_{ij}^e - y_{ij}^m)^2}{\sigma_{ij}} \quad (38)$$

Sendo NE, o número de dados experimentais; NY, o número de variáveis independentes; y^e , o vetor de dados experimentais; e y^m , o vetor de dados calculados com o modelo; σ , a variância das flutuações experimentais.

O valor da função-objetivo, aplicada na estimação de parâmetros, pode ser utilizado como critério para comparação de modelos. Um baixo valor de função-objetivo indica melhor performance do modelo, porém também se faz necessária uma análise estatística para assegurar que os parâmetros são estatisticamente significativos e fisicamente realísticos (ENZWEILER *et al.*, 2014).

Uma vez definida a função-objetivo, a etapa seguinte é a minimização desta função. A minimização consiste na busca de um conjunto de parâmetros onde a função atinja o menor valor possível (SCHWAAB, 2005). É importante ressaltar que, uma vez definidos a função-objetivo, o modelo e os dados experimentais, o mínimo da função-objetivo já está, também, definido. O papel do método de otimização é encontrar esta solução desconhecida pelo usuário (SCHWAAB e PINTO, 2007).

Os métodos de minimização de função-objetivo tradicionalmente utilizados são os métodos determinísticos, nos quais, a partir de uma estimativa inicial dos parâmetros, busca-se o mínimo da função-objetivo. Dentre estes métodos, destacam-se os métodos de Newton, os quais fazem uso do Gradiente e da matriz Hessiana da função-objetivo (SCHWAAB, 2005; DA ROS *et al.*, 2013). A aplicação dos métodos tradicionais em modelos não lineares pode gerar dificuldades, impedindo, em alguns casos, a determinação do ótimo global associado ao modelo matemático. Para transpor estas dificuldades, os métodos heurísticos de otimização surgem como uma alternativa eficiente e robusta. Dentre eles, destacam-se o método de Monte Carlo, o Algoritmo Genético, o Recozimento Simulado e o Enxame de Partículas que será aplicado neste trabalho. Estes métodos são caracterizados por um caráter estocástico na busca do ótimo, um grande número de avaliações da função-objetivo e por realizarem uma busca global em toda

a região de interesse. Além disso, não dependem de uma boa estimativa inicial dos parâmetros e não utilizam derivadas durante a otimização (SCHWAAB, 2005; SCHWAAB e PINTO, 2007; DA ROS *et al.*, 2013).

Schwaab (2005) concluiu que o Enxame de Partículas permite melhorar a performance da estimação de parâmetros com menos esforço computacional, quando comparado ao algoritmo genético e o recozimento simulado.

2.3.1. Enxame de Partículas - Particle Swarm Algorithms (PSO)

O método do Enxame de Partículas foi originalmente proposto por Kennedy e Eberhart (1995), inspirado no comportamento social de grupos de animais, como peixes e pássaros. O método consiste na otimização de uma função-objetivo através da troca de informações entre os elementos (partículas) do grupo, resultando em um algoritmo eficiente, robusto e de simples implementação computacional (SCHWAAB, 2005; SCHWAAB e PINTO, 2007).

PSO utiliza um conjunto de possíveis soluções, denominadas partículas, com as suas respectivas posições iniciais dadas aleatoriamente a partir de um espaço de busca, Ω . A cada iteração, cada partícula é atribuída com uma velocidade, também inicializados de forma aleatória em Ω , de acordo com as suas próprias experiências e as de seus companheiros, ou seja, os outros membros do conjunto da população. A velocidade de cada partícula é atualizada utilizando a melhor posição que visitou até agora e a melhor posição global visitada por seus companheiros. Em seguida, a posição de cada partícula é atualizada usando sua velocidade atualizada por iteração (EBERHART e KENNEDY, 1995).

As equações que determinam a velocidade e a posição da partícula ao longo das iterações podem ser escritas como:

$$v_{i,d}^{k+1} = w \cdot v_{i,d}^k + c_1 \cdot r_1 \cdot (p_{i,d}^k - a_{i,d}^k) + c_2 \cdot r_2 \cdot (p_{global,d}^k - a_{i,d}^k) \quad (39)$$

$$a_{i,d}^{k+1} = a_{i,d}^k + v_{i,d}^{k+1} \quad (40)$$

Os índices k , i e d denotam, respectivamente, a iteração, a partícula e a direção de busca; v é a velocidade e a é a posição no espaço de busca (estimativas de parâmetro); w é um peso de inércia; c_1 e c_2 são duas constantes positivas, parâmetro cognitivo e social, respectivamente; r_1 e r_2 são dois números aleatórios com distribuição uniforme no intervalo $[0,1]$; p_i é o melhor ponto encontrado pela partícula e p_{global} é o melhor valor encontrado por todo o enxame, ou

parte dele (SCHWAAB e PINTO, 2007). Um esquema do algoritmo do enxame de partículas está apresentado no Anexo A.

2.3.2. *Região de Confiança*

Região de confiança dos parâmetros é a região em n dimensões em função dos parâmetros, na qual estão projetados os valores da função-objetivo. Esta região está compreendida entre o valor mínimo e o valor calculado com 95% de confiança. Para modelos lineares a aproximação quadrática da função-objetivo é exata e determina a região de confiança dos parâmetros estimados. Esta região de confiança é definida como um elipsoide, onde o ponto estimado para os parâmetros do modelo se encontra no centro desse elipsoide. Já para modelos não lineares a região definida pela aproximação linear do modelo e aproximação quadrática da função-objetivo não é exata, o que pode acarretar conclusões equivocadas sobre os parâmetros e sobre a região de confiança (SCHWAAB *et al.*, 2008; SCHWAAB, 2005).

Os métodos heurísticos como o PSO possuem uma desvantagem de necessitarem de um grande número de avaliações da função-objetivo, porém os resultados obtidos por meio desse grande número de iterações podem ser utilizados para traçar a região de confiança sem que seja necessária a realização de aproximações (SCHWAAB, 2005).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Processo Fermentativo

O microrganismo utilizado para proceder a fermentação alcoólica foi a levedura *S. cerevisiae* proveniente de fermento comercial da marca Lesaffre Saf-instant. A levedura foi adicionada ao meio de cultura a uma concentração de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (DODIĆ *et al.*, 2012). O meio de cultura foi composto de fosfato monopotássico (KH_2PO_4), $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$), $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; cloreto de amônio (NH_4Cl), $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; cloreto de potássio (KCl), $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; extrato de levedura, $3,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e sacarose $125 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, proveniente de açúcar comercial (BORGES, 2008).

O processo fermentativo foi realizado em biorreator MS Mistura modelo MSM 205/500 com volume útil de 1 L (Figura 10). A temperatura foi mantida em $32 \text{ }^\circ\text{C}$ e o pH do meio em 3,0. A agitação foi de 175 rpm para garantir a transferência de calor e massa adequadas e evitar a formação excessiva de espuma (BORGES, 2008). Inicialmente, o biorreator operou em processo descontínuo (batelada) para que fosse obtido o conhecimento básico da cinética do processo. Posteriormente, o biorreator operou em processo semicontínuo, que é o foco de estudo deste trabalho. Ambos os processos fermentativos foram realizados em triplicata.

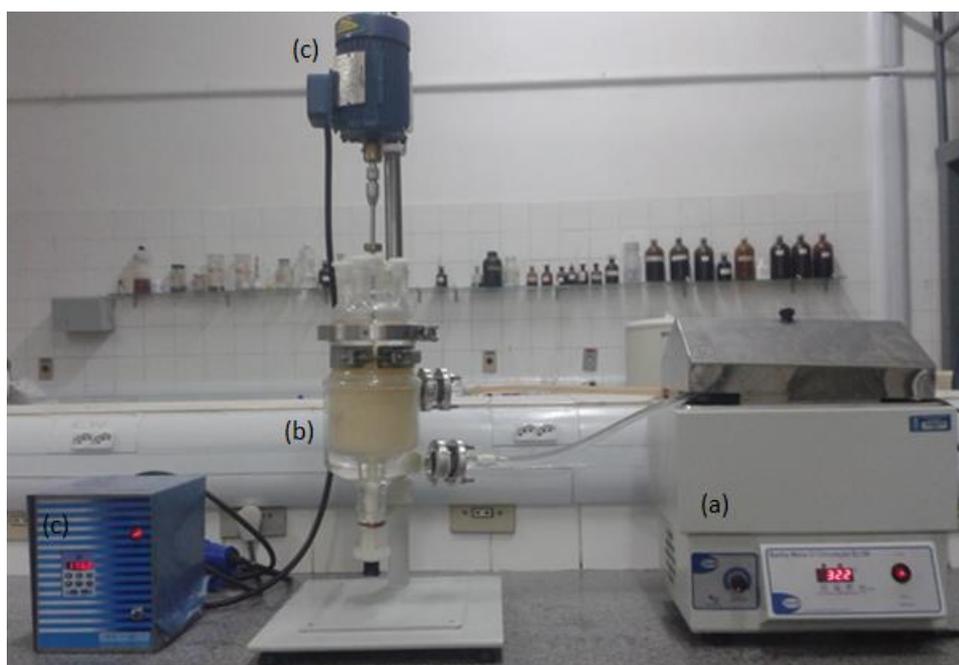


Figura 10 – (a) Banho-maria com circulação; (b) Biorreator isotérmico; (c) Agitação

Durante o processo em batelada foi determinado o tempo final de fermentação de 15 h e as condições propostas para operação do biorreator foram ratificadas como propícias ao desenvolvimento dos microrganismos e à produção do etanol.

Na operação em processo semicontínuo foi utilizado o tempo definido no processo descontínuo, 15 h, para a realização das operações de carga e descarga do reator. Deste modo, quando foi atingido o tempo de 15 h de fermentação, 50% do volume de meio fermentado foi retirado e o restante foi mantido no reator. Em seguida, foi adicionado ao reator um volume de meio de fermentação igual ao volume de meio fermentado retirado, ou seja, 50% do volume total. A sequência das operações de carga e descarga descrita foi repetida por três vezes, totalizando 60 h de fermentação.

3.2. Métodos Analíticos

Durante a fermentação foram retiradas alíquotas de 25 mL, no intervalo de 3 h, para o acompanhamento das concentrações de biomassa, sacarose e etanol. Para as análises das concentrações de sacarose e etanol foi realizada previamente centrifugação da amostra a 4200 rpm, por 20 minutos, e, posteriormente, a 12500 rpm, por 15 minutos, para diminuir a interferência da presença da biomassa nestas análises.

3.2.1. Concentração de Biomassa

A concentração de biomassa durante a fermentação foi determinada pelo método descrito por DODIĆ *et al.* (2012) com algumas adaptações. O método utiliza uma dependência espectrofotométrica: absorvância como uma função da concentração de células de levedura.

Antes de iniciar a fermentação, foram preparadas suspensões no meio de cultura com leveduras comerciais em concentrações conhecidas. As suspensões foram realizadas no meio de cultura que foi utilizado no processo fermentativo para cancelar a interferência do meio utilizado durante a medida da absorvância (DODIĆ *et al.*, 2012).

A concentração real de biomassa foi determinada por meio da medida de peso seco, onde 20 mL de meio de cultura isento de leveduras e 20 ml de cada uma das suspensões preparadas foram colocadas em cadinhos previamente secos e pesados. As amostras foram inicialmente secas em estufa a vácuo a 77,89 kPa e 38 °C por 48 h, posteriormente foram congeladas por 25 minutos a -85 °C e por fim liofilizadas à temperatura de -52 °C por 16 h, até atingirem peso constante.

A absorvância das suspensões foi medida em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 660 nm utilizando meio de cultura isento de levedura como branco, proporcionando, assim, sua dependência com a concentração de células de levedura. A curva de calibração obtida foi a seguinte:

$$A_{660\text{nm}} = 3,1318. [X] \quad (41)$$

Sendo [X] a concentração de biomassa em g/L. O coeficiente de correlação, r^2 , desta correlação linear foi igual a 0,9669. O gráfico do ajuste linear está apresentado no Apêndice A.

3.2.2. Concentração de Sacarose e Glicose

A determinação da concentração de sacarose e glicose foi realizada pelo método do DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). No procedimento reacional do método, uma alíquota de 0,25 mL da amostra a ser analisada foi transferida para um tubo de ensaio onde foram adicionados 2 mL do reagente DNS. A mistura foi agitada vigorosamente e o tubo foi levado para banho-maria com água em ebulição (100 °C) por 5 minutos. A reação foi interrompida com a imersão do tubo em banho de água fria e a mistura foi diluída com água destilada. Após homogeneização, foi realizada a leitura da intensidade da cor em espectrofotômetro a 480 nm, contra uma amostra de calibração. Para prepará-la, a amostra foi substituída por água destilada e seguiu o procedimento descrito para o método do DNS (VASCONCELOS *et al.*, 2013; MILLER, 1959; RODRIGUES e SANTOS, 2011).

Previamente, foram preparadas soluções de glicose com concentrações conhecidas para a construção da curva-padrão da concentração de açúcares redutores (AR), de modo a estabelecer a correlação entre a absorvância medida e a quantidade de açúcares redutores presente:

$$A_{480\text{nm}} = 0,1228. [AR] \quad (42)$$

Sendo [AR] a concentração de açúcares redutores. O coeficiente de determinação, r^2 , desta correlação linear foi igual a 0,9958, Apêndice A.

Este método determina o teor de açúcares redutores como a glicose, no caso da determinação do teor de sacarose, que se trata de um açúcar não redutor, as amostras foram submetidas a uma hidrólise ácida antes de seguirem o procedimento reacional do método para

possibilitar a determinação do teor de açúcares redutores totais (ART). A concentração de sacarose foi então obtida por meio da subtração da concentração de ART da concentração de AR (VASCONCELOS *et al.*, 2013; RODRIGUES e SANTOS, 2011).

- *Preparo do reagente DNS*

Foram preparadas duas soluções, denominadas neste trabalho de A e B. Na solução A foram dissolvidos, por aquecimento, 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico em 100 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 2 M. Separadamente, foram dissolvidos, também com aquecimento, 150 g de tartarato duplo de sódio e potássio em 250 mL de água destilada, formando a solução B. As duas soluções foram misturadas em balão volumétrico de 500 mL e o volume completado com água destilada. O reagente foi mantido sob refrigeração em embalagem de vidro âmbar (VASCONCELOS *et al.*, 2013).

- *Hidrólise ácida para a determinação de açúcares redutores totais*

Para proceder a hidrólise ácida 5 mL da amostra foram adicionados em um tubo de ensaio juntamente com 7 mL de água destilada e, em seguida, a solução foi aquecida em banho-maria a 70 °C, até atingir a temperatura de 65 °C. A amostra foi retirada do banho-maria e foram adicionados imediatamente 2,5 mL de solução de ácido clorídrico (HCl) 1:1 (v/v). A mistura foi homogeneizada e colocada em repouso por 30 minutos. Após esse tempo a mistura foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL avolumado com água destilada. Foi transferida uma alíquota 10 mL do hidrolisado diluído para balão volumétrico de 50 mL, onde foi adicionada solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 mol/L até completar o volume do balão. Foi pipetado 0,25 mL desta solução e se procedeu a determinação de ART conforme procedimento já descrito (RODRIGUES e SANTOS, 2011).

3.2.3. *Concentração de Etanol*

Foi utilizado um método espectrofotométrico para a determinação de teores alcoólicos em mistura hidroalcoólicas (MAGRÍ *et al.*, 1997; SALIK e POVH, 1993 apud STECKELBERG, 2001). A quantificação do etanol foi realizada através da comparação com uma curva-padrão construída com concentrações conhecidas de etanol.

No procedimento reacional do método uma alíquota 1 mL da amostra e 1 mL de solução sulfocrômica foram colocadas em um tubo de ensaio que permaneceu em banho-maria a 30 °C

durante 15 minutos. Após o término da reação, foram adicionados 8 mL de água destilada ao tubo de ensaio e a mistura foi homogeneizada. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a um comprimento de onda de 600 nm contra um branco preparado com água destilada submetida ao mesmo procedimento reacional. A quantificação da concentração de etanol foi feita através da comparação com uma curva-padrão construída com concentrações conhecidas de etanol, a saber:

$$A_{600\text{nm}} = 0,3189 \cdot [\text{etanol}] \quad (43)$$

O coeficiente de correlação, r^2 , observado para esta correlação linear foi igual a 0,9971, Apêndice A.

Alguns compostos presentes na amostra podem interferir na leitura espectrofotométrica, então foi necessário o preparo de uma amostra desalcoolizada para que fosse possível eliminar o efeito desses interferentes na determinação do teor alcoólico. Esta amostra desalcoolizada seguiu o mesmo procedimento analítico previamente descrito. Assim, a absorbância real da amostra analisada foi dada pela diferença entre a absorbância da amostra centrifugada e a absorbância da amostra desalcoolizada e a concentração de álcool foi determinada por meio da expressão obtida para a curva-padrão.

- *Preparo da solução sulfocrômica*

Para o preparo da solução sulfocrômica, 5 g de dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) foram dissolvidos em 8,5 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). O ácido sulfúrico foi adicionado paulatinamente e com o auxílio de pequenas quantidades de água destilada para favorecer a dissolução do dicromato de potássio. Essa solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, que foi avolumado com água destilada, envolvido com papel alumínio e mantido sob refrigeração.

- *Preparo da amostra desalcoolizada*

Para o preparo da amostra desalcoolizada 10 mL da amostra centrifugada foram colocados sob aquecimento em chapa aquecedora a uma temperatura de aproximadamente 80 °C para que o etanol presente na amostra evaporasse. Ao fim deste processo, o volume inicial, de 10 mL, foi recomposto com a adição de água destilada.

3.3. Modelagem Matemática

3.3.1. Reator Batelada

No estudo do reator batelada, cinco modelos, apresentados na Tabela 2, foram adotados e avaliados.

Tabela 2 - Equações dos Modelos Matemáticos adotados para o Reator Batelada

Modelo	Biomassa	Sacarose	Glicose	Etanol	Cinética
MMI	$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$	$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu \cdot X}{Y_{X/S}}$	$\frac{dS_1}{dt} = K_1 \cdot S - K \cdot S_1$	$\frac{dP}{dt} = \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/P}}$	$\mu = \frac{\mu_{\text{máx}} \cdot S}{K_S + S}$
MMII	$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$	$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu \cdot X}{Y_{X/S}}$	$\frac{dS_1}{dt} = K_1 \cdot S - K \cdot S_1$	$\frac{dP}{dt} = \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/P}}$	$\mu = \mu_{\text{máx}} \left(1 - \frac{X}{X_{\text{máx}}}\right)$
MMIII	$\frac{dX}{dt} = (\mu - K_d) \cdot X$	$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu \cdot X}{Y_{X/S}}$	$\frac{dS_1}{dt} = K_1 \cdot S - K \cdot S_1$	$\frac{dP}{dt} = \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/P}}$	$\mu = \mu_{\text{máx}} \left(1 - \frac{X}{X_{\text{máx}}}\right)$
MMIV	$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$	$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu \cdot X}{Y_{X/S}}$	$\frac{dS_1}{dt} = K_1 \cdot S - K \cdot S_1$	$\frac{dP}{dt} = \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/P}}$	$\mu = \mu_{\text{máx}} \left(1 - \frac{P}{P_{\text{máx}}}\right)$
MMV	$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$	$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu \cdot X}{Y_{X/S}}$	$\frac{dS_1}{dt} = K_1 \cdot S - K \cdot S_1$	$\frac{dP}{dt} = \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/P}}$	$\mu = \mu_{\text{máx}} \left(\frac{S}{K_{SX} + S}\right) (1 - K_{PX} \cdot P)$

3.3.2. Reator Semicontínuo

O modelo proposto para este reator foi baseado nos balanços de massa. Nesse reator, ao fim da fermentação, uma fração α (50%) do seu volume útil foi retirada, enquanto quase que instantaneamente, a mesma fração do volume de meio de cultura é adicionada ao fermentador. Portanto, esse reator opera sob a hipótese de volume constante:

$$\frac{dN_j}{dt} = F_{j0} + r_j \cdot V \quad (44)$$

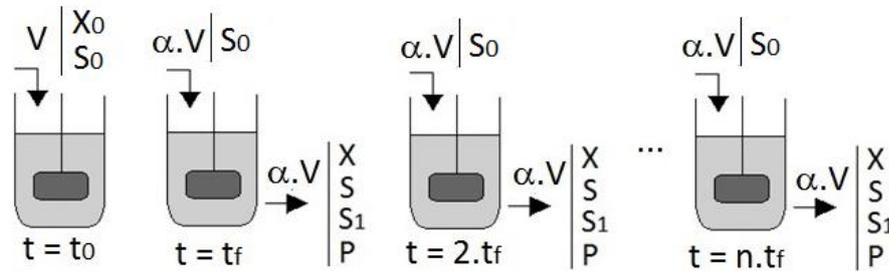


Figura 11 - Esquema de operação do reator semicontínuo

Como neste biorreator há a saída de biomassa, substrato e produto e adição imediata de substrato quando o tempo atingir um t_i , definido como tempo final da fermentação ($t_f = 15$ h), um delta de Dirac (δ) é definido para descrever o processo de descarga e recarga:

$$\begin{cases} \delta = 0, & t \neq t_f \\ \delta = 1, & t = t_f \end{cases} \quad (45)$$

A. Biomassa

Neste biorreator não há entrada de biomassa, há somente saída:

$$\frac{dX}{dt} = -\delta \cdot D \cdot X + \mu \cdot X \quad (46)$$

Sendo $D = \frac{F_0}{V} = \frac{V_{D/R}}{\Delta t \cdot V} = \frac{\alpha}{\Delta t}$, $V_{D/R}$ é o volume de descarga/recarga, Δt é o tempo de descarga/recarga (que deve ser o menor possível), V é o volume do reator e α é a fração de volume de descarga/recarga (que foi fixada em 0,5).

B. Substrato

No caso do substrato há a uma vazão de entrada e de saída:

$$\frac{dS}{dt} = \delta \cdot D(S_0 - S) - \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/S}} \quad (47)$$

C. Produto

$$\frac{dP}{dx} = \delta \cdot D \cdot P + \frac{\mu \cdot X}{Y_{X/P}} \quad (48)$$

Na modelagem do reator semicontínuo foram adotadas as equações de balanço apresentadas nas Equações (45) a (47), juntamente com a Equação (35) e a cinética proposta por Dódic *et al.* (2012), Equação (17).

Os modelos propostos para ambos reatores foram resolvidos através da sub-rotina DASSL, previamente implementada no compilador FORTRAN. A DASSL é um código para solução numérica de sistemas implícitos de equações algébrico-diferenciais (PETZOLD, 1982).

3.4. Estimação dos Parâmetros Cinéticos

As equações dos modelos apresentados na Tabela 2, bem como o modelo proposto para o reator semicontínuo, foram adimensionadas a partir das relações (48) a (52) e estão apresentadas na Tabela 3. O adimensionamento das equações que descrevem o modelo é uma ferramenta que permite uma melhor compreensão das variáveis significativas do problema (BARROS, 2010).

$$X^* = \frac{X - X_0}{X_F - X_0} \quad (49)$$

$$S^* = \frac{S - S_0}{S_F - S_0} \quad (50)$$

$$S_1^* = \frac{S_1 - S_{10}}{S_{1F} - S_{10}} \quad (51)$$

$$P^* = \frac{P}{P_F} \quad (52)$$

$$t^* = \frac{t}{t_F} \quad (53)$$

Tabela 3 - Equações adimensionais dos modelos propostos

Reator Batelada: Modelo Matemático I	
Modelo	MMI
Biomassa	$\frac{dX^*}{dt^*} = \mu^*(\gamma_x + X^*)$
Sacarose	$\frac{dS^*}{dt^*} = -\frac{\mu^*(\lambda_{S1} + \lambda_{S2} \cdot X^*)}{Y_{X/S}}$
Glicose	$\frac{dS_1^*}{dt^*} = K_1^*(\lambda_{S10} + \lambda_{S11} \cdot S^*) - K^*(\gamma_{S1} + S_1^*)$
Etanol	$\frac{dP^*}{dt^*} = \frac{\mu^*(\lambda_{P1} + \lambda_{P2} \cdot X^*)}{Y_{X/P}}$
Cinética	$\mu^* = \frac{\mu_{max}^*(\gamma_S + S^*)}{K_S^* + \gamma_S + S^*}$
Reator Batelada: Modelo Matemático II	
Modelo	MMII
Biomassa	$\frac{dX^*}{dt^*} = \mu^*(\gamma_x + X^*)$
Sacarose	$\frac{dS^*}{dt^*} = -\frac{\mu^*(\lambda_{S1} + \lambda_{S2} \cdot X^*)}{Y_{X/S}}$
Glicose	$\frac{dS_1^*}{dt^*} = K_1^*(\lambda_{S10} + \lambda_{S11} \cdot S^*) - K^*(\gamma_{S1} + S_1^*)$
Etanol	$\frac{dP^*}{dt^*} = \frac{\mu^*(\lambda_{P1} + \lambda_{P2} \cdot X^*)}{Y_{X/P}}$
Cinética	$\mu^* = \mu_{max}^* \left(1 - \frac{X_0}{X_{máx}} - \frac{(X_F - X_0) \cdot X^*}{X_{max}} \right)$
Reator Batelada: Modelo Matemático III	
Modelo	MMIII
Biomassa	$\frac{dX^*}{dt^*} = (\mu^* - K_d^*)(\gamma_x + X^*)$
Sacarose	$\frac{dS^*}{dt^*} = -\frac{\mu^*(\lambda_{S1} + \lambda_{S2} \cdot X^*)}{Y_{X/S}}$
Glicose	$\frac{dS_1^*}{dt^*} = K_1^*(\lambda_{S10} + \lambda_{S11} \cdot S^*) - K^*(\gamma_{S1} + S_1^*)$
Etanol	$\frac{dP^*}{dt^*} = \frac{\mu^*(\lambda_{P1} + \lambda_{P2} \cdot X^*)}{Y_{X/P}}$
Cinética	$\mu^* = \mu_{max}^* \left(1 - \frac{X_0}{X_{máx}} - \frac{(X_F - X_0) \cdot X^*}{X_{max}} \right)$

Tabela 3 - Equações adimensionais dos modelos propostos (continuação)

Reator Batelada: Modelo Matemático IV	
Modelo	MMIV
Biomassa	$\frac{dX^*}{dt^*} = \mu^*(\gamma_x + X^*)$
Sacarose	$\frac{dS^*}{dt^*} = -\frac{\mu^*(\lambda_{S1} + \lambda_{S2} \cdot X^*)}{Y_{X/S}}$
Glicose	$\frac{dS_1^*}{dt^*} = K_1^*(\lambda_{S10} + \lambda_{S11} \cdot S^*) - K^*(\gamma_{S1} + S_1^*)$
Etanol	$\frac{dP^*}{dt^*} = \frac{\mu^*(\lambda_{P1} + \lambda_{P2} \cdot X^*)}{Y_{X/P}}$
Cinética	$\mu^* = \mu_{max}^* \left(1 - \frac{P^*}{P_{m\acute{a}x}/P_F} \right)$
Reator Batelada: Modelo Matemático V	
Modelo	MMV
Biomassa	$\frac{dX^*}{dt^*} = \mu^*(\gamma_x + X^*)$
Sacarose	$\frac{dS^*}{dt^*} = -\frac{\mu^*(\lambda_{S1} + \lambda_{S2} \cdot X^*)}{Y_{X/S}}$
Glicose	$\frac{dS_1^*}{dt^*} = K_1^*(\lambda_{S10} + \lambda_{S11} \cdot S^*) - K^*(\gamma_{S1} + S_1^*)$
Etanol	$\frac{dP^*}{dt^*} = \frac{\mu^*(\lambda_{P1} + \lambda_{P2} \cdot X^*)}{Y_{X/P}}$
Cinética	$\mu^* = \mu_{max}^* \left(\frac{\gamma_S + S^*}{K_{SX}^* + \gamma_S + S^*} \right) (1 - (K_{PX}^* \cdot P^*))$
Modelo Matemático Reator Semicontínuo	
Modelo	Reator Semicontínuo
Biomassa	$\frac{dX^*}{dt^*} = (\mu^* - \delta \cdot D^*)(\gamma_x + X^*)$
Sacarose	$\frac{dS^*}{dt^*} = \delta \cdot D^*(\gamma_{SM} - \gamma_S - S^*) - \frac{\mu^*(\lambda_{S1} + \lambda_{S2} \cdot X^*)}{Y_{X/S}}$
Glicose	$\frac{dS_1^*}{dt^*} = -(\delta \cdot D^* + K^*)(\gamma_{S1} + S_1^*) + K_1^*(\lambda_{S10} + \lambda_{S11} \cdot S^*)$
Etanol	$\frac{dP^*}{dt^*} = -\delta \cdot D^* \cdot P^* + \frac{\mu^*(\lambda_{P1} + \lambda_{P2} \cdot X^*)}{Y_{X/P}}$
Cinética	$\mu^* = \frac{\mu_{max}^*(\gamma_S + S^*)}{K_S^* + \gamma_S + S^*}$

Tabela 4 - Equações das constantes dos modelos adimensionais

$\gamma_x = \frac{X_0}{X_F - X_0}$	$\lambda_{S10} = \frac{S_0}{S_{1F} - S_{10}}$	$\mu_{max}^* = \mu_{max} \cdot t_F$
$\lambda_{S1} = \frac{X_0}{S_F - S_0}$	$\lambda_{S11} = \frac{S_F - S_0}{S_{1F} - S_{10}}$	$K_S^* = \frac{K_S}{S_F - S_0}$
$\lambda_{S2} = \frac{X_F - X_0}{S_F - S_0}$	$\gamma_{S1} = \frac{S_{10}}{S_{1F} - S_{10}}$	$\gamma_S = \frac{S_0}{S_F - S_0}$
$K_1^* = K_1 \cdot t_F$	$\lambda_{P1} = \frac{X_0}{P_F}$	$K_d^* = K_d \cdot t_F$
$K^* = K \cdot t_F$	$\lambda_{P2} = \frac{X_F - X_0}{P_F}$	$K_{SX}^* = \frac{K_{SX}}{S_F - S_0}$
$K_{PX}^* = K_{PX} \cdot P_F$	$D^* = D \cdot t_F$	-

O ajuste dos parâmetros dos modelos cinéticos propostos e adimensionados foi realizado através da aplicação do ESTIMA. O ESTIMA é um programa híbrido baseado no algoritmo heurístico de enxame de partículas, PSO (Particle Swarm Optimization) (KENNEDY e EBERHART, 1995) e no método Gauss-Newton. A função-objetivo adotada foi a de mínimos quadrados, Equação (36). A Tabela 5 apresenta os parâmetros a serem estimados em cada um dos modelos propostos.

Tabela 5 - Parâmetros a serem estimados

Modelo	Número de parâmetros	Parâmetros a serem estimados
MMI	6	$\mu_{max}^*, K_1^*, K^*, Y_{X/S}, Y_{X/P}, K_S^*$
MMII	5	$\mu_{max}^*, K_1^*, K^*, Y_{X/S}, Y_{X/P}$
MMIII	6	$\mu_{max}^*, K_1^*, K^*, Y_{X/S}, Y_{X/P}, K_d^*$
MMIV	5	$\mu_{max}^*, K_1^*, K^*, Y_{X/S}, Y_{X/P}$
MMV	7	$\mu_{max}^*, K_1^*, K^*, Y_{X/S}, Y_{X/P}, K_{SX}^*, K_{PX}^*$
Reator Semicontínuo	6	$\mu_{max}^*, K_1^*, K^*, Y_{X/S}, Y_{X/P}, K_S^*$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Processo Fermentativo Descontínuo

O processo fermentativo descontínuo para a produção de etanol durou 15 h. A média e o desvio padrão das medidas das concentrações de biomassa [X], sacarose [S], glicose [S₁] e etanol [P] estão apresentados graficamente em função do tempo de fermentação na Figura 12.

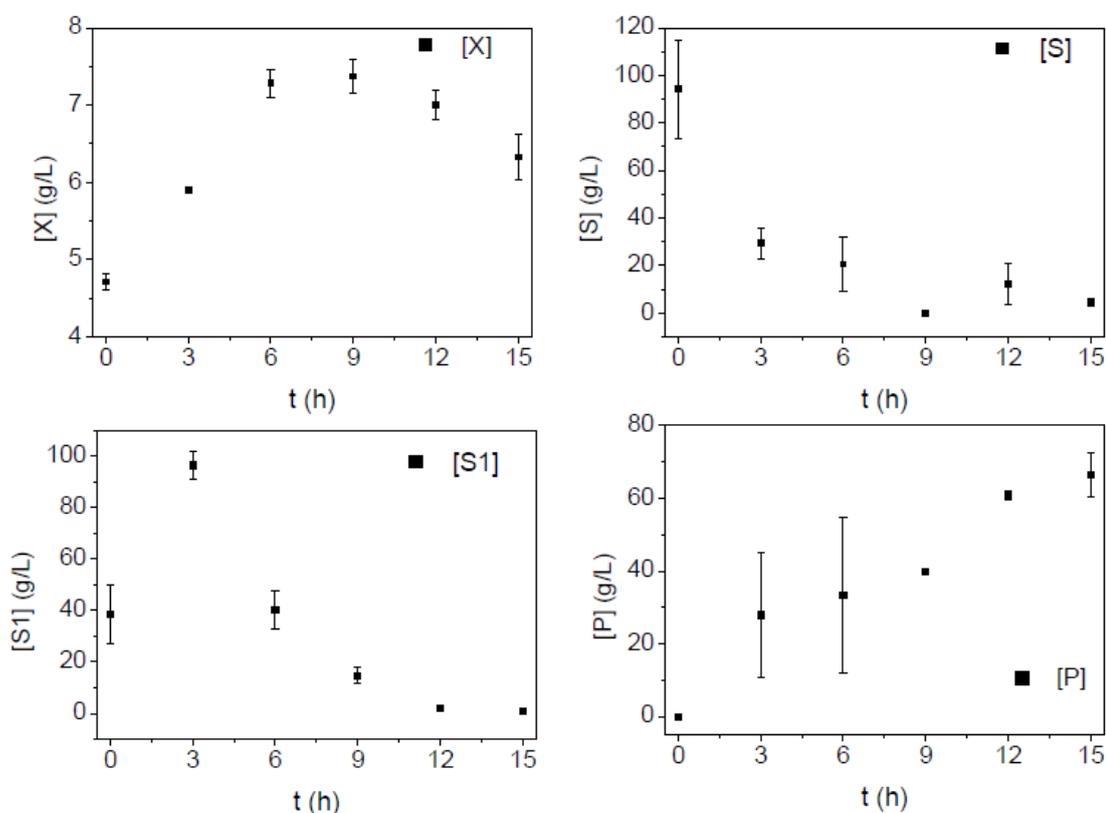


Figura 12 - Resultados experimentais do processo descontínuo: médias e desvios padrões.

Analisando os gráficos apresentados na Figura 12, é possível notar que a concentração de biomassa atingiu seu máximo depois de 9 h de fermentação ($X_{\text{máx}} = 7,375 \text{ g/L}$), período no qual também se observa o mínimo valor da concentração de sacarose, isto se deve ao fato da levedura estar metabolizando a sacarose tanto para o crescimento celular, quanto para a formação da glicose. A partir das 9 h de fermentação, a concentração de biomassa diminui, indicando a fase de morte celular. Neste período, além da baixa concentração de substrato, há uma grande concentração de etanol que pode estar agindo como inibidor no crescimento celular. Observando o gráfico apresentado para a glicose, sua formação ocorre nas primeiras 3 h, através

da inversão de sacarose em glicose, e a partir deste momento há seu consumo para a formação de etanol. Deste modo, é possível perceber que o comportamento das concentrações de biomassa, sacarose e etanol apresentados nos gráficos da Figura 12 se mostram condizentes com o comportamento previsto pela literatura clássica sobre processos fermentativos apresentado na Figura 3.

Com base nos dados experimentais e nas equações propostas nos modelos, os valores dos parâmetros foram obtidos através do ESTIMA e estão apresentados na Tabela 6, bem como os limites inferiores e superiores da região de confiança do modelo linearizado. Os valores das respectivas funções objetivos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 6 - Valores adimensionais dos parâmetros e limites de confiança do modelo linearizado

Modelo	Parâmetros	Valor estimado	Limite inferior	Limite superior
MMI	μ_{max}^*	1,73181	-13,4533	16,9169
	K_1^*	13,4756	-43,0195	69,9707
	K^*	7,10664	-25,7917	40,005
	$Y_{X/S}$	0,02420	0,00514	0,04326
	$Y_{X/P}$	0,04509	-0,02348	0,11365
	K_S^*	-0,27168	-7,81868	7,27532
MMII	μ_{max}^*	5,1164	-4,06185	14,2946
	K_1^*	37,5556	-653,156	728,267
	K^*	20,5343	-326,089	367,158
	$Y_{X/S}$	0,02795	0,01768	0,03822
	$Y_{X/P}$	0,04872	-0,01854	0,11597
	MMIII	μ_{max}^*	6,02782	-9,88614
K_1^*		50,3487	-3105,17	3205,87
K^*		27,2114	-1497,92	1552,34
$Y_{X/S}$		0,03235	-0,02016	0,08485
$Y_{X/P}$		0,05591	-0,05607	0,16788
K_d^*		0,09018	-0,8504	1,03076
MMIV	μ_{max}^*	1,74245	-1,46229	4,9472
	K_1^*	34,2418	-474,272	542,755
	K^*	18,5583	-240,627	277,743
	$Y_{X/S}$	0,02523	0,00377	0,04669
	$Y_{X/P}$	0,03607	0,00525	0,06689
	MMV	μ_{max}^*	27,9539	-2,27.10⁶
K_1^*		25,8375	-410,382	462,057
K^*		13,2141	-162,655	189,083
$Y_{X/S}$		0,02505	0,00391	0,0462
$Y_{X/P}$		0,04448	-0,02245	0,11141
K_{SX}^*		-13,6881	-1,20E.10⁶	1,20.10⁶
K_{PX}^*		0,06632	-7434,16	7434,29

Tabela 7 - Valores das funções objetivo dos modelos propostos no estudo do reator batelada

Modelo	Número de parâmetros	Função-objetivo
MMI	6	0,5291
MMII	5	0,6879
MMIII	6	0,6334
MMIV	5	0,7169
MMV	7	0,5603

Com base nos resultados apresentados na Tabela 7 foi possível concluir que o MMI foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais por apresentar o menor valor da função-objetivo dentre os modelos testados. Ainda analisando os dados expressos na Tabela 6, nota-se que vários parâmetros calculados não são significativos considerando os limites de confiança do modelo linearizado, pois o zero faz parte deste intervalo de confiança. Numa análise dos limites de confiança definidos pelo enxame de partículas, apresentados no Apêndice B, somente o parâmetro K_{px} do MMV não teria significância considerando a região de confiança. Por este motivo, foi realizada uma análise dos limites de confiança definidos pelo enxame de partículas, por meio dos resultados obtidos nas avaliações da função-objetivo, para a construção das respectivas regiões de confiança, apresentadas nas Figuras 13 a 17 e no Apêndice C.

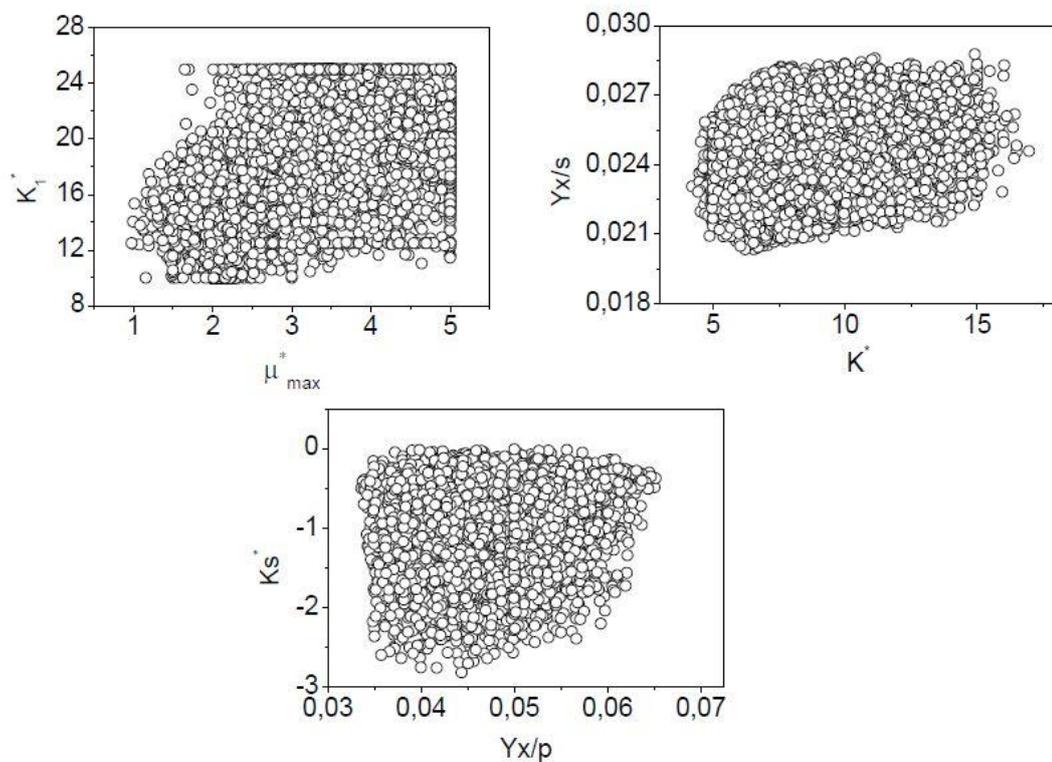


Figura 13 - Região de confiança do MMI

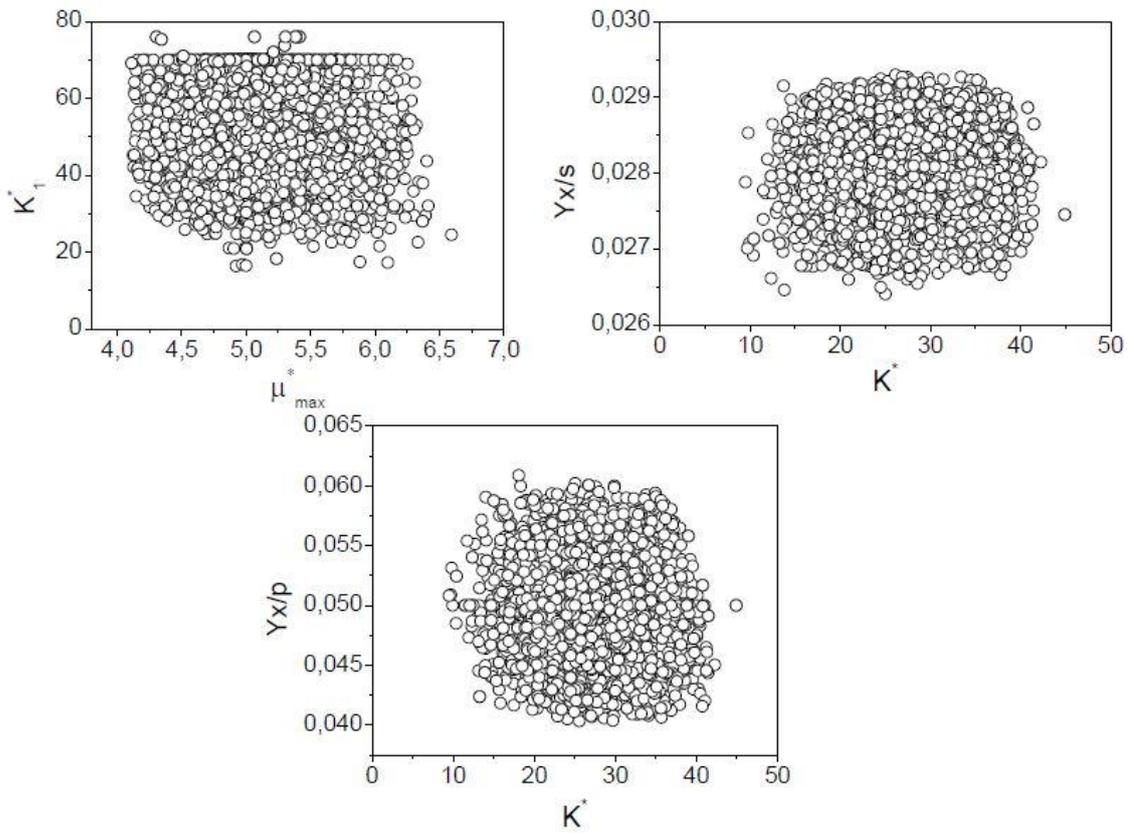


Figura 14 - Região de confiança do MMII

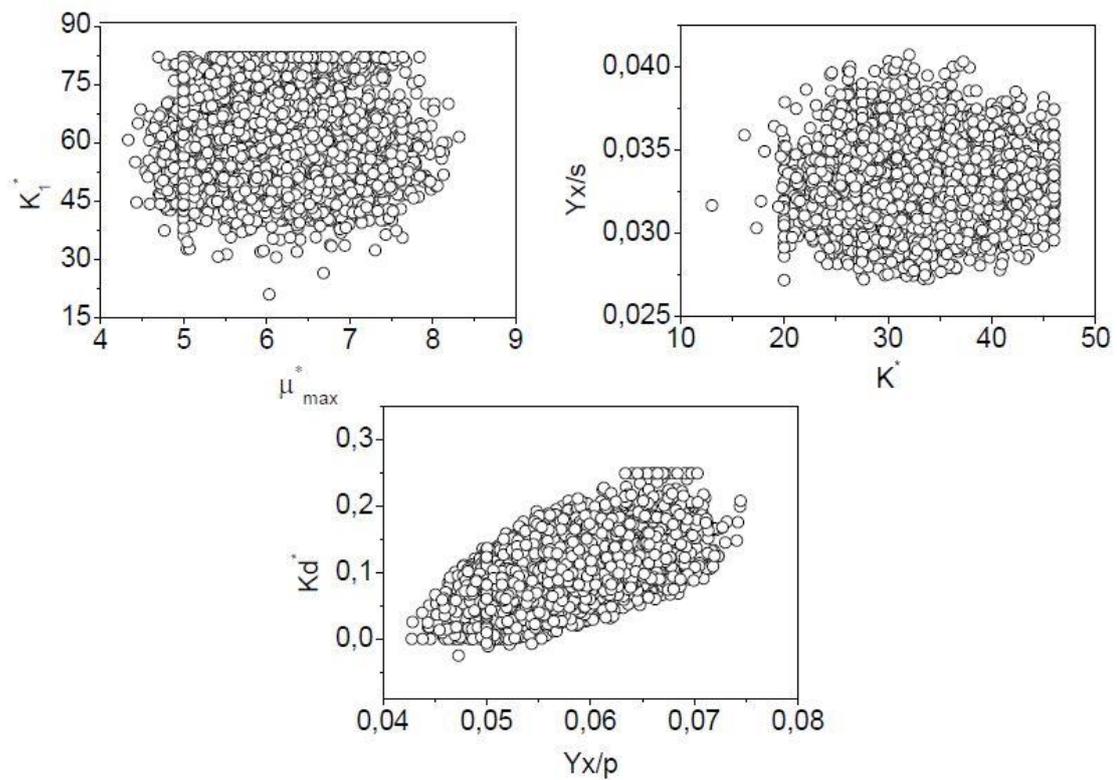


Figura 15 - Região de confiança do MMIII

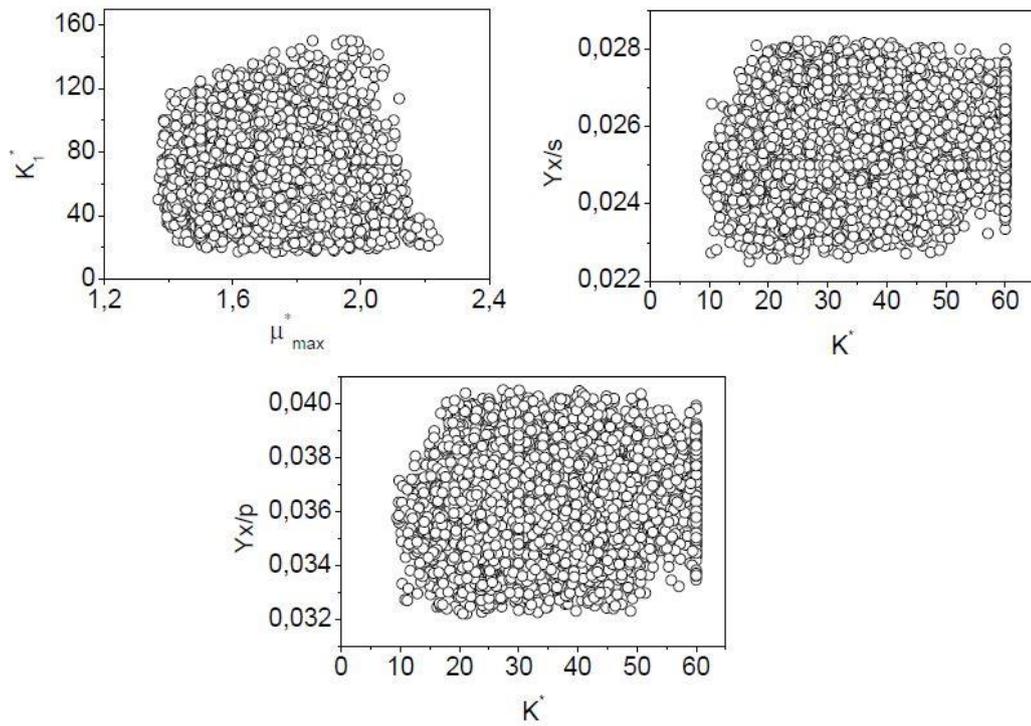


Figura 16 - Região de confiança MMIV

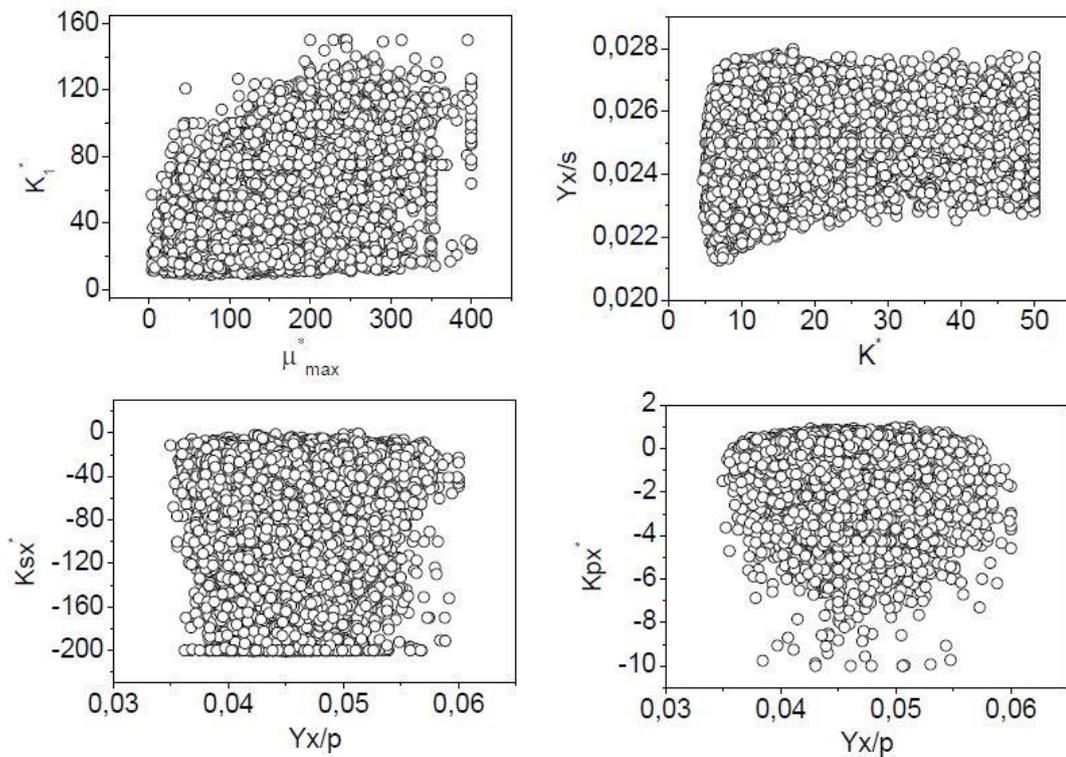


Figura 17 - Região de confiança MMV

A alta correlação entre os parâmetros impossibilitou a definição de todas as fronteiras das regiões de confiança apresentadas nas Figuras 13 a 17. Contudo, é possível comprovar que

os parâmetros são significativos estatisticamente, pois o zero não faz parte do intervalo de confiança, exceto para o caso dos parâmetros K_d^* , MMIII, e K_{PX}^* , MMV, que não são estatisticamente significativos, pois ao observar as Figuras 15 e 17, respectivamente, é possível perceber que o zero faz parte da sua região de confiança. A Tabela 8 apresenta os valores dos parâmetros estimados e suas respectivas unidades, onde os valores destacados em negrito não foram estatisticamente significativos.

Tabela 8 - Valores dos parâmetros estimados com suas respectivas unidades

Modelo	Parâmetros	Valor estimado
MMI $F_{obj} = 0,5291$	μ_{max}	0,1154 h ⁻¹
	K_1	0,8984 h ⁻¹
	K	0,4738 h ⁻¹
	$Y_{X/S}$	0,0242
	$Y_{X/P}$	0,0451
	K_S	24,3752 g·L ⁻¹
MMII $F_{obj} = 0,6879$	μ_{max}	0,3411 h ⁻¹
	K_1	2,5037 h ⁻¹
	K	1,3689 h ⁻¹
	$Y_{X/S}$	0,0279
	$Y_{X/P}$	0,0487
MMIII $F_{obj} = 0,6334$	μ_{max}	0,4018 h ⁻¹
	K_1	3,3566 h ⁻¹
	K	1,8149 h ⁻¹
	$Y_{X/S}$	0,0323
	$Y_{X/P}$	0,0559
	K_d	0,0060 h⁻¹
MMIV $F_{obj} = 0,7169$	μ_{max}	0,1162 h ⁻¹
	K_1	2,2828 h ⁻¹
	K	1,2372 h ⁻¹
	$Y_{X/S}$	0,0252
	$Y_{X/P}$	0,0361
MMV $F_{obj} = 0,5603$	μ_{max}	1,8636 h ⁻¹
	K_1	1,7225 h ⁻¹
	K	0,8809 h ⁻¹
	$Y_{X/S}$	0,0250
	$Y_{X/P}$	0,0445
	K_{SX}	-1228,0826 g·L ⁻¹
	K_{PX}	0,00099 L·g⁻¹

Nas Figuras 18 a 22 estão apresentados os gráficos comparativos entre os dados obtidos experimentalmente e os dados preditos pelos modelos.

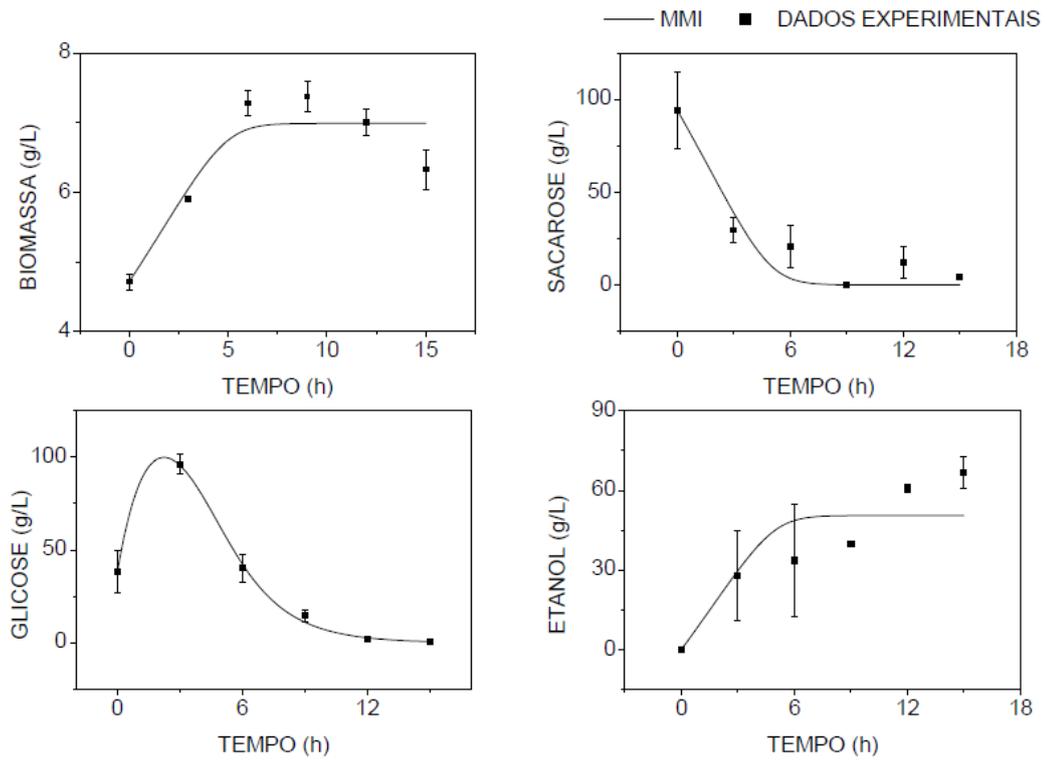


Figura 18 - MMI: valores experimentais x valores preditos pelo modelo

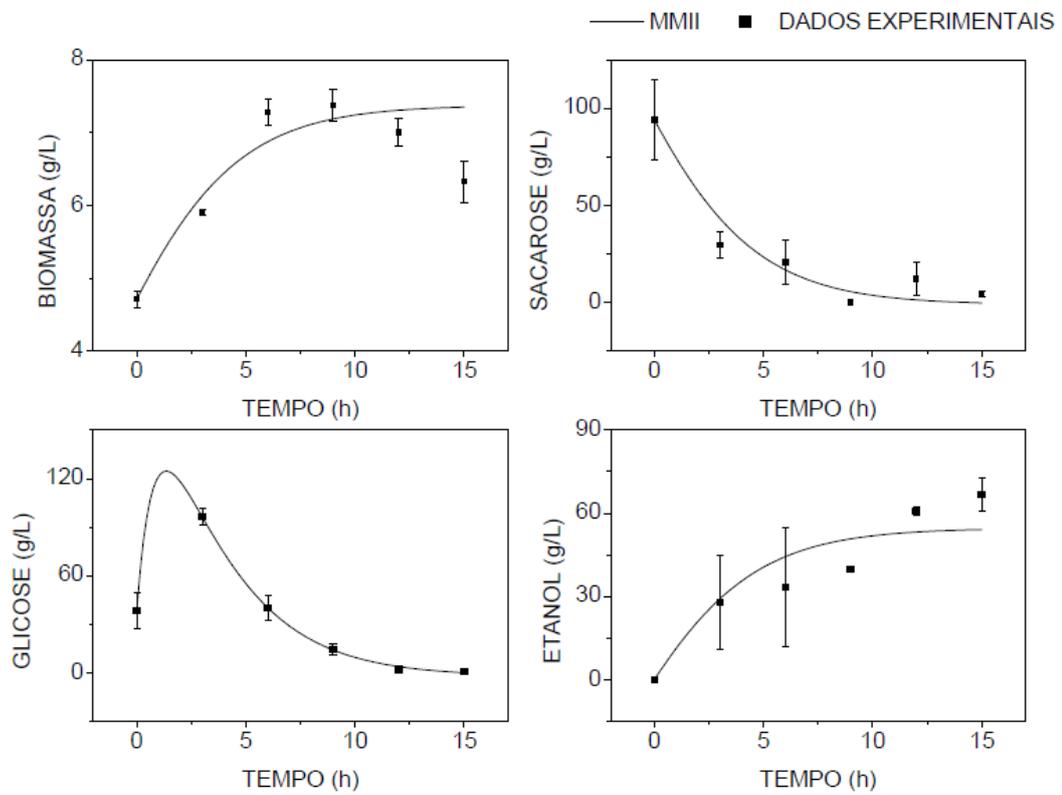


Figura 19 - MMII: valores experimentais x valores preditos pelo modelo

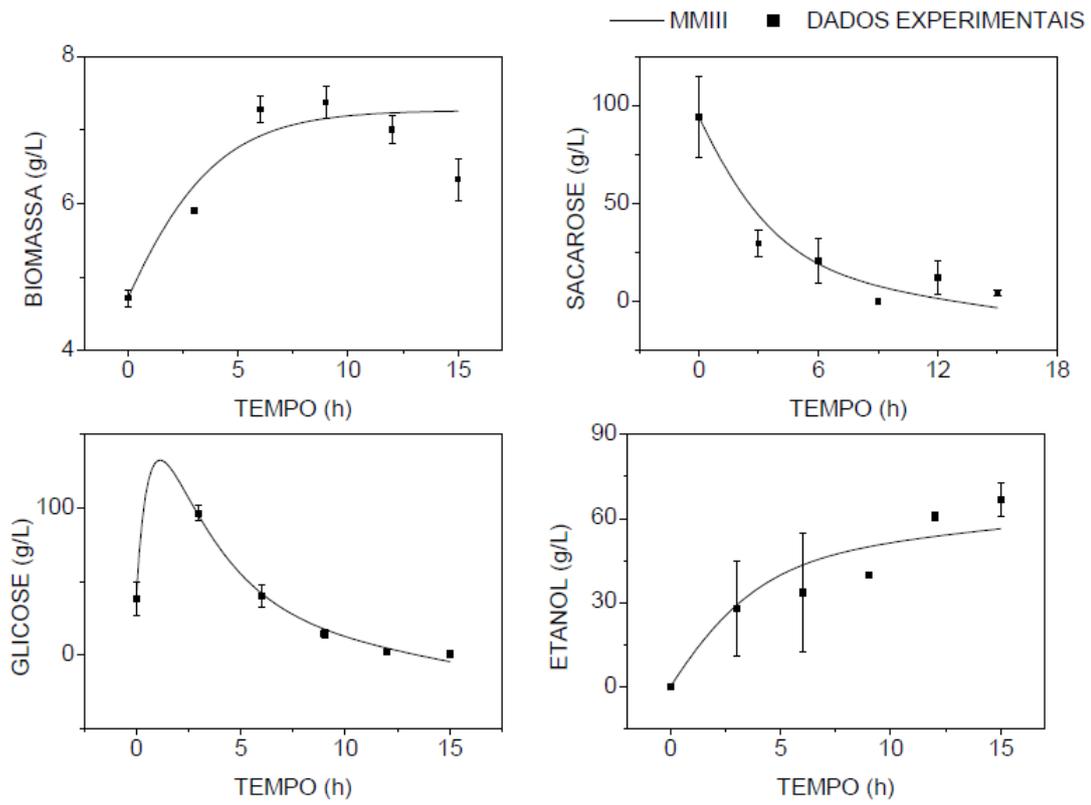


Figura 20 - MMIII: valores experimentais x valores preditos pelo modelo

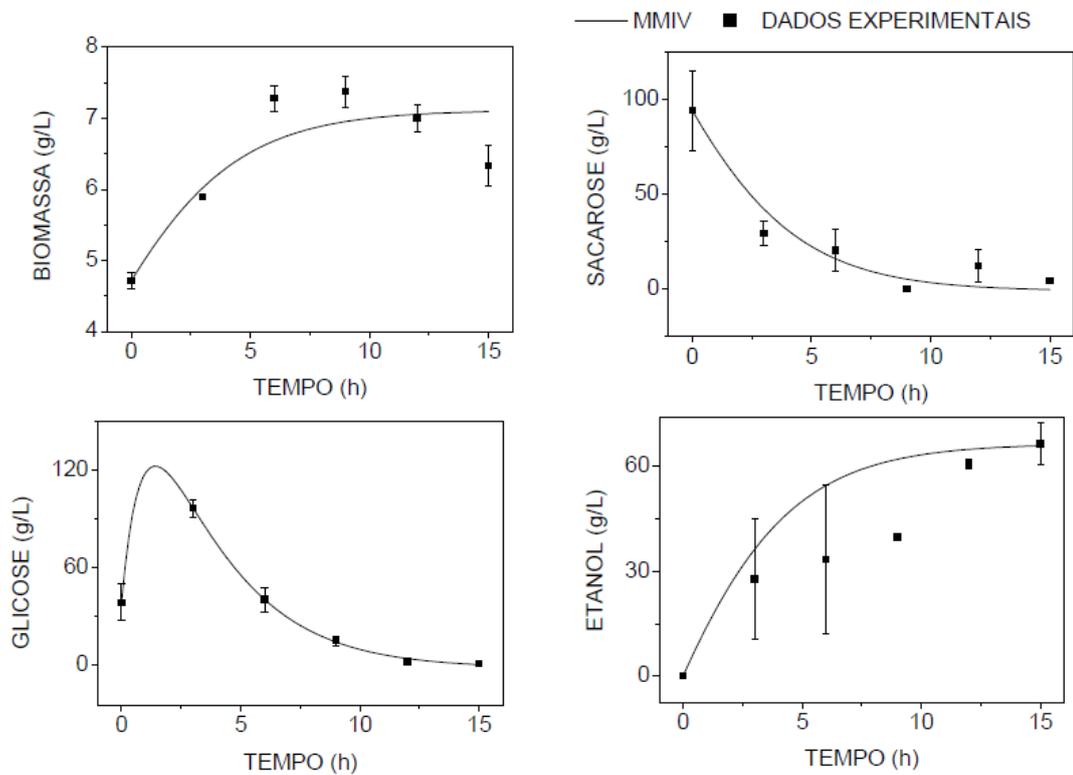


Figura 21 - MMIV: valores experimentais x valores preditos pelo modelo

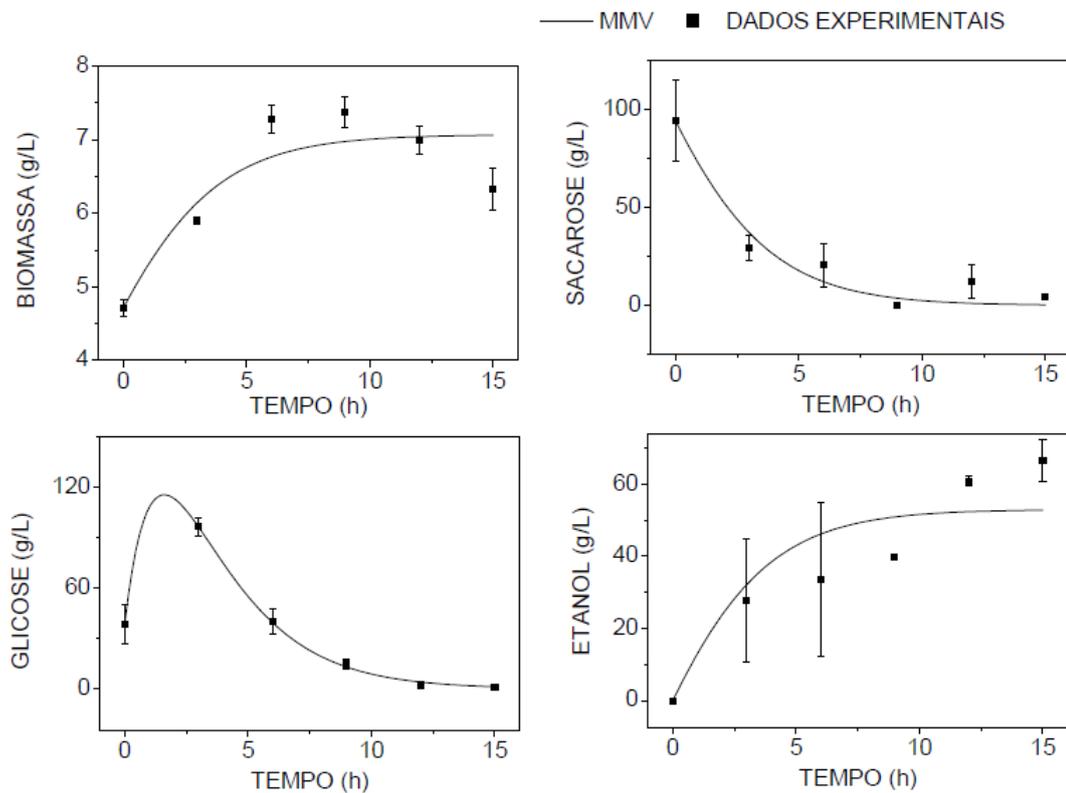


Figura 22 - MMV: valores experimentais x valores preditos pelo modelo

Observando esses gráficos, é notável que nenhum dos modelos testados foi capaz de prever de forma satisfatória os comportamentos de morte celular das leveduras e formação de produto. De modo a melhorar o ajuste destes dados experimentais diferentes modelos podem ser testados, bem como a utilização de uma análise estatística mais detalhada pode ser empregada para discriminar estes modelos. No entanto, nenhum modelo é capaz de descrever completamente um fenômeno porque todo dado experimental possui erros de medida e nem todas as variáveis podem ser controladas precisamente durante os testes experimentais (SCHWAAB e PINTO, 2007).

4.2. Processo Fermentativo Semicontínuo

O processo fermentativo semicontínuo para a produção de etanol teve duração de 60 h e foram realizadas descargas e recargas a cada 15 h. A média e o desvio padrão das medidas das concentrações de biomassa [X], sacarose [S], glicose [S_1] e etanol [P] estão representados graficamente em função do tempo de fermentação nas Figuras 23 a 26.

Com base nestes gráficos, é possível observar que o reator semicontínuo apresentou o comportamento esperado: tendo um comportamento de reator batelada entre os processos de

carga e descarga, e apresentando o choque de carga devido à retirada instantânea de meio fermentado e adição de substrato ao reator. É possível observar também que durante o intervalo de tempo entre 45 e 60 h, o biorreator apresentou baixo crescimento de células e baixa conversão de sacarose a glicose e etanol, esse efeito pode ser explicado por um provável arraste de células viáveis durante a descarga/recarga do reator que poderia ser evitado caso o reator operasse com reciclo de células.

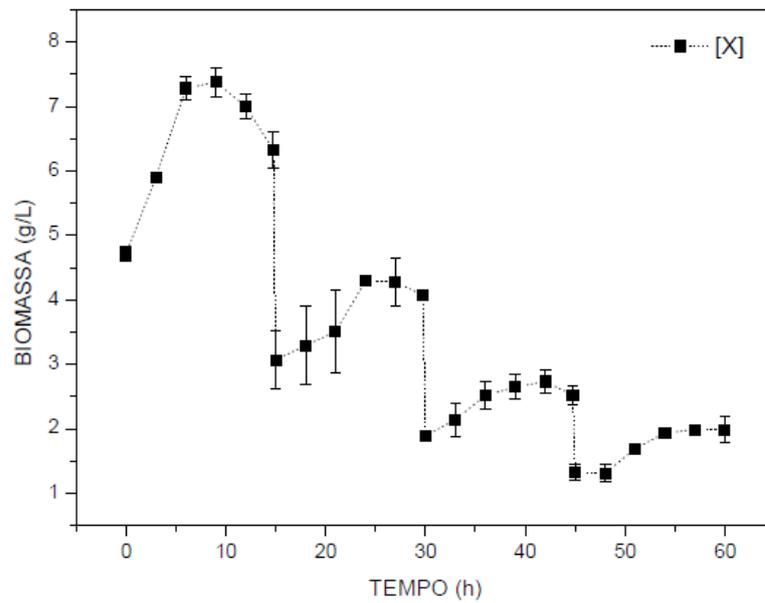


Figura 23 - Resultados experimentais da concentração de biomassa no processo semicontínuo: médias e desvios padrões.

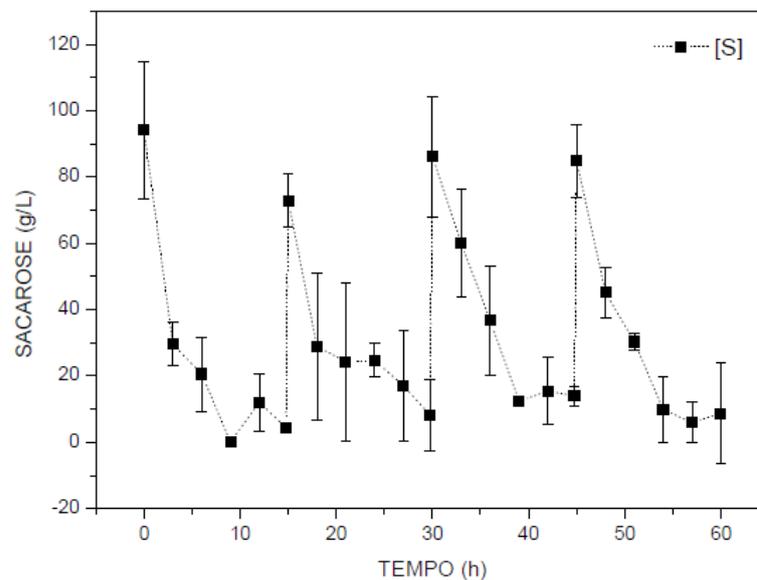


Figura 24 - Resultados experimentais da concentração de sacarose no processo semicontínuo: médias e desvios padrões.

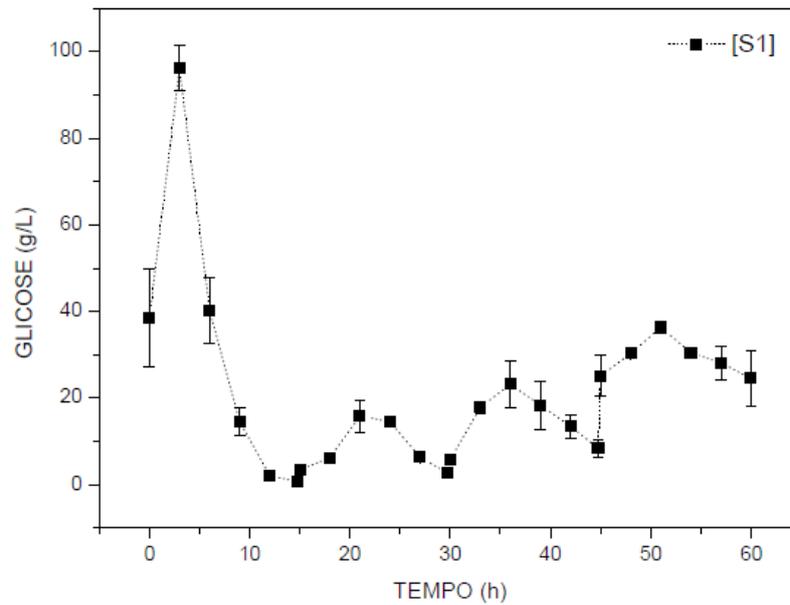


Figura 25 - Resultados experimentais da concentração de glicose no processo semicontínuo: médias e desvios padrões.

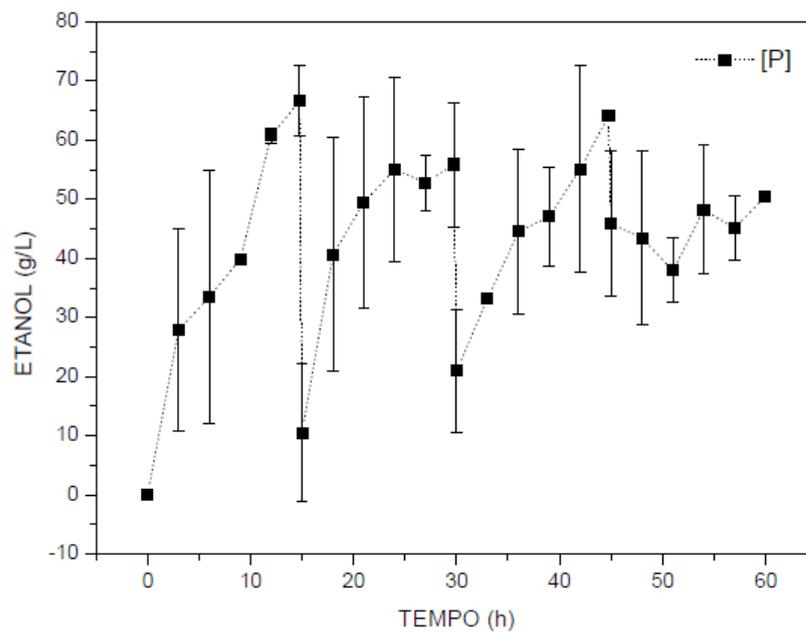


Figura 26 - Resultados experimentais da concentração de etanol no processo semicontínuo: médias e desvios padrões.

Para a estimação de parâmetros foram utilizados os valores de α igual a 0,5 e Δt igual a 0,25 h, assim o D^* foi igual a 30. Os valores dos parâmetros estimados com seus respectivos limites inferiores e superiores, definidos pelo modelo linearizado, estão apresentados na Tabela 8, e o valor da função-objetivo alcançado na estimação que foi igual a 7,47528. Assim como observado no estudo dos modelos propostos para o reator descontínuo, um dos parâmetros (K_S^*)

foi considerado sem significância estatística por meio da análise do modelo linearizado, Tabela 9. Neste caso, analisando os dados expostos no Apêndice B, todos os valores estimados dos parâmetros estão compreendidos entre os limites inferior e superior do enxame de partículas, fornecendo indícios que sejam significativos estatisticamente.

Tabela 9 - - Valores adimensionais dos parâmetros e limites de confiança do modelo linearizado para o reator semicontínuo.

Parâmetros	Valor estimado	Limite inferior	Limite superior
μ_{max}^*	1,79238	1,41234	2,17241
K_1^*	5,99891	1,55502	10,4428
K^*	4,08762	1,07984	7,0954
$Y_{X/S}$	0,0102	0,00486	0,01555
$Y_{X/P}$	0,02074	0,02074	0,02074
K_S^*	-1,35599	-3,86499	1,15301

As regiões de confiança definidas pelo PSO foram construídas e estão apresentadas na Figura 27 e no Apêndice C. Deste modo foi possível comprovar que os parâmetros estimados para o modelo proposto para o reator semicontínuo são estatisticamente significativos, pois o zero não faz parte destas regiões de confiança. O código do modelo proposto implementado no ESTIMA está apresentado no Apêndice D.

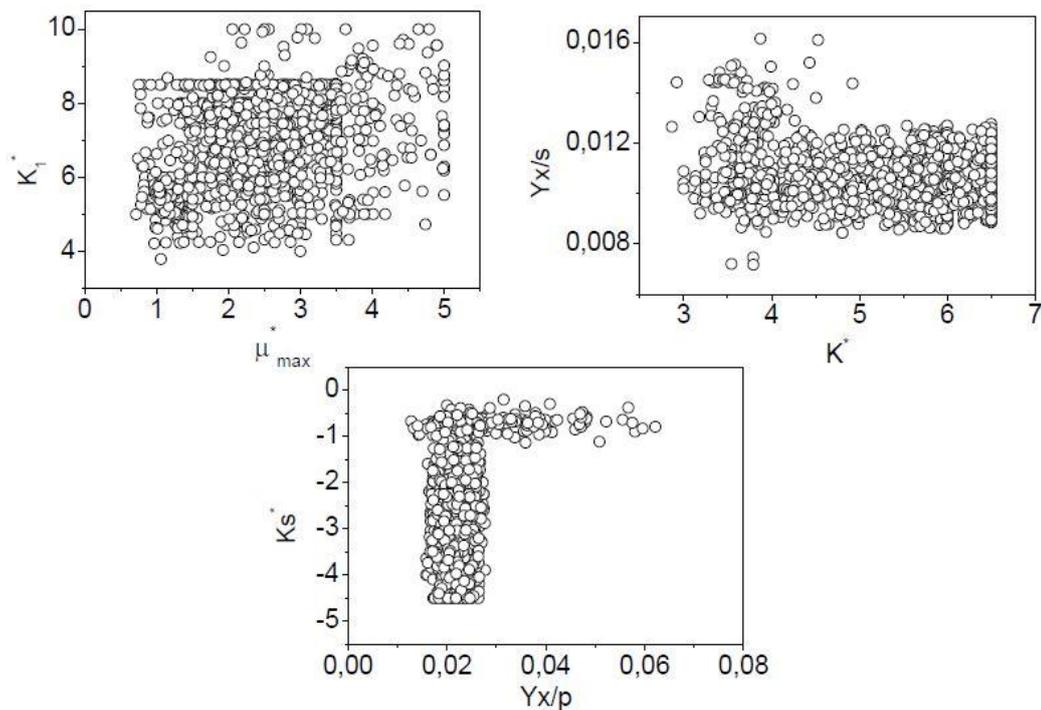


Figura 27 - Região de confiança Reator semicontínuo

A Tabela 10 apresenta os valores dos parâmetros estimados com as suas respectivas unidades.

Tabela 10 - Valores dos parâmetros estimados para o reator semicontínuo e suas respectivas unidades

Parâmetros	Valor estimado
μ_{max}	0,1195 h ⁻¹
K_1	0,3999 h ⁻¹
K	0,2725 h ⁻¹
$Y_{X/S}$	0,0102
$Y_{X/P}$	0,0207
K_S	121,6581 g·L ⁻¹

Nas Figuras 28 a 31 estão apresentados os gráficos comparativos entre os dados experimentais e os dados preditos pelo modelo proposto para o reator semicontínuo

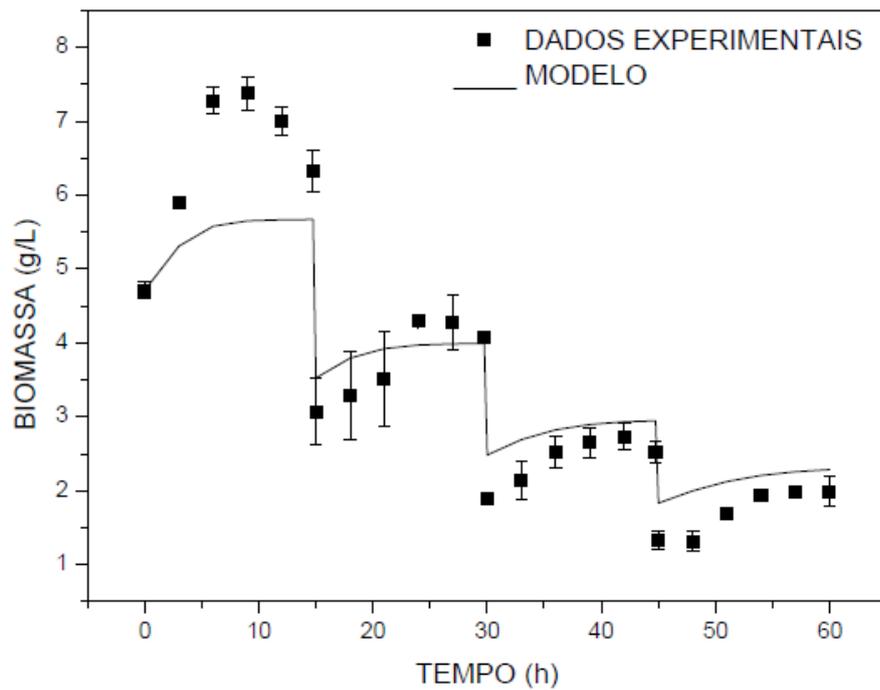


Figura 28 – Reator semicontínuo - Biomassa: valores experimentais x valores preditos pelo modelo

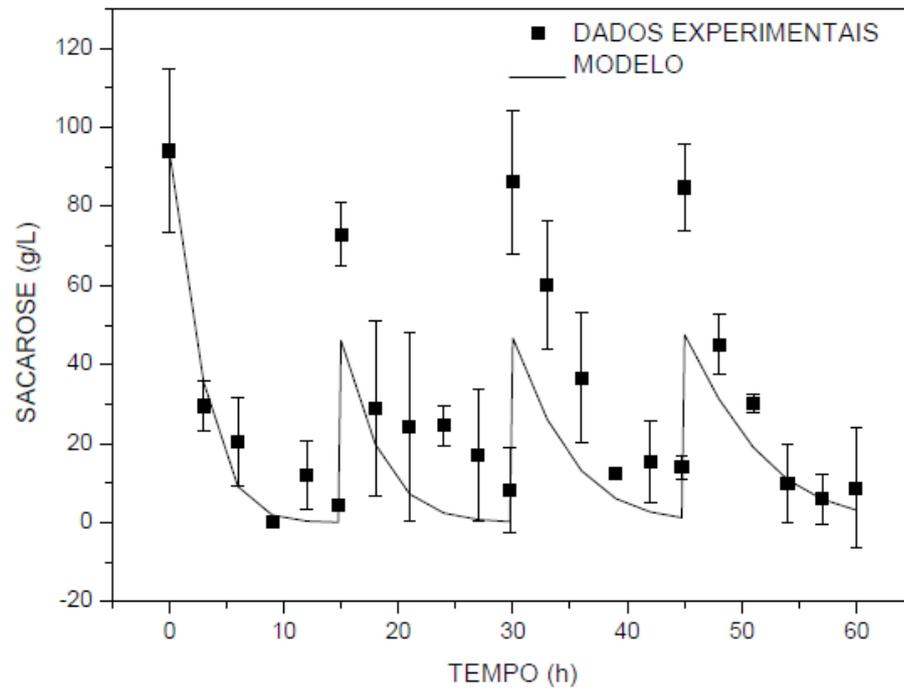


Figura 29 - Reator semicontínuo - Sacarose: valores experimentais x valores preditos pelo modelo

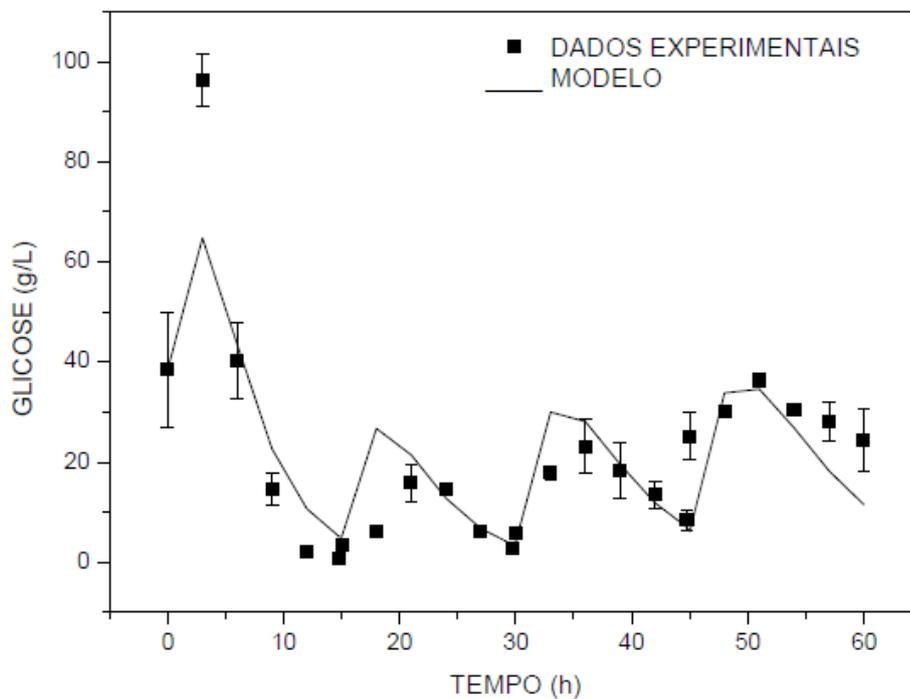


Figura 30 - Reator semicontínuo - Glicose: valores experimentais x valores preditos pelo modelo

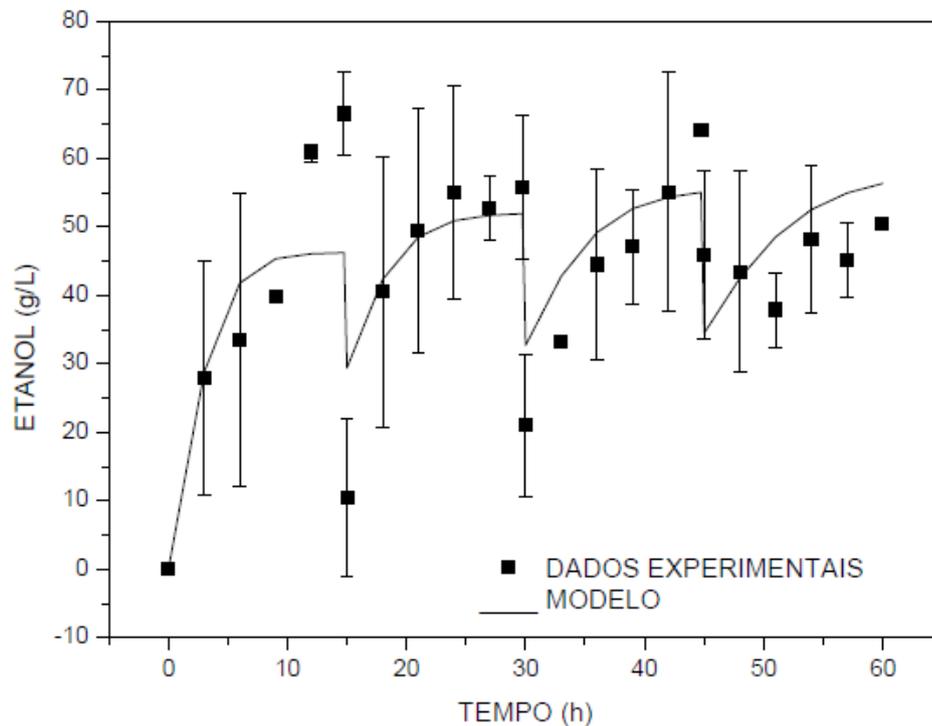


Figura 31 - Reator semicontínuo - Etanol: valores experimentais x valores preditos pelo modelo

. Com base nestes gráficos, é possível notar que o modelo se mostrou capaz de prever os degraus de concentração observados experimentalmente durante os choques de carga. O modelo também representou o perfil apresentado na literatura para o reator batelada, Figura 3. Porém, os dados preditos não se ajustaram bem aos dados experimentais, isto pode ser explicado pelo fato de que durante a estimação dos parâmetros foi definido um único valor de velocidade específica de crescimento celular (μ) para todo o tempo de fermentação e experimentalmente é possível perceber que ele diminui a cada descarga/recarga do reator sob a hipótese já comentada de arraste de células viáveis. Portanto, os dados preditos pelo modelo sugerem que este se aplicaria melhor para um biorreator semicontínuo com reciclo de células, na tentativa de manter a velocidade específica celular constante em cada operação de carga e descarga. Contudo, este processo fermentativo se mostrou viável, pela capacidade de produzir etanol por períodos de tempo maiores que para o reator batelada sem a necessidade de adição de novo inóculo, sendo assim é possível assumir que ele teria viabilidade industrial para a produção de etanol.

5. CONCLUSÃO

De acordo com o supracitado, foi possível concluir que os resultados experimentais obtidos para a fermentação alcoólica nos processos em batelada e semicontínuo foram consistentes com o descrito pela literatura clássica. Na segunda parte deste trabalho, foram propostos e avaliados modelos cinéticos com o intuito de descrever a produção de etanol nos processos em batelada e semicontínuo por meio da levedura *S. cerevisiae*.

No estudo do reator batelada, cinco modelos foram estudados e, com base nos resultados apresentados, o modelo matemático I (MMI), baseado na equação cinética de Monod, foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais. O MMI é composto por seis parâmetros que foram ajustados aos dados experimentais através do programa ESTIMA, que utiliza o algoritmo de enxame de partículas (PSO). Os valores dos parâmetros estimados foram: $\mu_{\text{máx}} = 0,1155 \text{ h}^{-1}$; $K_1 = 0,8984 \text{ h}^{-1}$; $K = 0,4738 \text{ h}^{-1}$; $Y_{X/S} = 0,0242$; $Y_{X/P} = 0,0451$ e $K_S = 24,3852 \text{ g.L}^{-1}$; eles foram estatisticamente significativos e fisicamente realísticos e o valor da função-objetivo encontrada foi igual a 0,5291.

O modelo avaliado para prever o comportamento da fermentação semicontínua foi baseado nos balanços de massa propostos para o biorreator, juntamente com a equação cinética de Monod. Os parâmetros estimados foram fisicamente realísticos e estatisticamente significativos dentro da região de confiança definida pelo PSO e seus valores foram: $\mu_{\text{máx}} = 0,1195 \text{ h}^{-1}$; $K_1 = 0,3999 \text{ h}^{-1}$; $K = 0,2725 \text{ h}^{-1}$; $Y_{X/S} = 0,0102$; $Y_{X/P} = 0,0207$ e $K_S = 121,6581 \text{ g.L}^{-1}$. O valor de função-objetivo obtido para este modelo foi igual a 7,475.

Os resultados apresentados sugerem que o biorreator semicontínuo pode ser utilizado na fermentação alcoólica, podendo operar durante tempos superiores aos relatados para o biorreator batelada operando nas mesmas condições sem que se faça necessário o preparo de um novo inóculo. O resultados também sugeriram a possível ocorrência de arraste de células viáveis durante o processo de descarga e recarga, que poderia ser evitado com o reciclo de células.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHBASHLO, M.; TABATABAEI, M.; KARIMI, K. Exergy-based sustainability assessment of ethanol production via *Mucor indicus* from fructose, glucose, sucrose, and molasses. **Energy**, 98, pp.240–252. DOI: 10.1016/j.energy.2016.01.029, 2016.

ALBERTON, K. P. F.; ALBERTON, A. L.; DI MAGGIO, A. J.; ESTRADA, V. G.; DÍAZ, M. S.; SECCHI, A. R. Simultaneous Parameters Identifiability and Estimation of an *E. coli* Metabolic Network Model. **BioMed Research Internacional**, 2015, pp.1–21. DOI: 10.1155/2015/454765.

AMILLASTRE, E.; ACEVES-LARA, C. A.; URIBELARREA, J. L.; ALFENORE, S.; GUILLOUET, S. E. Dynamic model of temperature impact on cell viability and major product formation during fed-batch and continuous ethanolic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology** 117:242–250. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.04.013, 2012.

ANFAVEA (Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores). **Anuário da Indústria Automobilística Brasileira**, pp.1–154. 2016.

BAEYENS, J.; KANG, Q.; APPELS, L.; DEWIL, R.; LV, Y.; TAN, T. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. **Progress in Energy and Combustion Science**, 47, pp.60–88. 2015. DOI: 10.1016/j.peccs.2014.10.003.

BAI, F. W., ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, 26(1), pp.89–105. 2008. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.09.002.

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, 86(11), pp.2273–2282. 2009. DOI: 10.1016/j.apenergy.2009.03.015.

BARROS, V. P. Escalas e simplificações - exemplos em sistemas físicos e biológicos. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, pp.1–10. 2010.

BENJAPHOKEE, S.; HASEGAWA, D.; YOKOTA, D.; ASVARAK, T.; AUESUKAREE, C.; SUGIYAMA, M.; KANEKO, Y.; BOONCHIRD, C.; HARASHIMA, S. Highly efficient bioethanol production by a *Saccharomyces cerevisiae* strain with multiple stress tolerance to high temperature, acid and ethanol. **New Biotechnology**, 29(3), pp.379–386. 2012. DOI: 10.1016/j.nbt.2011.07.002.

BIROL, G.; DORUKER, P.; KIRDAR, B.; ÖNSAN, Z. I.; ÜLGEN, K. Mathematical description of ethanol fermentation by immobilised *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, 33(7), pp.763–771. 1998. DOI: 10.1016/S0032-9592(98)00047-8.

BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. Modelagem Matemática e Simulação de Processo Fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.

Biotecnologia Industrial: Engenharia bioquímica, cap. 7, p. 123-178. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

BORGES, P. C. S. **Otimização Dinâmica da Fermentação Alcoólica no Processo em Batelada Alimentada**. 2008. 162 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brasil, 2008.

BORZANI, W. Fermentação Semicontínua. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia bioquímica**, cap. 11, p. 219-222. São Paulo: Edgard Blücher, 2001

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontínua. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia bioquímica**, cap. 9, p. 193-204. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

CHEN, L.; NGUANG, S. K.; CHEN, X. D.; LI, X. M. Modelling and optimization of fed-batch fermentation processes using dynamic neural networks and genetic algorithms. **Biochemical Engineering Journal**. 22: 51-61, 2004.

CHOU, I.C.; VOIT, E.O. Recent developments in parameter estimation and structure identification of biochemical and genomic systems. **Mathematical Biosciences**, 219(2), pp.57–83. 2009. DOI: 10.1016/j.mbs.2009.03.002.

CONVERTI, A.; ARNI, S.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M.; AQUARONE, E. Simplified modeling of fed-batch alcoholic fermentation of sugarcane blackstrap molasses. **Biotechnology and Bioengineering**, 84(1), pp.88–95. 2003. DOI: 10.1002/bit.10750.

DA ROS, S.; COLUSSO, G.; WESCHENFELDER, T. A.; TERRA, L. M.; CASTILHOS, F.; CORAZZA, M. L.; SCHWAAB, M. A comparison among stochastic optimization algorithms for parameter estimation of biochemical kinetic models. **Applied Soft Computing Journal**, 13(5), pp.2205–2214. 2013. DOI: 10.1016/j.asoc.2013.01.019.

DIAS, M. O. S.; MACIEL, R.; MANTELATTO, P. E.; CAVALETT, O.; ROSSELL, C. E. V.; BONOMI, A.; LEAL, M. R. L. V. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, 15, pp.35–51. 2015. DOI: 10.1016/j.envdev.2015.03.004.

DODIĆ, J. M.; VUČUROVIĆ, D. G.; DODIĆ, S. N.; GRAHOVAC, J. A.; POPOV, S. D.; NEDELJKOVIC, N. M. Kinetic modelling of batch ethanol production from sugar beet raw juice. **Applied Energy** 99:192–197. doi: 10.1016/j.apenergy.2012.05.016, 2012.

EBERHART, R.; KENNEDY, J. A new optimizer using particle swarm theory. MHS'95 Proc Sixth Int Symp **Micro Machine and Human Science** 39–43. doi: 10.1109/MHS.1995.494215, 1995.

ENZWEILER, H.; VISIOLI, L. J.; MELLO, J. M. M.; SOUZA, S. M. A. G. U.; SOUZA, A. A. U.; SILVA, A.; TRIGUEROS, D. E. G.; SCHWAAB, M. Statistical Evaluation of Biochemical Kinetic Models for BTX Degradation. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 53, pp. 19416-19425. 2014. DOI: 10.1021/ie503408g.

EPE (Empresa de Pesquisa Energética). **Outlook for alternative renewable energy in Brazil**, pp.1–28. 2010.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação Contínua. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia bioquímica**, cap. 12, p. 223-246. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

FAN, S.; CHEN, S.; TANG, X.; XIAO, Z.; DENG, Q.; YAO, P.; SUN, Z.; ZHANG, Y.; CHEN, C. Kinetic model of continuous ethanol fermentation in closed-circulating process with pervaporation membrane bioreactor by *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource technology**, 177, pp.169–75. 2015. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.11.076.

FOGLER, H. S. **Elementos de Engenharia das Reações Químicas**. 4ª ed. Rio da Janeiro: LTC, 2009.

GHOSE T. K.; TYAGI, R. D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. *Biotechnology and Bioengineering*, 21, pp. 1401-1420. DOI: 10.1002/bit.260210808, 1979.

GONÇALVES, C.; RODRIGUEZ-JASSO, R. M.; GOMES, N.; TEXEIRA, J. A.; BELO, I. Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. **Analytical Methods** 2:2046. doi: 10.1039/c0ay00525h, 2010.

GREENENERGY INTERNACIONAL LIMITED. **Bioethanol: Greenergy Perspective**. Available at: www.greenergy.com. 2010.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia bioquímica**, cap. 6, p. 93-122. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**, 1ª Edição Digital, 2008.

JIMÉNEZ-ISLAS, D.; PAÉZ-LERMA, J.; SOTO-CRUZ, N. O.; GRACIDA, J. et al., Modelling of Ethanol Production from Red Beet Juice by *Saccharomyces cerevisiae* under Thermal and Acid Stress Conditions. **Food Technol. Biotechnol.**, 52(1), pp.93–100. 2014. ISSN: 1330-9862.

JIN, H., LIU, R.; HE, Y. Kinetics of Batch Fermentations for Ethanol Production with Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Growing on Sweet Sorghum Stalk Juice. **Procedia Environmental Sciences**, 12, pp.137–145. 2012. DOI: 10.1016/j.proenv.2012.01.258.

KENNEDY, J.; EBERHART, R. Particle Swarm Optimization. In Proceedings of the **IEEE International Conference on Neural Networks**. Perth, pp. 1942–1948. 1995. DOI: 0-7803-2768-3/95.

KRYLOVA, A. Y.; KOZYUKOV, E. A.; LAPIDUS, A. L. 2008. Ethanol and Diesel Fuel from Plant Raw Materials: A Review. **Solid Fuel Chemistry**, 42(6), pp.358–364. DOI: 10.3103/S0361521908060062.

LEWANDOWSKA, M.; SZYMANSKA, K.; KORDALA, N.; DABROWSKA, A.; BEDNARSKI, W.; JUSZCZUK, A. Evaluation of *Mucor indicus* and *Saccharomyces cerevisiae* capability to ferment hydrolysates of rape straw and *Miscanthus giganteus* as affected by the pretreatment method. **Bioresource Technology**, 212, pp.262–270. 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.04.063.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. (Org.). **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**, cap. 1, p. 1-40. São Paulo: Blücher, 2001.

LIN, Y.; ZHANG, W.; LI, C.; SAKAKIBARA, K.; TANAKA, S.; KONG, H. 2012. Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. **Biomass and Bioenergy**, 47, pp.395–401. 2012. DOI: 10.1016/j.biombioe.2012.09.019.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass residues: current state and prospects. **Appl. Microbial Biotechnol.**, 69, pp.627–642. 2006. DOI: 10.1007/s00253-005-0229-x.

MACAULEY-PATRICK, S.; FINN, B. Modes os Fermenter Operations. In: McNEIL, B.; HARBEY, L. M. *Practical Thecnology Fermentation*, cáp. 4, p. 69-96. England: Wiley, 2008.

MAGRÍ A. D.; MAGRÍ, A. L. Spectrophotometric micro-method for the determination of ethanol in commercial beverages. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, 357, pp.985–988. 1997.

MENDES, Á. J. B.; VALDMAN, B.; SOUZA, M. B. J. **Uma revisão de modelagem matemática em bioprocessos**. Parte I : fundamentos básicos e classificação. pp.40–59. 2011.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent ofor Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, pp.426–428. 1959.

MONOD, J. The growth of bacterial cultures. **Ann. Rev. Microbiol.**, 3, 371-93. 1979.

MOSER, A. Kinetics of Batch Fermentation. In: Rehm HJ, Reed G (eds) **Biotechnology**. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Wein- heim, pp 243–283. 1985

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R.; SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M; ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A.2010. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, 28(6), pp.817–830. 2010. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.07.001.

NAIDOO, K. **COP21: Shows the end of fossil fuels is near, we must speed its coming**. 2015. Disponível em: <http://www.greenpeace.org/>.

OMORI, W. P.; PIRES, RENATA T.; OGASSAVARA, F. O.; FRIGIERI, M. C. Emprego de cepas de *Zymomonas mobilis* em processos fermentativos. **Ciência e Tecnologia: FATEC-JB**, 3(1), pp.28–49. 2011. ISSN: 2178-9436.

PETZOLD, L.R. **A description of DASSL: a differential/algebraic system solver.** , p.4. 1982.

PHISALAPHONG, M.; SRIRATTANA, N.; TANTHAPANICHAKOON, W. Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, 28(1), pp.36–43. 2006. DOI: 10.1016/j.bej.2005.08.039.

REN21. **Renewables 2013: Global Futures Report.** , p.76. 2013. Disponível em: <http://www.ren21.net/>.

REN21. **Renewables 2014: Global Status Report.** p.216. 2014. Disponível em: <http://www.ren21.net/>.

REN21. **Renewables 2016: Global Status Report.** , p.272. 2016. Disponível em: <http://www.ren21.net/>.

RIVERA, E.C.; COSTA, A. C.; ATALA, D. I. P.; MAUGERI, F.; MACIEL, M. R. W.; MACIEL, R. F. Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: Application to ethanol fermentation considering the effect of temperature. **Process Biochemistry**, 41(7), pp.1682–1687. 2006. DOI: 10.1016/j.procbio.2006.02.009.

ROSILLO-CALLE, F.; WALTER, A. Global market for bioethanol: historical trends and future prospects. **Energy for Sustainable Development**, pp.20–32. 2006.

SANSONETTI, S.; HOBLEY, T. J.; CALABRÒ, V.; VILLADSEN, J.; SIN, G. A biochemically structured model for ethanol fermentation by *Kluyveromyces marxianus*: A batch fermentation and kinetic study. **Bioresource Technology**, 102, pp.7513–7520. 2011. DOI: oi:10.1016/j.biortech.2011.05.014.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatore e Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia bioquímica**, cap. 8, p. 179-192. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

SCHWAAB, M. **Avaliação de algoritmos heurísticos de otimização em problemas de estimação de parâmetros**, 2005. 149 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ, Brasil, 2005.

SCHWAAB, M.; PINTO, J. C. **Análise de Dados Experimentais - Volume I: Fundamentos de Estatística e Estimação de Parâmetros.** Rio de Janeiro: E-papers, 2007. 461 p.

SCHWAAB, M.; BISCAIA, E. C.; MONTEIRO, J. L.; PINTO, J. C. Nonlinear parameter estimation through particle swarm optimization. **Chemical Engineering Science**, 63, pp.1542–1552. 2008. DOI: 10.1016/j.ces.2007.11.024.

SCOVRONICK, N.; F., D.; ALONSO, M.; ALMEIDA, C.; LONGO, K.; FREITAS, S.; RUDORFF, B.; WILKINSON, P. Air Quality and Health Impacts of Future Ethanol Production and Use in São Paulo State. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. Brazil, pp.1–13. 2016. DOI: 10.3390/ijerph13070695.

SCOVRONICK, N.; WILKINSON, P. Health impacts of liquid biofuel production and use : A review. **Global Environmental Change**, 24, pp.155–164. 2014. DOI: x.doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2013.09.011.

STANISZEWSKI, M.; KUJAWSKI, W.; LEWANDOWSKA, M. Semi-continuous ethanol production in bioreactor from whey with co-immobilized enzyme and yeast cells followed by pervaporative recovery of product - Kinetic model predictions considering glucose repression. **Journal of Food Engineering**, 91(2), pp.240–249. 2009. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2008.08.026.

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas**, 2001. 215 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, Brasil, 2001.

RODRIGUES, D. C. G. A.; SANTOS, T. T. **Manual de Práticas de Processo Bioquímicos**. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2011.

TEISSIER, G. Les lois quantitatives de la croissance. Ann. **Physiol-Chim. Biol.**, 12,527-73. 1936.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO G. A. S.; ARAGÃO, F. A. S. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 88:1–22. ISSN 1679:6543, 2013.

VOLESKY, B.; VOTRUBA, J. **Modeling and Optimization of Fermentation Processes**. Amsterdã, Holanda, 1992. 266 p.

ANEXO A

Esquema do algoritmo do enxame de partículas

1. Inicialização da busca de parâmetros:

N_{iter} : número de iterações;

N_{pt} : número de partículas;

N_d : número de dimensões procuradas;

a_{min} e a_{max} : vetores de tamanho N_d contendo os limites de busca;

c_1 , c_2 , w_0 , w_f : parâmetros de busca do PSO;

set $k = 0$ (contador das iterações).

2. Cálculo da máxima velocidade de partículas ao longo de cada direção d :

$$v_d^{max} = (a_d^{max} - a_d^{min})/2.$$

3. Cálculo das posições e velocidades da partícula inicial:

$$a_{i,d}^k = a_d^{max} + r(a_d^{max} - a_d^{min})$$

$$v_{i,d}^k = v_d^{max}(2r - 1)$$

4. Avaliação da função-objetivo para cada partícula.
5. Registro das posições das partículas e das funções objetivos em um arquivo para a construção da região de confiança.
6. Atualização de p_{global} , um vetor com dimensão N_d que contém a melhor posição encontrada por todo o enxame de partículas.
7. Quando o número máximo de iterações for atingido ($k = N_{iter}$), a busca é encerrada.
8. Atualização de p_i , vetor N_{pt} com dimensão N_d que contém a melhor posição encontrada por cada partícula do enxame.
9. Cálculo do valor do peso de inércia:

$$w = w_0 + (w_f - w_0) \frac{k}{N_{iter}}$$

10. Atualização das velocidades das partículas para $i = 1 \dots N_{pt}$; $d = 1 \dots N_d$:

$$v_{i,d}^{k+1} = w \cdot v_{i,d}^k + c_1 \cdot r_1 \cdot (p_{i,d}^k - a_{i,d}^k) + c_2 \cdot r_2 \cdot (p_{global,d}^k - a_{i,d}^k)$$

11. Se a velocidade absoluta da partícula for superior que o máximo valor permitido:

$$v_{i,d}^{k+1} = v_d^{max} \text{sign}(v_{i,d}^{k+1})$$

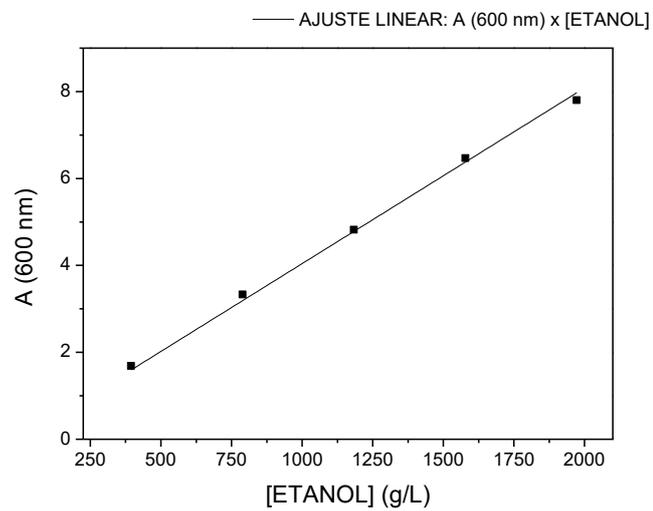
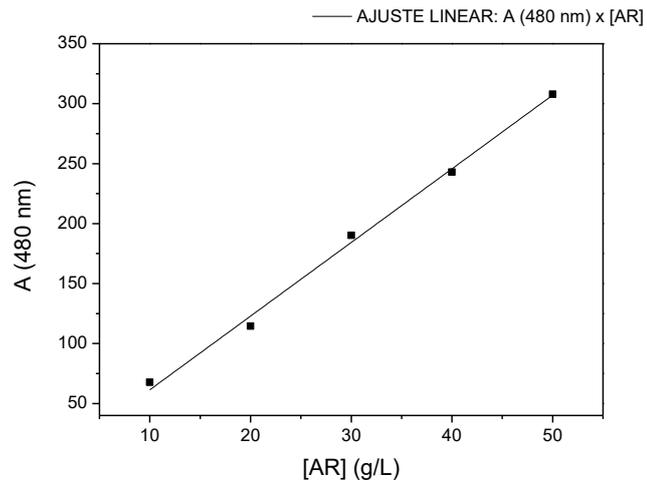
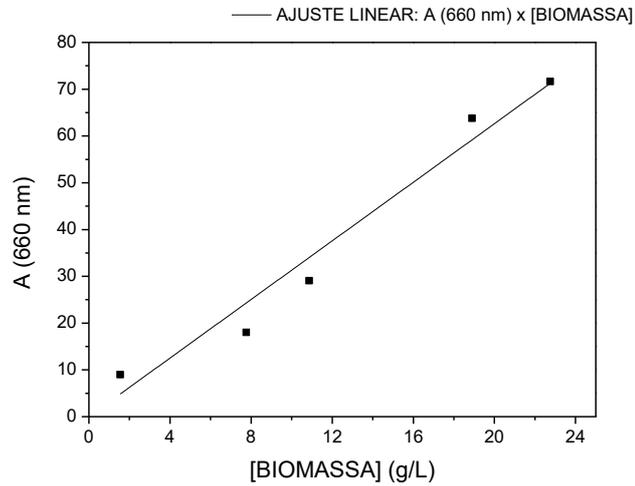
12. Atualização da posição da partícula:

$$a_{i,d}^{k+1} = a_{i,d}^k + v_{i,d}^{k+1}$$

13. Se a posição da partícula não estiver dentro dos limites de busca, a partícula é colocada no limite de busca violado.
14. Adição de uma iteração ao contador ($k = k + 1$) e retorna ao passo 4.

APÊNDICE A

Ajustes lineares das curvas-padrão das concentrações de biomassa, açúcares redutores e etanol



APÊNDICE B

Limites de confiança definidos pelo algoritmo enxame de partículas

MMI						
Parâmetro	Valor estimado	Limite inferior do modelo linearizado	Limite superior do modelo linearizado	Desvio-padrão	Limite inferior do enxame	Limite superior do enxame
μ_{max}^*	1,73181	-13,4533	16,9169	7,22783	1,73181	19,1915
K_1^*	13,4756	-43,0195	69,9707	26,8906	13,4756	116,967
K^*	7,10664	-25,7917	40,005	15,659	7,10664	50,0
$Y_{X/S}$	0,0242	0,00514	0,04326	0,00907	0,02387	0,02655
$Y_{X/P}$	0,04509	-0,02348	0,11365	0,03264	0,03986	0,05022
K_S^*	-0,27168	-7,81868	7,27532	3,59223	-10,0	-0,27168
MMII						
Parâmetro	Valor estimado	Limite inferior	Limite superior	Desvio-padrão	Limite inferior do enxame	Limite superior do enxame
μ_{max}^*	5,1164	-4,06185	14,2946	4,38516	4,28255	6,24897
K_1^*	37,5556	-653,156	728,267	330,007	37,5556	107,211
K^*	20,5343	-326,089	367,158	165,609	20,5343	50,0
$Y_{X/S}$	0,02795	0,01768	0,03822	0,00491	0,02672	0,02924
$Y_{X/P}$	0,04872	-0,01854	0,11597	0,03213	0,04066	0,0598
MMIII						
Parâmetro	Valor estimado	Limite inferior	Limite superior	Desvio-padrão	Limite inferior do enxame	Limite superior do enxame
μ_{max}^*	6,02782	-9,88614	21,9418	7,57475	6,02782	7,86665
K_1^*	50,3487	-3105,17	3205,87	1501,97	50,3487	70,1278
K^*	27,2114	-1497,92	1552,34	725,933	27,2114	350895
$Y_{X/S}$	0,03235	-0,02016	0,08485	0,02499	0,03235	0,0408458
$Y_{X/P}$	0,05591	-0,05607	0,16788	0,0533	0,05514	0,0721121
K_d^*	0,09018	-0,8504	1,03076	0,4477	0,09018	0,258823

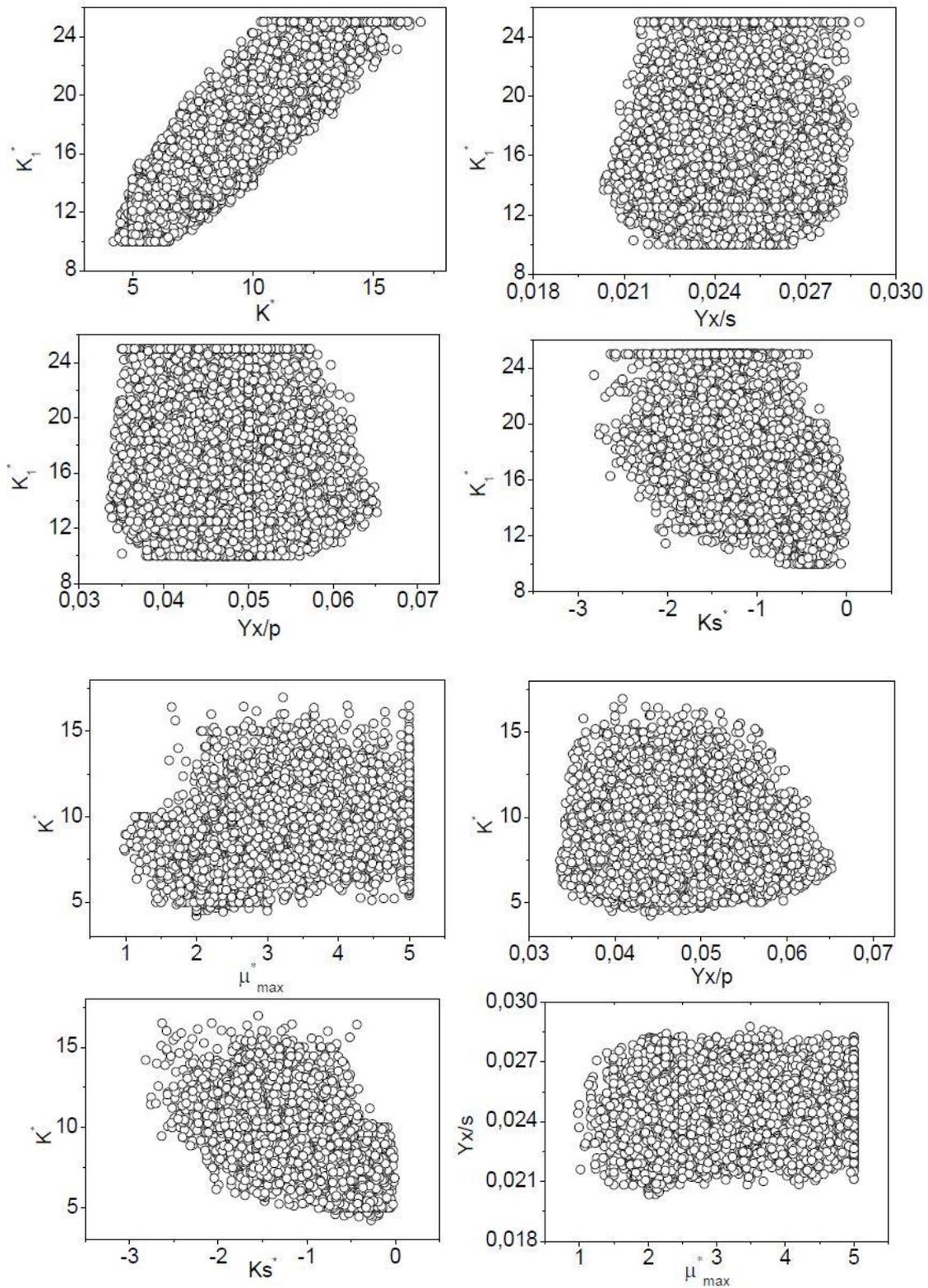
Limites de confiança definidos pelo enxame de partículas (continuação)

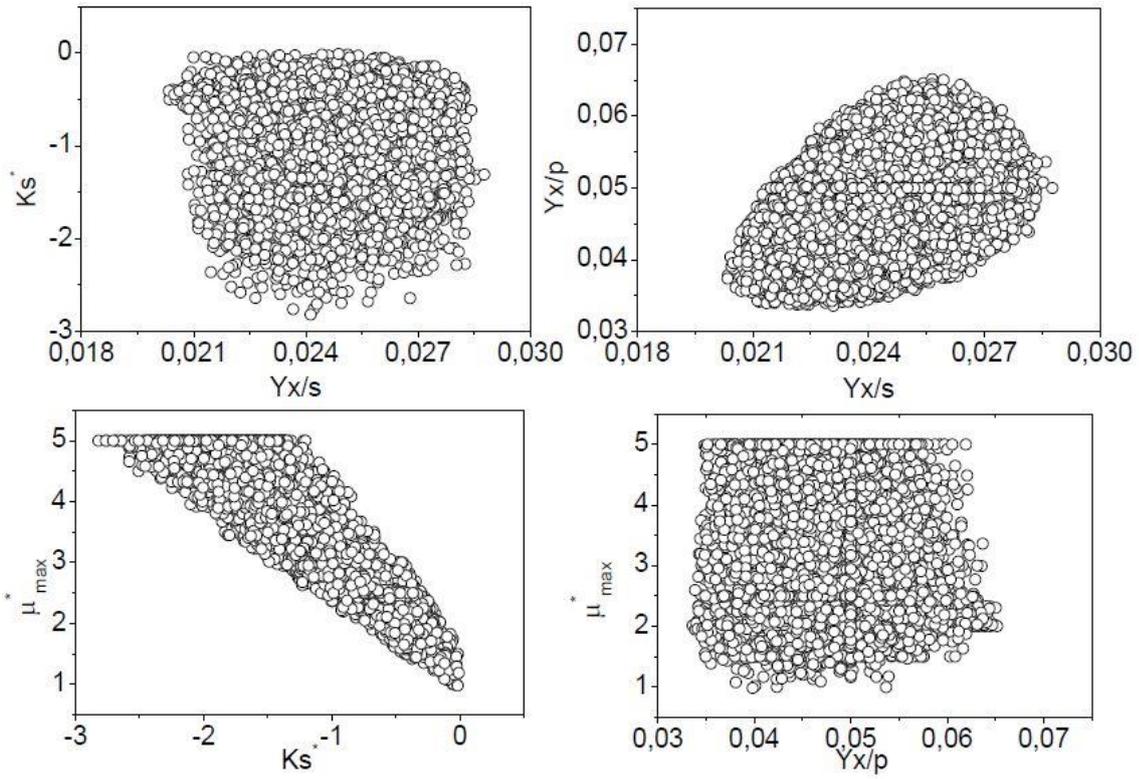
MMIV						
Parâmetro	Valor estimado	Limite inferior do modelo linearizado	Limite superior do modelo linearizado	Desvio-padrão	Limite inferior do enxame	Limite superior do enxame
μ_{max}^*	1,74245	-1,46229	4,9472	1,53116	1,42157	2,13591
K_1^*	34,2418	-474,272	542,755	242,956	29,9481	50,0
K^*	18,5583	-240,627	277,743	123,833	16,1813	26,4858
$Y_{X/S}$	0,02523	0,00377	0,04669	0,01025	0,0232	0,02757
$Y_{X/P}$	0,03607	0,00525	0,06689	0,01472	0,03246	0,03933
MMV						
Parâmetro	Valor estimado	Limite inferior	Limite Superior	Desvio-padrão	Limite inferior enxame	Limite superior enxame
μ_{max}^*	27,9539	-2,27.10⁶	2,27.10⁶	1,0774·10 ⁶	27,9539	80,0
K_1^*	25,8375	-410,382	462,057	206,757	19,57	50,0
K^*	13,2141	-162,655	189,083	83,3576	9,68329	30,0
$Y_{X/S}$	0,02505	0,00391	0,0462	0,01002	0,02345	0,0274637
$Y_{X/P}$	0,04448	-0,02245	0,11141	0,03172	0,03762	0,0526994
K_{SX}^*	-13,6881	-1,20E.10⁶	1,20.10⁶	568196	-80,706	-13,6881
K_{PX}^*	0,06632	-7434,16	7434,29	3523,64	-2,07312	0,477014
REATOR SEMICONTÍNUO						
Parâmetro	Valor estimado	Limite inferior	Limite Superior	Desvio-padrão	Limite inferior enxame	Limite superior enxame
μ_{max}^*	1,79238	1,41234	2,17241	0,19129	1,74973	2,55575
K_1^*	5,99891	1,55502	10,4428	2,23685	5,03631	6,0
K^*	4,08762	1,07984	7,0954	1,51398	3,71406	5,07707
$Y_{X/S}$	0,0102	0,00486	0,01555	0,00269	0,00944	0,01194
$Y_{X/P}$	0,02074	0,02074	0,02074	2,40628·10 ⁻⁷	0,01845	0,02577
K_S^*	-1,35599	-3,86499	1,15301	1,26291	-2,0	-1,35599

APÊNDICE C

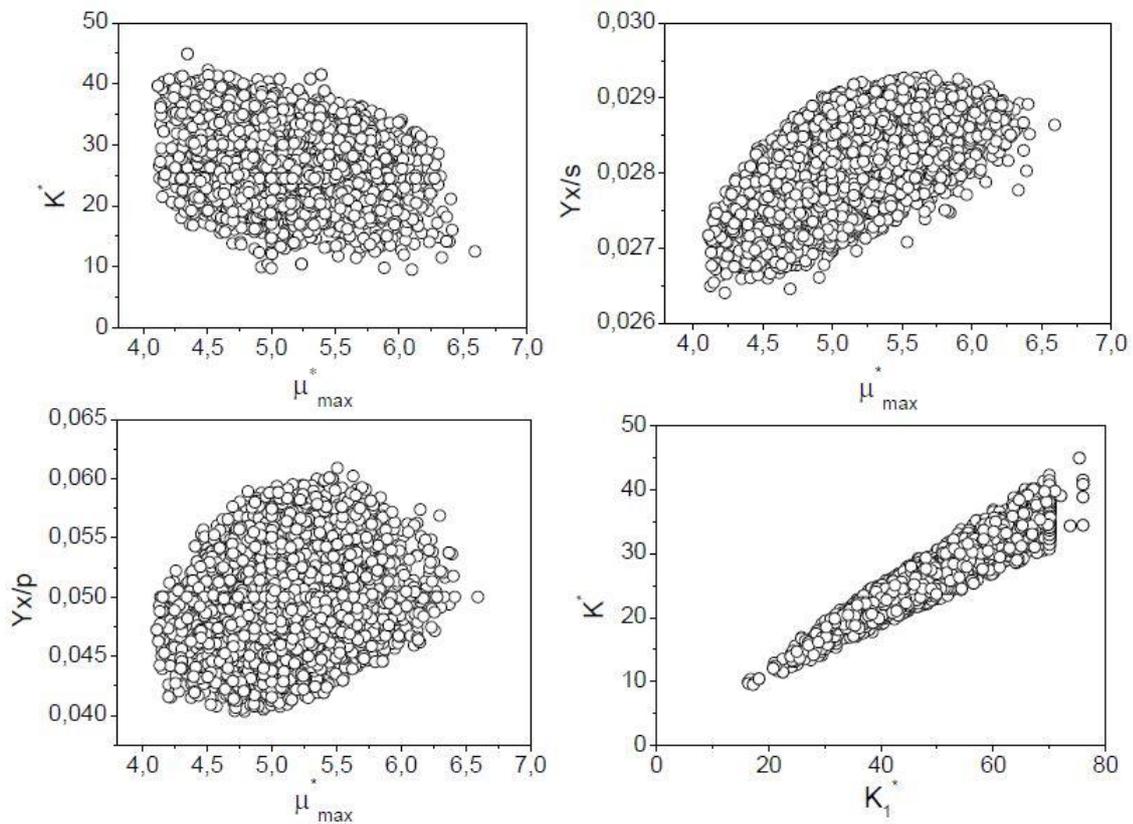
Regiões de Confiança

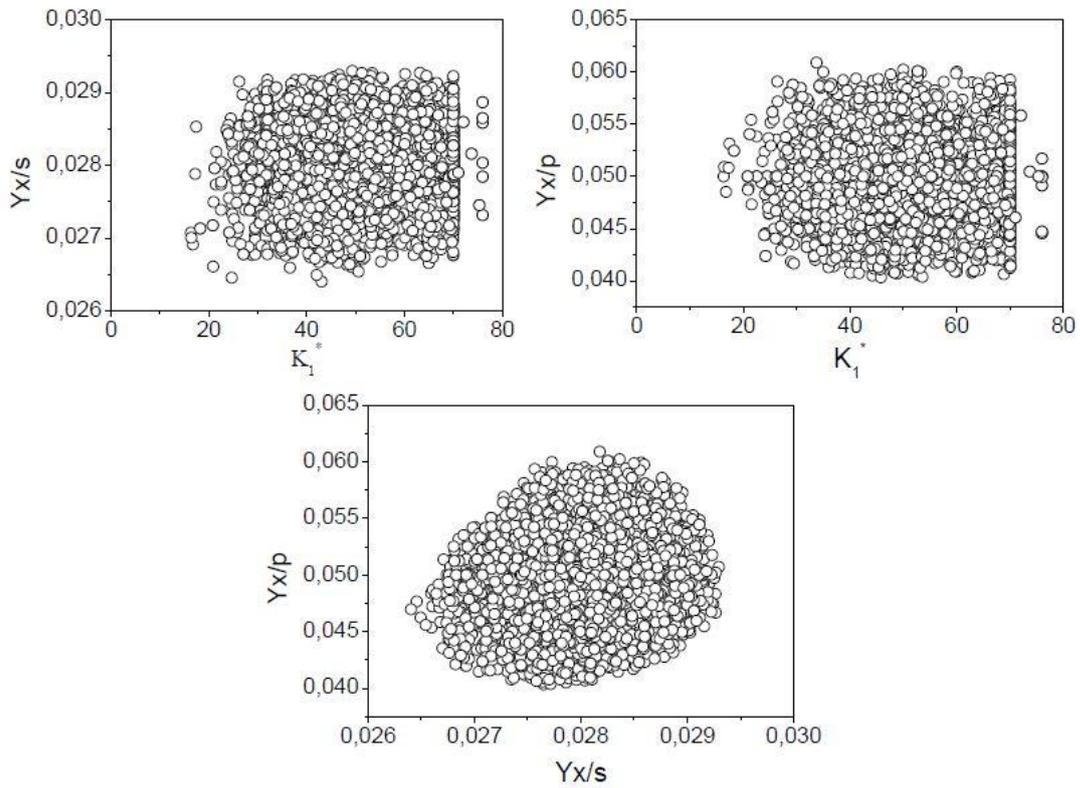
MMI



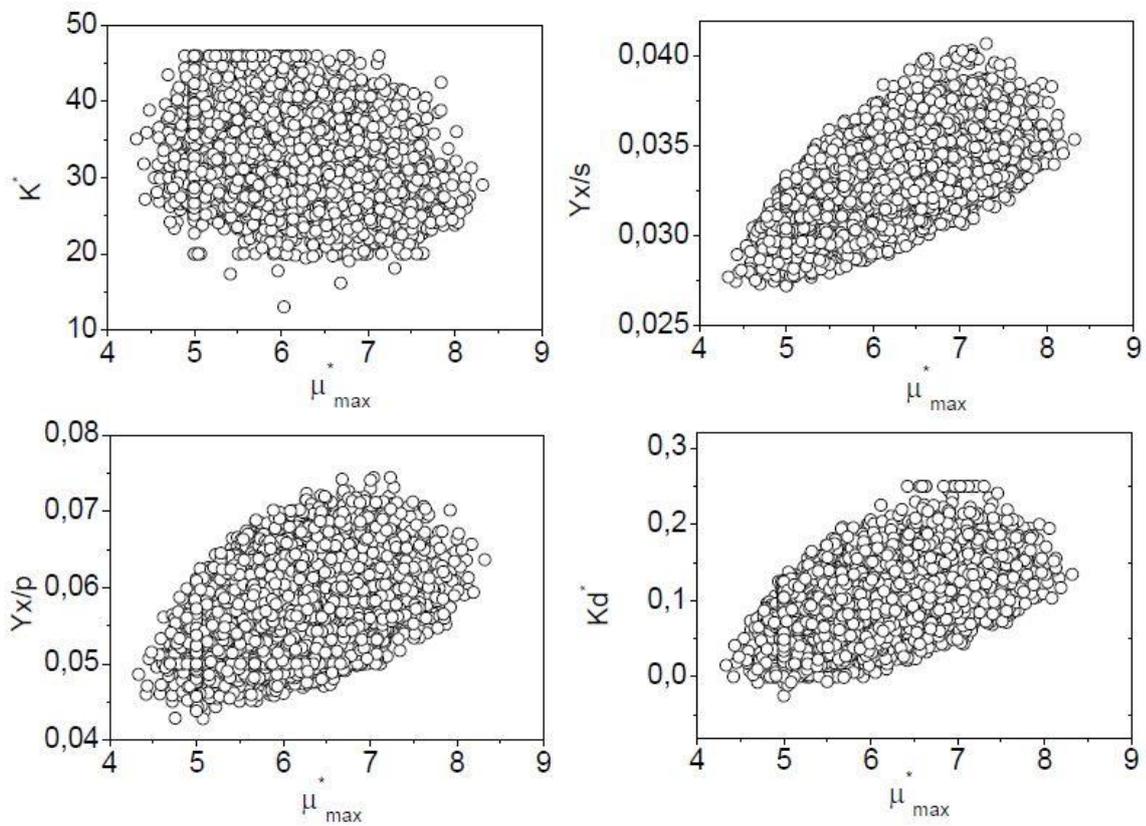


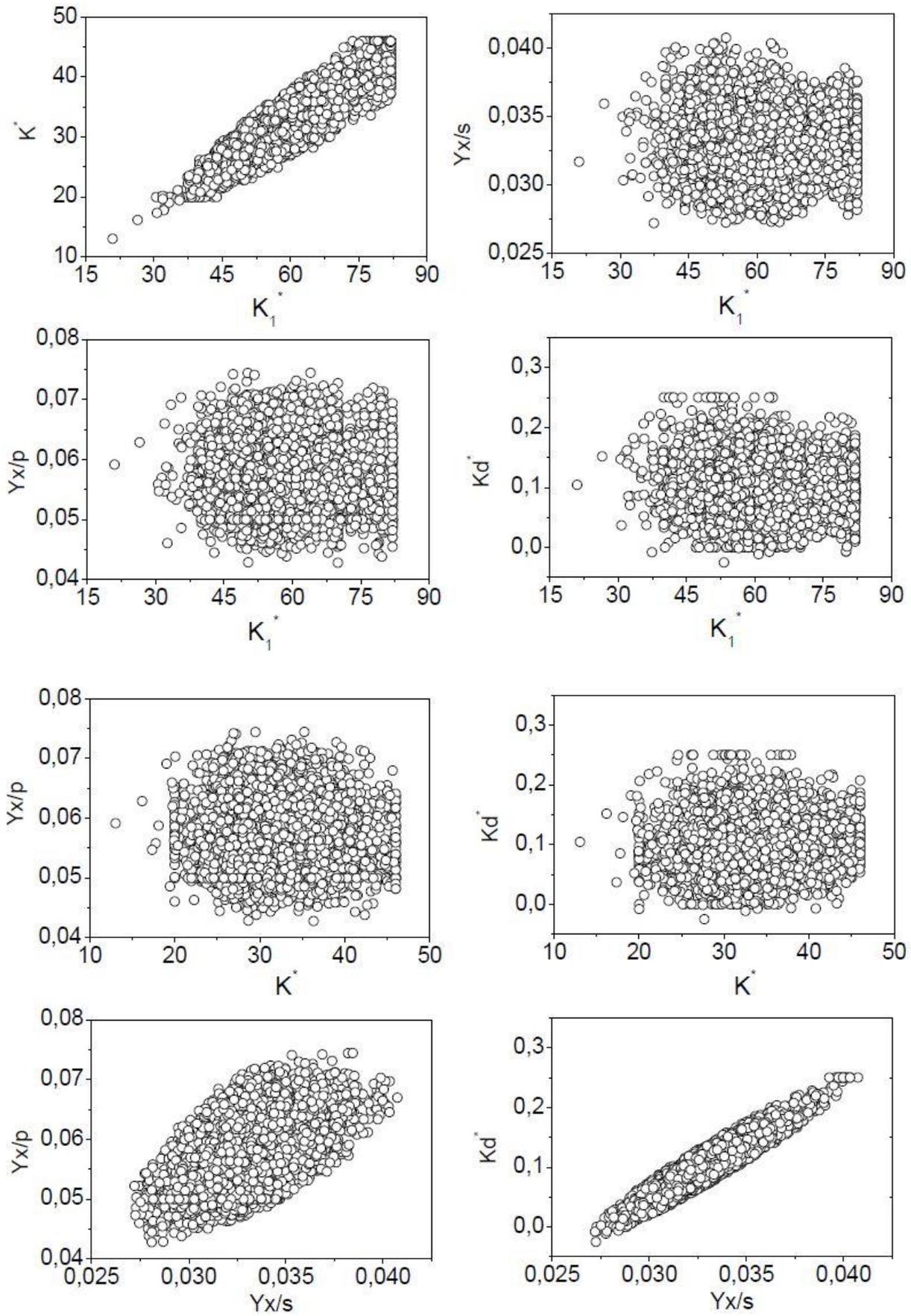
MMII



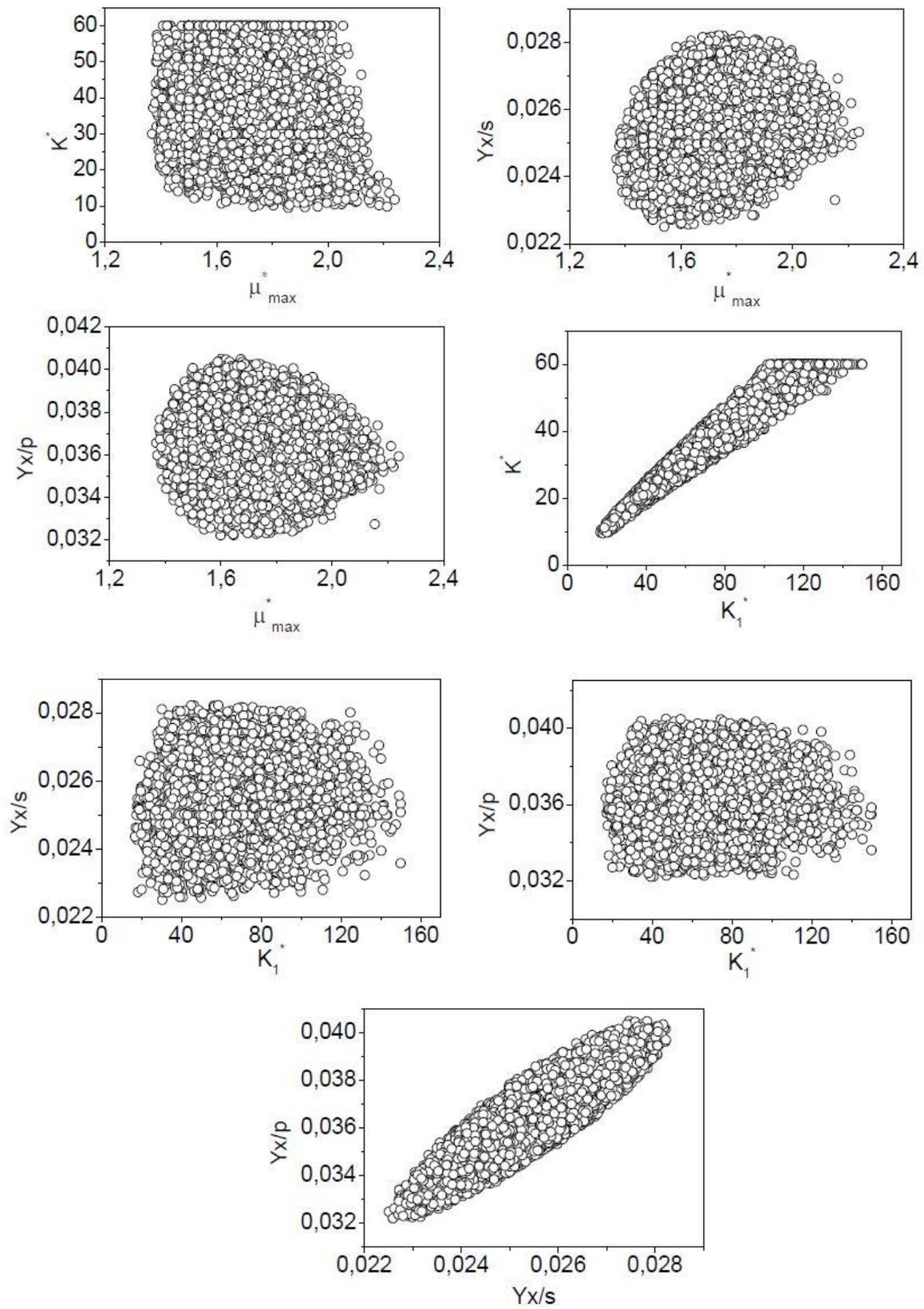


MMIII

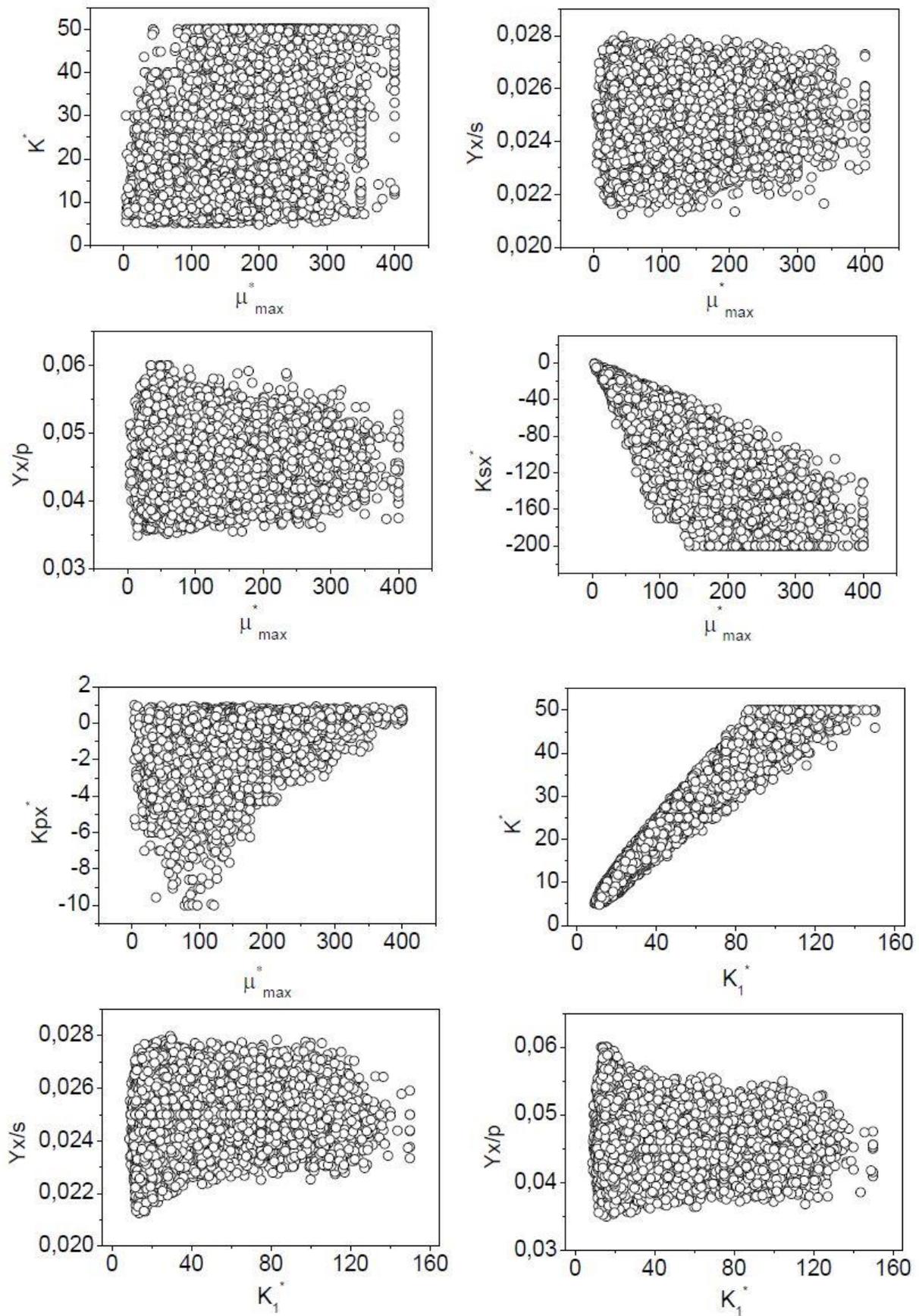


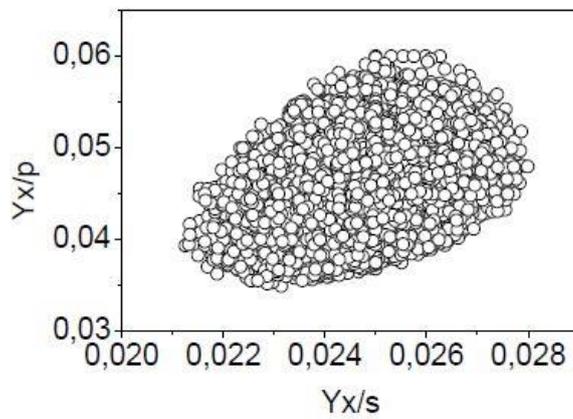
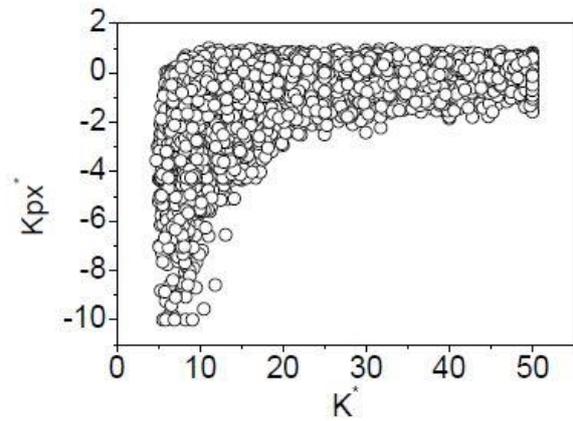
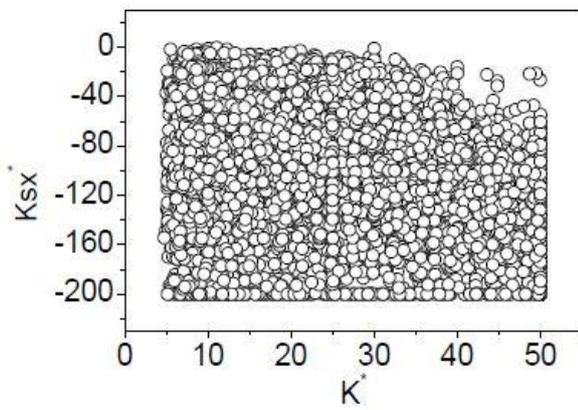
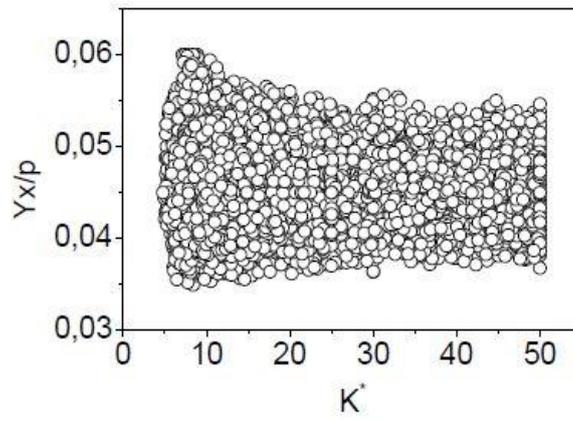
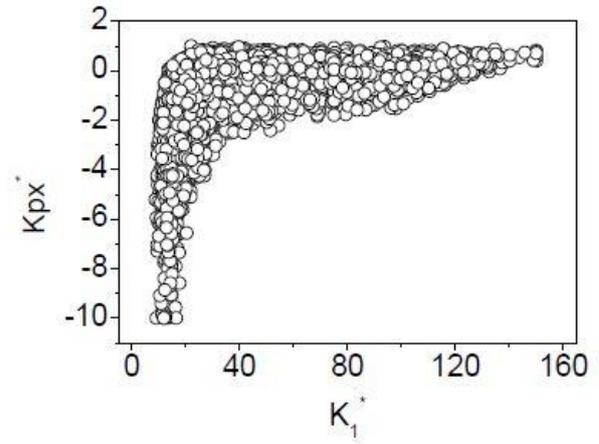
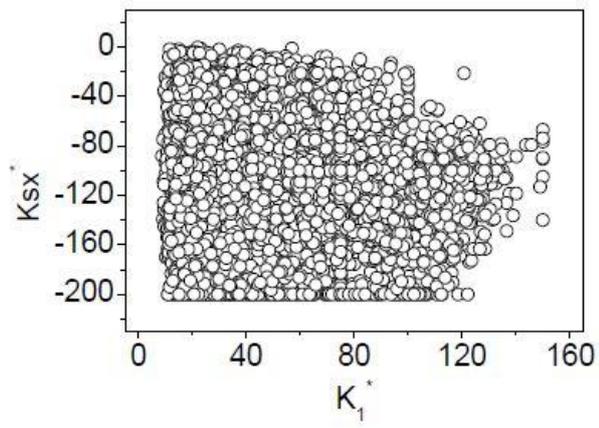


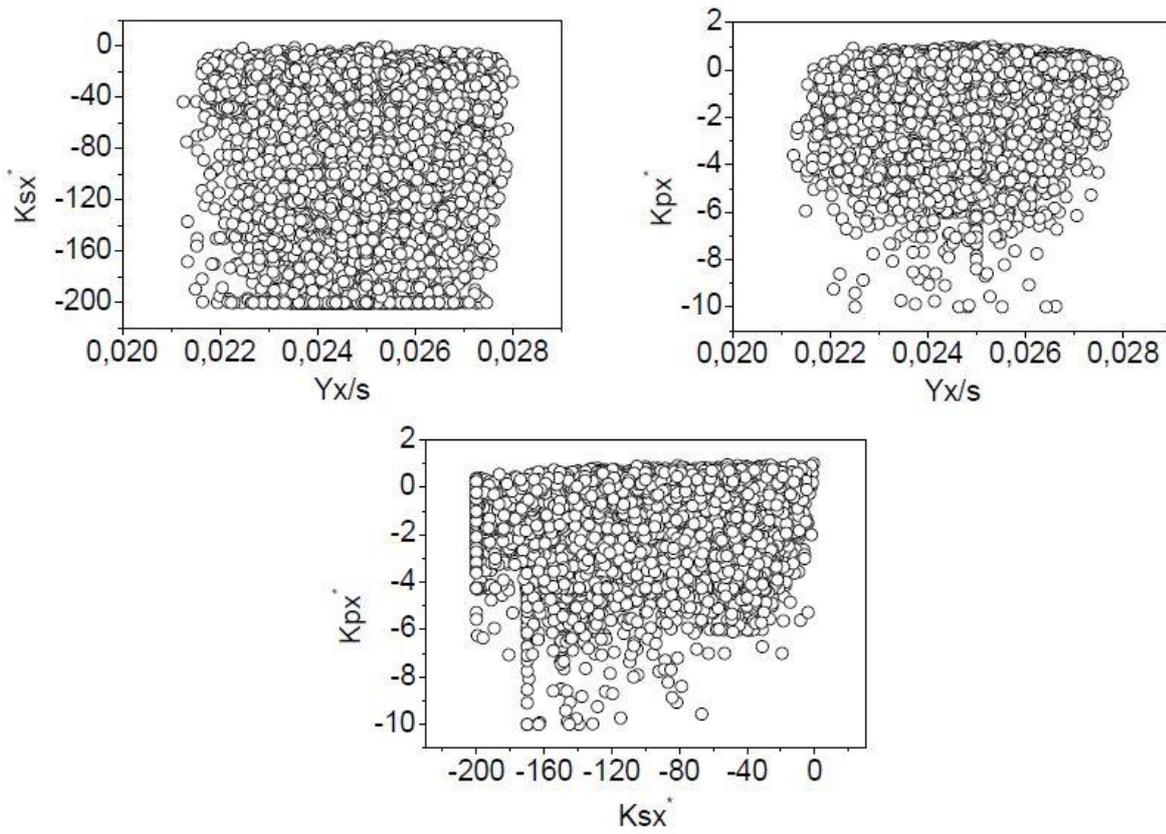
MMIV



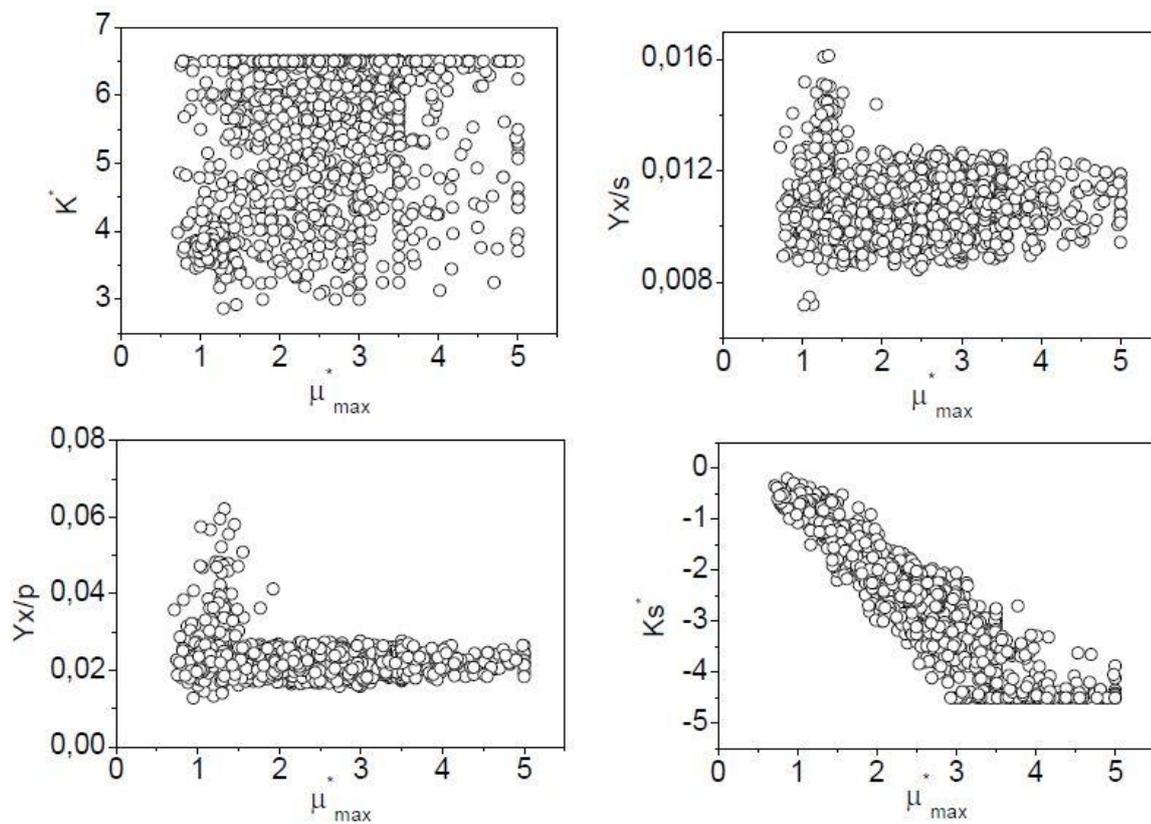
MMV

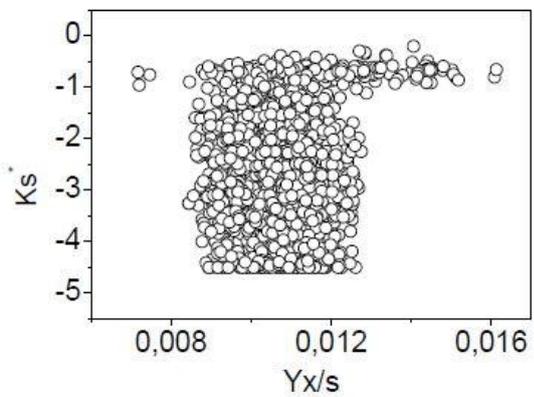
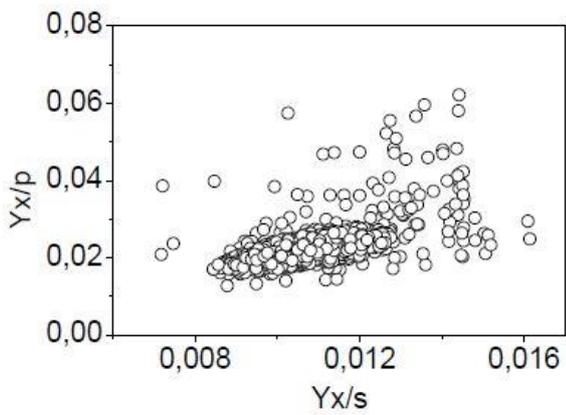
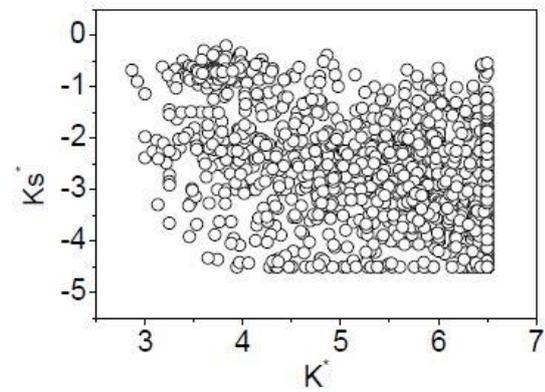
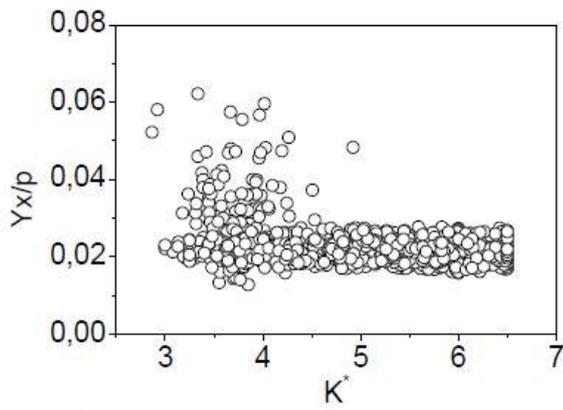
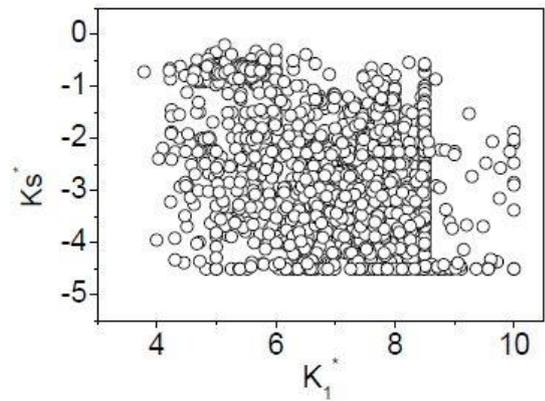
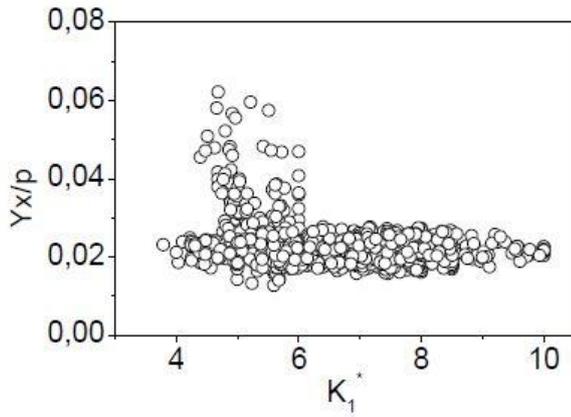
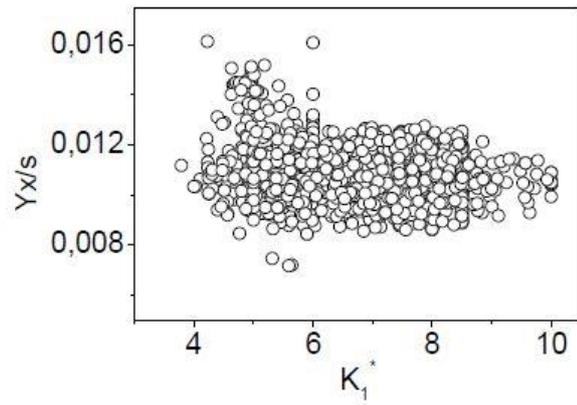
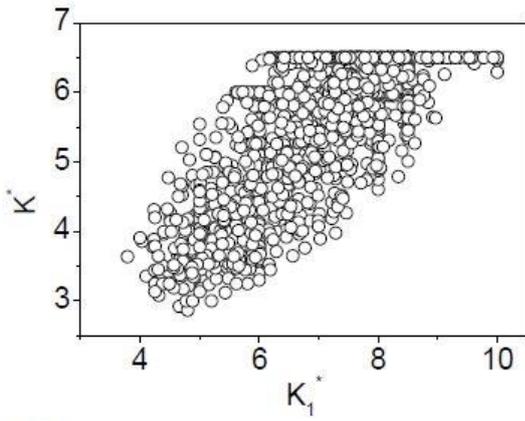






Reator Semicontínuo





APÊNDICE D

Código do Modelo do Reator Semicontínuo implementado no ESTIMA

```

! Subrotina para o calculo ALGEBRICO
SUBROUTINE Modelo01(NVent,NVsai,NPar,VarEnt,VarSai,Param)
use globais

IMPLICIT NONE

! Variáveis fixas
INTEGER, INTENT(IN) :: NVent, NVsai, NPar
REAL(8), INTENT(IN) :: VarEnt(NVent), Param(NPar)
REAL(8), INTENT(OUT) :: VarSai(NVsai)

      neq = 4
      lrw = 40+9*neq+neq**2
      liw = 20+neq

      call Modelo_Dassl01(NVent,NVsai,NPar,VarEnt,VarSai,Param)

RETURN
END SUBROUTINE Modelo01

SUBROUTINE Modelo_Dassl01(NVent,NVsai,NPar,VarEnt,VarSai,Param)
use globais
USE VARIAVEIS, ONLY: X0, XF, S0, SF, S10, S1F, PF, TOUT, DDIRAC

implicit none

INTEGER, INTENT(IN) :: NVent, NVsai, NPar
REAL(8), INTENT(IN) :: VarEnt(NVent), Param(NPar)
REAL(8), INTENT(OUT) :: VarSai(NVsai)

real*8      :: y(neq), yprime(neq), delt(neq), rwork(lrw)
real*8      :: rtol(npar), atol(neq), rpar(npar)
integer     :: iwork(liw), ipar(neq), info(15)
integer     :: ires, idid
logical     :: novaCI

real*8      :: t, tfim, dt, DMOD
real*8      :: fat, integra, tempe, cinetica01

integer     :: i, j, k, m, n, mm
integer     :: ni, cont
external    :: res01, jac
common     tfim

rpar = param

! condições iniciais
t= 0.d0
Y(1) = CI(1)
Y(2) = CI(2)
Y(3) = CI(3)
Y(4) = CI(4)
yprime = 0.0d0

```

```

delt = 0.0d0

!  parametros da Dassl
atol = 1.0d-6
rtol = 1.0d-8

rwork = 0.0d0
iwork = 0
info = 0

t      = 0.0d0
DDIRAC = 0.0D0

call res01(t,y,yprime,delt,ires,rpar,ipar)

yprime = delt

!armazena as condições iniciais
VarSai(1) = Y(1)
VarSai(1+NVent) = Y(2)
VarSai(1+2*NVent) = Y(3)
VarSai(1+3*NVent) = Y(4)

call res01(t,y,yprime,delt,ires,rpar,ipar)

do j = 1, NVent
    tfim = VarEnt(j)

    DT = (TFIM-T)/5.0D1
    SUBINTEGRACAO: DO I = 1,50

    TFIM = T+DT

    if (tfim.eq.0.0d0) go to 9

    call ddassl(res01,neq,t,y,yprime,tfim,info,rtol,atol,idid,e
                rwork,lrw,iwork,liw,rpar,ipar,jac)

    if (idid.lt.0) then
        write(*,*)'IDID=',idid
        VarSai(j) = 1.0d10
        go to 10
    end if

    !armazena os valores no tempo j
    VarSai(j) = Y(1)
    VarSai(j+NVent) = Y(2)
    VarSai(j+2*NVent) = Y(3)
    VarSai(j+3*NVent) = Y(4)

9  continue

    ENDDO SUBINTEGRACAO

end do

10 continue

```

```

close(13)

return
end subroutine

subroutine res01(t,y,yprime,delt,ires,rpar,ipar)
use globais
use variaveis, only : npar, PARAM, NMODELO, X0, XF, S0, SF, S10, S1F, PF,
TOUT, DDIRAC

    implicit none

!     integer, parameter      :: neq = 3
    real*8 :: rpar(npar), t, tfim
    real*8 :: delt(neq),yprime(neq),y(neq),val
    REAL*8 :: AMI, AMIMAX, KS,K1,K, YXS,YXP, GAMAX, GAMAS, LAMBDA1,
LAMBDA2, LAMBDA10, LAMBDA11, GAMAS1, LAMBDA1P, LAMBDA2P, e
                XMAX, SM, GAMASM, D, KD, N, XPARAM
    integer:: ires, m, ipar(npar)
    common      tfim

!MODELO ADIMENSIONAL
!Y(1) = BIOMASSA, Y(2) = SACAROSE, Y(3) = GLICOSE, Y(4) = ETANOL
!DELT: RESIDUO DA EQUAÇÃO
!YPRIME REPRESENTA AS DERIVADAS

!CINETICA 1
!EQUACAO DE MONOD
!PARAMETROS DO MODELO
AMIMAX = RPAR(1)
K1      = RPAR(2)
K       = RPAR(3)
YXS    = RPAR(4)
YXP    = RPAR(5)
KS     = RPAR(6)
N      = 1.0d0
D      = 3.0d1 !para alfa = 0,5 e Deltat = 15 minutos

XMAX    = 7.375D0
SM      = 1.25D2
GAMAS   = S0/(SF-S0)
GAMAX   = X0/(XF-X0)
LAMBDA1 = X0/(SF-S0)
LAMBDA2 = (XF-X0)/(SF-S0)
LAMBDA10 = S0/(S1F-S10)
LAMBDA11 = (SF-S0)/(S1F-S10)
GAMAS1  = S10/(S1F-S10)
LAMBDA1P = X0/PF
LAMBDA2P = (XF-X0)/PF
GAMASM  = SM/(SF-S0)

!CINÉTICA DE MONOD
AMI = (AMIMAX*(GAMAS+Y(2)))/(KS+GAMAS+Y(2))

    if ((t.GT.0.984d0).and.(t.le.1.0d0)) then
        DDIRAC = 1.0D0
    elseif ((t.GT.1.984d0).and.(t.le.2.0d0)) then
        DDIRAC = 1.0D0
    elseif ((t.GT.2.984d0).and.(t.le.3.0d0)) then
        DDIRAC = 1.0D0
    else

```

```
        DDIRAC = 0.0D0
endif
```

```
DELT(1) = (Y(1)+GAMAX)*(AMI-DDIRAC*D) - YPRIME(1)
DELT(2) = DDIRAC*D*(GAMASM-GAMAS-Y(2)) - (AMI*(LAMBDA1 +
LAMBDA2*Y(1)))/YXS - YPRIME(2)
DELT(3) = -(DDIRAC*D+K)*(GAMAS1+Y(3)) + K1*(LAMBDA10 + LAMBDA11*Y(2)) -
YPRIME(3)
DELT(4) = -DDIRAC*D*Y(4) + (AMI*(LAMBDA11 + LAMBDA12*Y(1)))/YXP - YPRIME(4)
```

```
return
end subroutine res01
```

```
subroutine jac(t,y,yprime,pd,cj,rpar,ipar)
implicit double precision (a-h,o-z)
!subroutine fantasma
return
end
```