

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:

DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS QUÍMICOS

***MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO DE
FERMENTADORES PARA OBTENÇÃO DE ETANOL***

AUTORA: Patricia Candioto Migliari de Oliveira

ORIENTADOR: Prof. Dr. Rubens Maciel Filho

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

Campinas – São Paulo

Julho de 2007

UNIDADE BC
Nº CHAMADA:
T/UNICAMP OL4m
V. _____ EX. _____
TOMBO BCCL 74873
PROC 16/43-07
C _____ D X
PREÇO 11,00
DATA 31/07/07
BIB-ID 414313

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

OL4m Oliveira, Patrícia Candioto Migliari de
Modelagem e otimização de fermentadores para
obtenção de etanol / Patricia Candioto Migliari de
Oliveira.--Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientadores: Rubens Maciel Filho.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Otimização. 2. Modelamento matemático. 3.
Programação quadrática. 4. Álcool. I. Maciel Filho,
Rubens. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Modelling and optimization of fermentors for ethanol production.
Palavras-chave em Inglês: Optimization, Structured model, Ethanol, Response surfac
analysis, Sucessive quadratic programming.

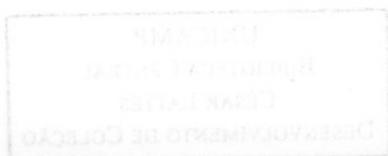
Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora: Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Telma Teixeira Franco,
Vera Lúcia Gouveia e Márcia Guekezian.

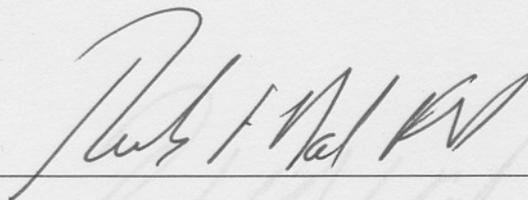
Data da defesa: 31/07/2007

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

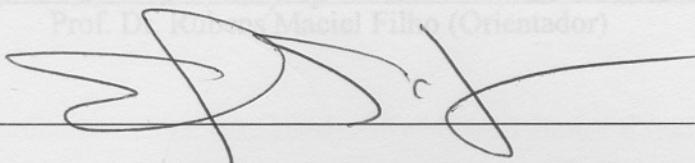


000752389

Tese de Doutorado defendida por Patrícia Candioto Migliari e aprovada em 31 de julho de 2007 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Rubens Maciel Filho (Orientador)



Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira (Titular)



Profa. Dra. Telma Teixeira Franco (Titular)

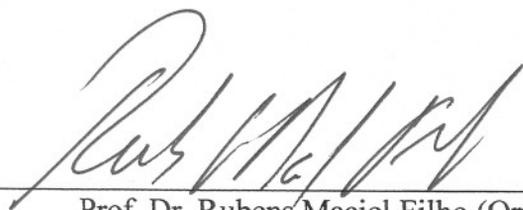


Dra Vera Lúcia Gouveia (Titular)



Profa. Dra. Márcia Guekezian (Titular)

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



Prof. Dr. Rubens Maciel Filho (Orientador)

... com meus irmãos, os meus pais, Clivaldo Migliari Junior e Inês de Lencastre
Miguel, e os meus filhos, Paulo Henrique Migliari e João Vitor Migliari, ao meu
neto e netas, Alexandre e Alexandra, Alexandre Henrique de Oliveira e as minhas filhas
Larissa Migliari de Oliveira e Carolina Migliari de Oliveira.

Dedico este trabalho aos meus pais Clorivaldo Migliari Junior e Iracema Candito Migliari, meus irmãos Flávio Henrique Migliari e João Vitor Migliari, ao meu marido e eterno companheiro Alessandro Henrique de Oliveira e as minhas filhas Isabela Migliari de Oliveira e Carolina Migliari de Oliveira.

Agradecimentos

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro iabilizando a realização deste trabalho;

Ao Elmer pela grande ajuda na realização deste trabalho;

Ao Professor Rubens Maciel, pela sua paciência, otimismo, dedicação e orientação.

RESUMO

O trabalho envolveu modelo estruturado adaptado de um modelo estruturado de crescimento para processo de fermentação contínua realizado em um bioreator do tipo torre com células imobilizadas para produção de etanol. O modelo estruturado utilizado inclui equações de balanço para as rotas metabólicas fermentativa e respiratória, assim como termos cinéticos para o efeito de inibição pelo etanol, substrato e saturação celular no pellet. Os parâmetros cinético do modelo estruturado foram otimizados através da metodologia desenvolvida por Rivera (2005) onde envolve a aplicação de Algoritmo Genético, Planejamento Fatorial Fracionário proposto por Plackett Burman (1946) e Algoritmo Quasy Newton. Os resultados obtidos na simulação do modelo utilizando os parâmetros otimizados por esta metodologia representou de forma efetiva o modelo. A otimização do processo teve início com a Análise de Superfície de Resposta, que consistiu em um planejamento fatorial em estrela de dois níveis (-1 e +1) com um ponto central. A metodologia por Superfície de Resposta mostrou-se uma ferramenta poderosa para otimização preliminar das variáveis operacionais no sentido de que seus resultados foram usados como estimativas iniciais para o procedimento formal de otimização, SQP (Programação Quadrática Sucessiva). Esta metodologia de Superfície de resposta possibilita visualização do comportamento das variáveis que se quer otimizar, identificando a região do ponto ótimo, o que não é possível pelo método SQP. A metodologia SQP foi implementada com sucesso no modelo determinístico, obtendo as melhores condições de operação para as variáveis manipuláveis.

ABSTRACT

The work involved adapted of a structured model of growth structured model for process of continuous fermentation accomplished in a bioreactor of the type tower with immobilized cells for etanol production. The used structured model includes reaction rate equations for the respiratory and glicolitic metabolic pathways, as well as kinetic terms for the inhibition effect for the etanol, substrate and cellular saturation in the pellet. The kinetic of the structured model parameters went optimized through to methodology developed by Rivera (2005) where it involves the application of Genetic Algorithm, methodology of Plackett–Burman (1946) and Algorithm Quasi Newton. The results obtained in the simulation of the model using the parameters optimized for this methodology represented in an effective way the model. The optimization of the process had I begin with the Analysis of Surface of Answer, that consisted of a planning fatorial in star of two levels (-1 and +1) with a central point. The methodology for Surface of Answer a powerful tool was shown for preliminary optimization of the operational variables in the sense that its results were used as initial estimates for the formal procedure of optimization, SQP. This methodology of answer Surface facilitates visualization of the behavior of the variables that if that otimizaz, identifying the area of the great point, what is not possible for the method SQP. The methodology SQP was implemented with success in the model deterministic, obtaining the best operation conditions for the variables manipulated.

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO	1
2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1) ASPECTOS GERAIS DO METABOLISMO DAS LEVEDURAS	5
2.2) MODELO MATEMÁTICO NÃO ESTRUTURADO	22
2.3) MODELOS ESTRUTURADOS E NÃO-ESTRUTURADOS	25
2.4) MODELOS COMPARTIMENTAIS.....	26
2.5) CONSTRUÇÃO DE MODELOS ESTRUTURADOS.....	27
2.6) EVOLUÇÃO DOS MODELOS ESTRUTURADOS	30
3) PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	49
3.1) PLANEJAMENTO FATORIAL	51
3.2) PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN.....	53
4) OTIMIZAÇÃO POR PROGRAMAÇÃO QUADRÁTICA SEQUENCIAL (SQP).....	54
5) MODELO ESTRUTURADO.....	59
5.1) MODELO INTRACELULAR.....	63
5.2) REDUÇÃO DE MODELO.....	71
5.3) MODELO ESTRUTURADO REDUZIDO DE ROTBOLL E JORGENSEN	72
6) OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS	75
6.1) OBTENÇÃO DOS VALORES INICIAIS DOS PARÂMETROS	76
6.2) OTIMIZAÇÃO POR RGA	76
6.3) IDENTIFICAÇÃO DOS PARÂMETROS MAIS SIGNIFICATIVOS	77
6.4) OTIMIZAÇÃO FINAL POR ALGORITMO QUASE NEWTON	77
6.5) RESULTADO DA OTIMIZAÇÃO.....	78
7) OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO	83
7.1) OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO POR ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	83
7.2) OTIMIZAÇÃO POR PROGRAMAÇÃO QUADRÁTICA SUCESSIVA	102
7.2.1) <i>Algoritmo SQP para otimização de três variáveis operacionais</i>	<i>103</i>
7.2.2) <i>Algoritmo SQP para otimização de cinco variáveis operacionais.....</i>	<i>105</i>
8 – CONCLUSÕES	110
9) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1: Degradação anaeróbica da glicose por meio da via glicolítica ou (EMP).....	8
Figura 2: Degradação anaeróbica da glicose a piruvato por meio da via glicolítica ou Embdem-Meyerhof-Parnas (EMP).....	9
Figura 3: Etapas da descarboxilação do ácido pirúvico.....	16
Figura 4: Degradação da glicose via HMP.....	18
Figura 5: Ciclo do Ácido Tricaboxílico.....	21
Figura 6: Representação esquemática de um modelo de dois compartimentos.....	26
Figura 7: Esquema de fluxo de massa na levedura.....	40
Figura 8: Biorreator tipo torre com células imobilizadas com separadores externos de gás para produção de etanol.....	63
Figura 9: Gráfico da concentração de substrato em função do tempo.....	82
Figura 10: Gráfico da concentração de etanol em função do tempo.....	82
Figura 11: Diagrama Esquemático do processo de otimização.....	83
Figura 12: Gráfico de Pareto para o Rendimento.....	88
Figura 13: Valores Preditos versus Observados (Rendimento).....	90
Figura 14: Superfície de resposta e diagrama de contorno do Rendimento como função de: Dpt e Q.....	91
Figura 15: Superfície de resposta e diagrama de contorno do Rendimento como função de: Dpt e S_0	92
Figura 16: Superfície de resposta e diagrama de contorno do Rendimento como função de: Q e S_0	93
Figura 17: Gráfico de Pareto para a Conversão.....	96
Figura 18: Valores Preditos versus Observados (Conversão).....	98

Figura 19: Superfície de resposta e diagrama de contorno da Conversão como função de: D_{pt} e Q	99
Figura 20. Superfície de resposta e diagrama de contorno da Conversão como função de: D_{pt} e S_0	100
Figura 21. Superfície de resposta e diagrama de contorno da Conversão como função de: Q e S_0	101

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1: Valores dos parâmetros cinéticos utilizados inicialmente segundo Stremel (2001).....	78
Tabela 2: Parâmetros cinéticos otimizados pelo RGA.....	79
Tabela 3: Efeito estimado pela equação 4.4.3.1 dos resultados do Plackett – Burman.....	80
Tabela 4: Parâmetros reestimados pelo algoritmo Quasi Newton.....	81
Tabela 5: Faixa de valores no planejamento experimental para o estudo do Rendimento e Conversão do processo fermentativo, onde: Dpt: Diâmetro da partícula; Q: Vazão de alimentação e S_0 : Concentração inicial de substrato.....	84
Tabela 6: Ensaios realizados no planejamento fatorial completo, onde: Dpt: Diâmetro da partícula; Q: Vazão de alimentação e S_0 : Concentração inicial de substrato.....	85
Tabela 7: Ensaios realizados no planejamento composto central, onde: Dpt: Diâmetro da partícula; Q: Vazão de alimentação e S_0 : Concentração inicial de substrato.....	86
Tabela 8: Efeito estimado para o rendimento obtido através de um planejamento fatorial completo.....	87
Tabela 9: Análise de variância para o modelo quadrático do rendimento obtido para o planejamento composto central, para 95% de nível de confiança.....	89
Tabela 10: Efeito estimado para a conversão obtido através de um planejamento fatorial completo (Tabela 07).....	95
Tabela 11: Análise de variância para o modelo quadrático da conversão obtida para o planejamento composto central, para 95% de nível de confiança.....	97
Tabela 12: Valor inicial (XGUESS) e Limites inferior (XLB) e superior (XUB) utilizados na otimização utilizando o algoritmo SQP.....	104
Tabela 13: Valores das variáveis otimizadas (Q, Dpt e S_0), no modelo determinístico do processo de fermentação alcoólica, usando o algoritmo	

SQP.....	104
Tabela 14: Valor inicial (XGUESS) e limites inferior (XLB) e superior (XUB) utilizados na otimização utilizando o algoritmo SQP.....	104
Tabela 15: Valores das variáveis otimizadas (Q, Dpt e S ₀), no modelo determinístico do processo de fermentação alcoólica, usando o algoritmo SQP.....	105
Tabela 16 Valor inicial (XGUESS) e Limites inferior (XLB) e superior (XUB) utilizados na otimização utilizando o algoritmo SQP.....	106
Tabela 17: Valores das variáveis otimizadas (Q, Dpt, S ₀ , DR e Z), no modelo determinístico do processo de fermentação alcoólica, usando o algoritmo SQP.....	106
Tabela 18: Valor inicial (XGUESS) e Limites inferior (XLB) e superior (XUB) utilizados na otimização utilizando o algoritmo SQP.....	107
Tabela 19: Valores das variáveis otimizadas (Q, Dpt, S ₀ , DR e Z), no modelo determinístico do processo de fermentação alcoólica, usando o algoritmo SQP.....	107
Tabela 20: Valor inicial (XGUESS) e Limites inferior (XLB) e superior (XUB) utilizados na otimização utilizando o algoritmo SQP.....	107
Tabela 21: Valores das variáveis otimizadas (Q, Dpt, S ₀ , DR e Z), no modelo determinístico do processo de fermentação alcoólica, usando o algoritmo SQP.....	108
Tabela 22: Valor inicial (XGUESS) e Limites inferior (XLB) e superior (XUB) utilizados na otimização utilizando o algoritmo SQP.....	108
Tabela 23: Valores das variáveis otimizadas (Q, Dpt, S ₀ , DR e Z), no modelo determinístico do processo de fermentação alcoólica, usando o algoritmo SQP.....	108

1) INTRODUÇÃO

Com a crise do petróleo, nos anos 70, a produção de etanol ganhou importância e tornou-se a principal alternativa no programa de combustíveis para a substituição da gasolina. Com a criação do Proálcool, o Brasil foi o primeiro país do mundo a desenvolver um programa em larga escala para a produção de combustíveis alternativos. O Proálcool atingiu o sucesso entre 1984 e 1986, quando a porcentagem de automóveis saídos das montadoras com motor a álcool atingiu 96%.

No final dos anos 80, a cotação internacional do petróleo começou a baixar e a relação vantajosa de preço entre álcool e a gasolina, de até 40%, reduziu-se até cair pela metade. Ao mesmo tempo os usineiros reduziram a fabricação de álcool e elevaram a produção de açúcar, cujos preços internacionais estavam mais atraentes. O combustível se tornou escasso, o consumidor perdeu a confiança e o Proálcool conseqüentemente foi desacelerando. Em 2002, apenas 1% dos carros novos saíam das fábricas com esse combustível.

Sinônimo de combustível renovável, que polui menos em comparação com os derivados de petróleo, o etanol voltou a ocupar um lugar de destaque no cenário energético do país e também começou a ser desejado por vários países. No caso brasileiro o responsável pelo renascimento do álcool são os carros bicombustíveis, ou *flex fuel*, que podem ser reabastecidos com álcool ou gasolina, ou ainda os dois juntos em qualquer proporção. Em fevereiro de 2005 os carros bicombustíveis representaram 53% do total de veículos produzidos e em fevereiro de 2006 esta porcentagem alcançou 76% (PESQUISA FAPESP, 2006).

Um dos atuais desafios do Brasil é aumentar a oferta de álcool combustível, a fim de que não ocorra uma situação semelhante do final dos anos 1980 quando a safra acabou e o álcool ficou escasso. As soluções englobam desde novas variedades de cana de açúcar, incluindo plantas transgênicas, até simples expansões da área agrícola, além de inovações na linha de produção das usinas.

Em 1996 a produção mundial de etanol alcançou uma estimativa de 31,3 bilhões de litros (BERG, 1998). Aproximadamente 80% foram produzidos através

Introdução

da fermentação anaeróbica de várias fontes de açúcar por *Saccharomyces cerevisiae*. Assim, o etanol é ainda uma das mais importantes produtos originários da indústria biotecnológica. Dois terços da produção mundial está localizado no Brasil e Estados Unidos com o objetivo de usar etanol como uma fonte renovável de combustível. A expectativa deste mercado é de que ocorra um crescimento substancial na produção de etanol para um futuro próximo. Existem fortes incentivos econômicos para melhorar ainda mais os processos de produção de etanol (NISSEN *et al.*, 2000).

Embora se tenha notado um avanço muito importante nos sistemas de produção de etanol, muitos trabalhos relacionados com a melhora do rendimento destes sistemas vem sendo discutidos, tanto em trabalhos experimentais como em trabalhos computacionais.

O desenvolvimento de cepas que melhoram a produção tem sido uma das principais tarefas da biotecnologia. O procedimento para esta tarefa tem sido a engenharia genética seguida por técnicas de seleção. Apesar deste procedimento ter sido um grande sucesso no passado - onde algumas novas cepas aumentaram a produção de um determinado produto em até 100 vezes quando comparadas com a cepa original - o progresso no aumento de rendimento foi diminuindo consideravelmente em muitos casos (TORRES *et al.*, 1997).

Dois áreas de desenvolvimento são promissoras. A primeira é melhor compreensão da estrutura do sistema metabólico e da cinética e termodinâmica das reações químicas que ocorrem na célula. A segunda ocorre na área de biologia molecular (TORRES *et al.*, 1997).

No processo de transformação da glicose em etanol, uma série de reações ocorre no interior das leveduras. Ao total destas reações chama-se de metabolismo celular. A taxa de produção de um metabólito é sempre a mais importante propriedade de um bioprocessos, que neste caso entende-se como etanol. Esta taxa de produção é determinada pelas reações intracelulares do metabolismo do microrganismo. Estas taxas são determinadas pela própria constituição genética da célula como também pelas condições do ambiente ao redor da célula (GALAZZO & BAYLAY, 1990).

Um dos principais objetivos do estudo do metabolismo é entender como o ambiente ao redor da cultura afeta as reações metabólicas (SHI & SHIMIZE, 1998).

Apesar dos caminhos metabólicos para conversão do substrato em energia, biomassa, entre outros, serem conhecidos, os mecanismos regulatórios da célula como um todo é complicado, envolvendo interações entre diferentes rotas através de intermediários inibidores e ativadores comuns. A análise do metabolismo é uma poderosa ferramenta para explicar a fisiologia celular e suas mudanças que ocorrem em resposta as variações do ambiente (SHI & SHIMIZE, 1998).

No caso de um processo já estabelecido, a análise do metabolismo pode determinar qual proporção do fluxo de carbono está sendo direcionado para o produto de interesse, e pode examinar o efeito sobre isto por mudanças nas condições do bioprocessamento (SHI & SHIMIZE, 1998).

A modelagem matemática é uma poderosa ferramenta para se estudar este comportamento. A modelagem da rede metabólica pode ser usada para simulação da fisiologia para melhor compreender seu regulamento, para ampliar e redirecionar fluxos metabólicos e investigar como mudanças nas condições do ambiente mudam o metabolismo (RIZZI *et al.*, 1997)

Sendo assim, um modelo matemático estruturado para simulação de um reator tubular que utiliza *Sacharomyces Cerevisae* em pellets, para produção de etanol foi utilizado no desenvolvimento deste trabalho.

O objetivo é otimizar este sistema utilizando o modelo matemático desenvolvido que inclui descrições do metabolismo celular adaptadas para o processo em questão, sem gerar modelos com alto grau de complexidade.

Como ferramentas de otimização serão utilizadas técnicas de planejamento de experimentos e superfície de resposta para escolher entre as numerosas variáveis de processo, aquelas mais importantes para maximizar rendimento e conversão e programação quadrática sucessiva (SQP) para a busca rigorosa das condições otimizadas. Assim como o processo, os parâmetros cinéticos do modelo matemático que representam o processo também serão otimizados. Para isto, uma

Introdução

técnica utilizando Algoritmo Genético, metodologia Plackett Burman e algoritmo Quase Newton será utilizada.

2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1) ASPECTOS GERAIS DO METABOLISMO DAS LEVEDURAS

O propósito deste item é de apreciar as reações básicas que mostram como os microrganismos utilizam os substratos, como obtém energia para a biossíntese e como aliam as reações produzindo energia com aquelas que às requerem.

Uma infinidade de reações enzimaticamente catalisadas ocorre em uma célula microbiológica. O soma de todas as reações enzimáticas que ocorrem na célula é conhecido como metabolismo celular. O metabolismo é uma atividade celular altamente coordenada, com propósitos determinados, e na qual cooperam muitos sistemas multienzimáticos.

O metabolismo tem quatro funções específicas: (1) obter energia química pela degradação de nutrientes ricos em energia oriunda do meio ambiente; (2) converter as moléculas dos nutrientes em unidades fundamentais precursoras das macromoléculas celulares; (3) reunir e organizar estas unidades fundamentais em proteínas, ácidos nucléicos e outros componentes celulares; (4) sintetizar e degradar biomoléculas necessárias as funções especializadas da célula. Os processos metabólicos são divididos em duas fases principais, o catabolismo e o anabolismo. O catabolismo é a fase degradativa do metabolismo, onde moléculas nutrientes, provenientes ou do meio ambiente celular ou de seus próprios depósitos de nutrientes, são degradadas para produzir moléculas menores e mais simples, tais como o ácido láctico, ácido acético, etanol, CO₂, amônia, uréia. O catabolismo é acompanhado pela liberação de energia química inerente a estrutura das moléculas orgânicas nutrientes, e pela sua conservação na forma de ATP (adenosina trifosfato). O anabolismo é a fase biossintética do metabolismo, a biossíntese enzimática de determinados componentes moleculares das células, como os ácidos nucléicos, as proteínas, os poliossacarídeos e os lipídeos. A biossíntese das moléculas orgânicas requer a entrada de energia química, a qual é fornecida pelo ATP, que é gerado durante o catabolismo (LEHNINGER, 1976).

A maioria dos microrganismos utiliza a energia inerente da estrutura das moléculas orgânicas nutrientes para obter seu suprimento de energia. Essa formas

Revisão Bibliográfica

de energia são transformadas pelas células na energia química da adenosina trifosfato (ATP), que funciona como transportador de energia para os processos celulares que dependem de um suprimento de energia. O ATP funciona de maneira cíclica, transportando energia química das reações degradativas do metabolismo, produtoras de energia química, para vários processos celulares dependentes do fornecimento de energia.

Do ponto de vista bioquímico o metabolismo é separado em diversas vias metabólicas. Cada via não existe isoladamente, são parte de um processo metabólico como um todo (PRIEST & CAMPBELL, 1999).

Metabolismo do carboidrato durante a fermentação.

A seguir são descritas as principais reações que ocorrem durante a Glicólise ou Via EMP (Embden-Meyerhoh-Parnas), na oxidação monofosfato ou Via HMP (desvio hexose-monofosfato ou via do fosfogluconato) e no ciclo do ácido tricarbóxico. Na glicólise, a molécula de glicose pode ser degradada em duas moléculas de ácido láctico como único produto final ou ser desdobrada em duas moléculas de etanol e em duas moléculas de CO₂, conforme o microrganismo que está presente. O primeiro caso é denominado de glicólise e no segundo de fermentação alcoólica, sendo que nos dois casos ocorrem à fermentação da glicose. A via Oxidação monofosfato ou Via HMP (desvio hexose-monofosfato ou via do fosfogluconato) no metabolismo microbiano produz redutores como NADPH, além de converter hexoses em pentoses, particularmente a D-ribose-5-fosfato, e realiza a degradação oxidativa das pentoses pela conversão a hexoses, que então podem entrar na sequência glicolítica. O ciclo do ácido tricarbóxico das leveduras é usado para suprir substratos adicionais para a biossíntese. Sob as condições anaeróbicas da fermentação, os níveis de enzimas do ciclo de Krebs (ciclo do ácido tricarbóxico) são bem menores. Nestas condições dois mecanismos têm sido propostos onde o primeiro considera uma operação limitada do ciclo do ácido tricarbóxico e o segundo é proposto que este ciclo inoperante.

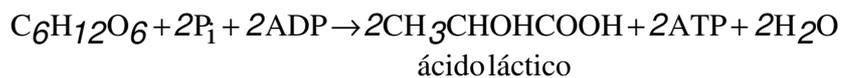
a) Glicólise ou Via EMP (Embden-Meyerhoh-Parnas)

A glicólise é uma das inúmeras vias metabólicas, conhecidas genericamente como fermentações anaeróbicas, através dos quais muitos microrganismos

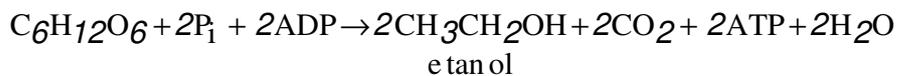
extraem energia química de vários combustíveis orgânicos, na ausência do oxigênio molecular.

Os açúcares, especialmente a glicose, são os combustíveis mais comuns da fermentação anaeróbica. A fermentação da glicose pode ocorrer de duas maneiras estreitamente relacionadas. Na glicólise, a molécula de glicose, de seis carbonos, é degradada em duas moléculas de ácido láctico, de três carbonos, como único produto final (ocorre em vários microrganismos e nas células da maioria dos animais e vegetais superiores). Na fermentação alcoólica, característica de muitos fungos, a molécula de glicose é desdobrada em duas moléculas de etanol e em duas moléculas de CO₂.

Glicólise,



Fermentação alcoólica,



A fermentação alcoólica ocorre pelas mesmas vias enzimáticas que a glicólise, exceto no final, onde requer duas etapas enzimáticas diferentes.

A Figura 1 apresenta, segundo REHM & REED (1981), as principais etapas na degradação anaeróbica da glicose a piruvato por meio da via glicolítica ou Embden-Meyerhoh-Parnas (EMP).

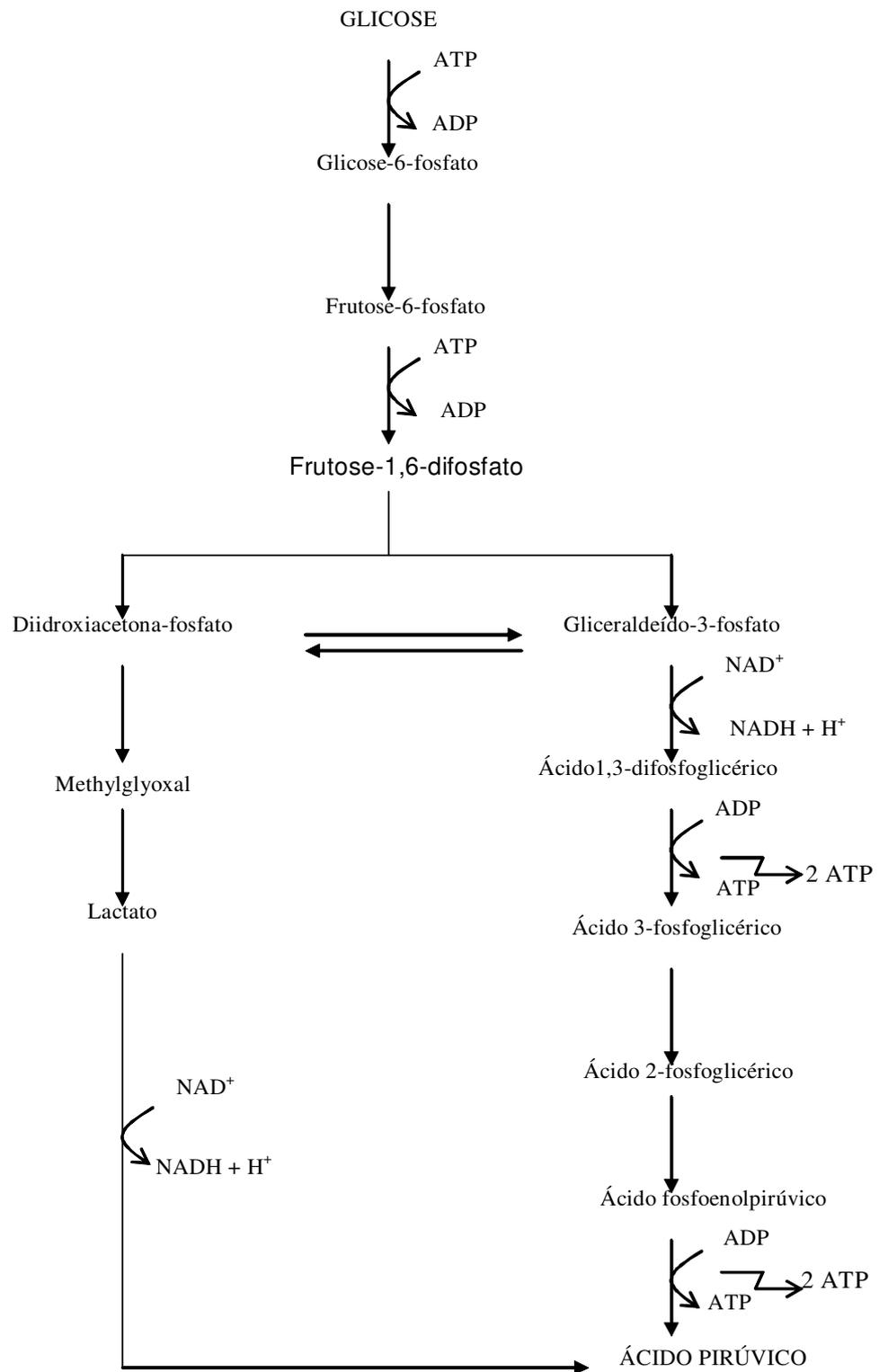


Figura 1: Degradação anaeróbica da glicose por meio da via glicolítica ou via (EMP).

O piruvato pode agora seguir três caminhos diferentes, sendo eles: em condições anaeróbicas formar lactato ou etanol, e em condições aeróbicas formar CO_2 e H_2O . No caso das leveduras, em condições anaeróbicas, forma-se o etanol, com é apresentado na sequência a seguir.

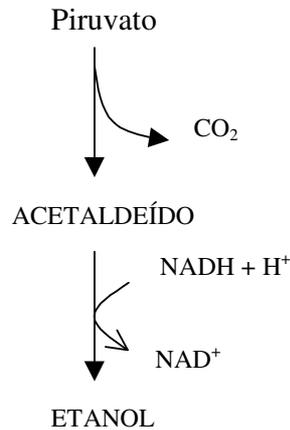


Figura 2: Degradação anaeróbica da glicose a piruvato por meio da via glicolítica ou Embden-Meyerhof-Parnas (EMP).

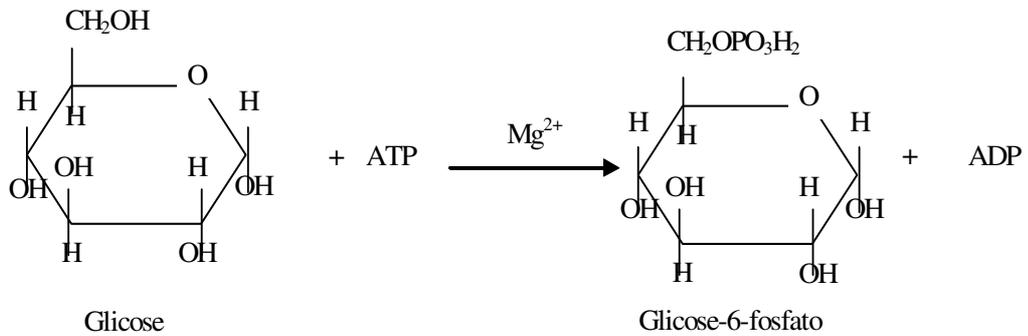
Existem duas fases principais na glicólise. Na primeira, a glicose é preparada para seu catabolismo, pela fosforilação, e então clivada para formar o açúcar de três carbonos *gliceraldeído-3-fosfato*. Na segunda, o gliceraldeído-3-fosfato é convertido a piruvato. Na primeira fase são gastas duas moléculas de ATP para fosforilar a glicose. Na segunda fase ocorrem as etapas de óxi-redução e os mecanismos conservadores de energia pelos quais o ADP é fosforilado a ATP. Nesta fase são formadas quatro moléculas de ATP de modo que o rendimento efetivo é de 2 moléculas de ATP por molécula degradada de glicose.

Todas as reações envolvidas na transformação anaeróbica da glicose em etanol são catalisadas pela ação consecutiva de um grupo de enzimas. As reações, segundo CONN *et al.* (1987), são descritas a seguir.

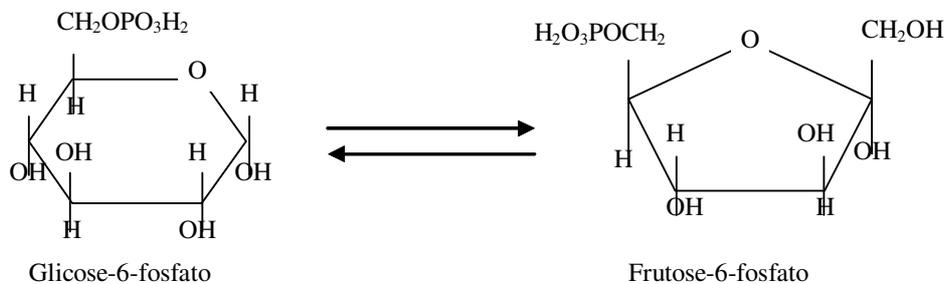
Fosforilação da glicose pelo ATP: A molécula neutra de glicose é preparada para as etapas enzimáticas subsequentes através de sua fosforilação pelo ATP produzindo glicose-6-fosfato. Esta é a primeira etapa na qual se utiliza ATP. A maioria da glicose intracelular existe sob a forma fosforilada. Esta reação é

Revisão Bibliográfica

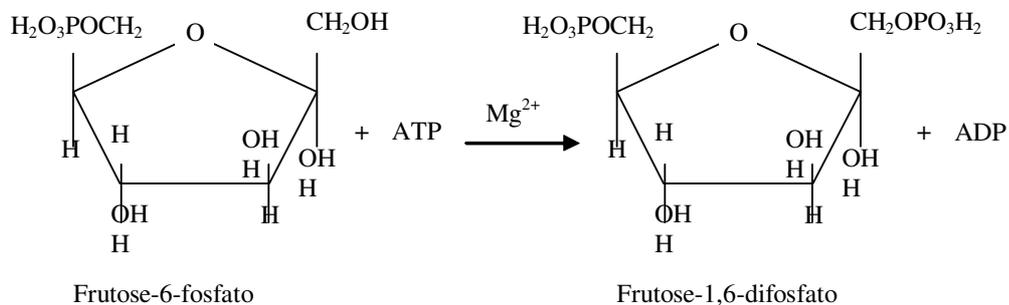
catalisada por dois tipos de enzimas, a *hexoquinase* e a *glucoquinase*, que diferem em sua especificidade pelo açúcar e afinidade pela glicose. A hexoquinase é empregada pela maioria das células. Catalisa além da fosforilação da glicose outras hexoses (frutose, manose, glucosamina). As hexoquinases são encontradas em leveduras e bactérias, em diversos tecidos animais e vegetais. A glucoquinase catalisa apenas a fosforilação da glicose, e não age sobre outras hexoses. Tanto a hexoquinase como a glucoquinase requerem um cátion bivalente (Mg^{+2} ou Mn^{+2}), que se combina primeiro com o ATP para formar o substrato verdadeiro ($MgATP^{2-}$ ou $MnATP^{2-}$). Em condições intracelulares a fosforilação da glicose não é reversível.



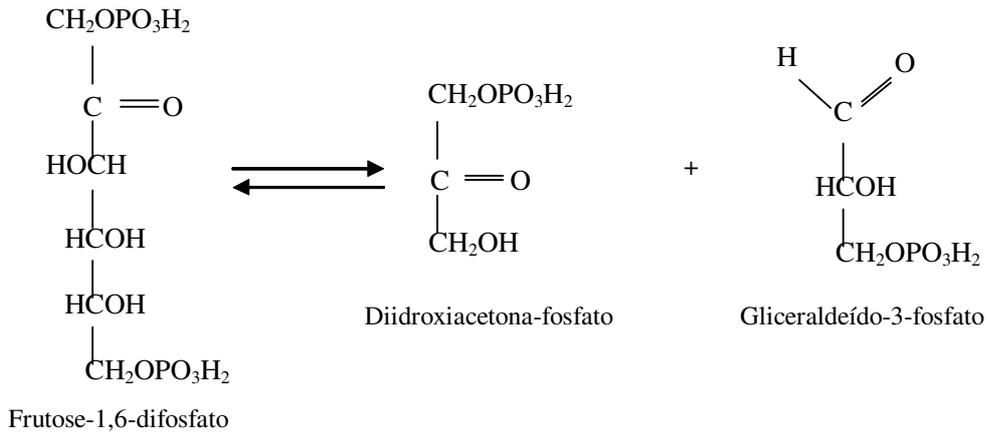
Conversão da glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato: Esta reação é catalisada pela enzima *glicose-fosfato-isomerase*. Esta enzima é específica para a glicose-6-fosfato e frutose-6-fosfato. A reação se processa em ambas as direções, sendo também reversível na célula.



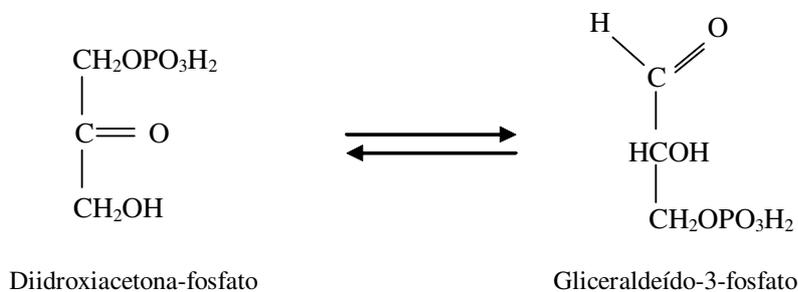
Fosforilação da frutose-6-fosfato a frutose-1,6-difosfato: Nesta etapa uma segunda molécula de glicose é necessária para fosforilar a frutose-6-fosfato na posição 1, produzindo a frutose-1,6-difosfato. Esta ação é catalisada pela enzima 6-fosfofrutoquinase. O Mg^{+2} é requerido para formar o substrato $MgATP^{-2}$. Esta etapa é a mais importante da sequência glicolítica. A fosfofrutoquinase é uma enzima aloestérica. Ela é inibida por citrato, concentrações elevadas de ATP e ácidos graxos de cadeia longa, porém é estimulada por ADP ou AMP. Assim, quando a célula apresentar uma concentração elevada de ATP ou combustíveis como ácidos graxos ou citrato estiveram disponíveis, a 6-fosfofrutoquinase é inibida e a glicólise pára. Por outro lado, quando a concentração de ATP estiver baixa e predominam ADP e AMP, ou sempre que a concentração de combustíveis como citrato e ácidos graxos for baixa, a atividade da enzima é estimulada. Nas células, a reação da 6-fosfofrutoquinase é essencialmente irreversível. A conversão da frutose-1,6-difosfato em frutose-6-difosfato é possível mediante um caminho enzimático distinto.



Clivagem da frutose-1,6-difosfato a diidroxiacetona-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato: A reação catalisada pela enzima *frutose-difosfato-aldolase* é uma condensação aldólica reversível. Esta reação envolve a clivagem da frutose-1,6-difosfato entre os C 3 e C 4 para formar duas trioses-fosfato diferentes. Embora a energia livre padrão desta reação seja acentuadamente positiva (5,73 Kcal/mol), sob condições intracelulares esta reação se processa facilmente da esquerda para direita. Em uma reação onde um reagente forma dois produtos, o equilíbrio é fortemente influenciado pela concentração dos compostos envolvidos.

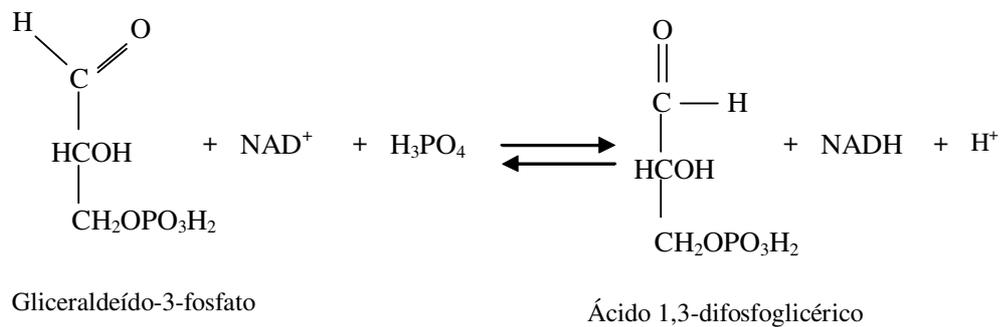


Interconversão das trioses-fosfatos: A próxima fase na sequência é a oxidação do gliceraldeído-3-fosfato. Note que somente metade das moléculas de glicose foram convertidas em gliceraldeído-3-fosfato. Se as células forem incapazes de converter dihidroxiacetona-fosfato em gliceraldeído-3-fosfato, metade das moléculas de glicose ficarão acumuladas na célula como cetose-fosfato ou estarão disponíveis para outras reações. A enzima triose-fosfato-isomerase catalisa esta reação.

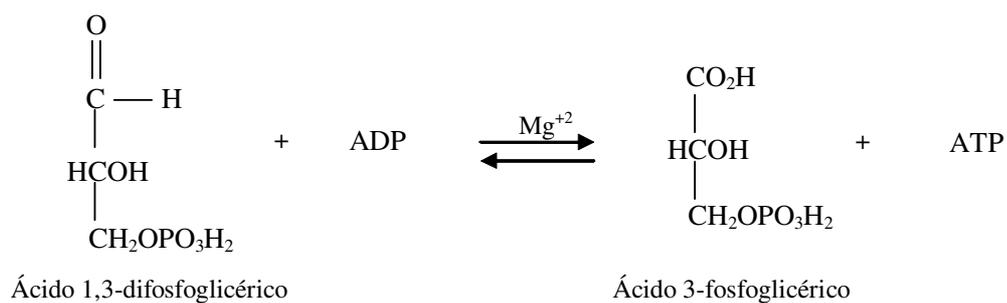


Esta reação finaliza a primeira fase da glicólise, onde a molécula de glicose foi preparada para a segunda fase. A próxima fase compreende as etapas de oxido-redução e fosforilação, onde ATP é formado a partir de ADP. Uma molécula de glicose forma duas de gliceraldeído-3-fosfato, sendo que ambas seguem o mesmo percurso.

Oxidação do gliceraldeído-3-fosfato a ácido 1,3-difosfoglicérico: Esta reação que é a primeira em produção de energia, é também a primeira reação que envolve óxido-redução. É também a primeira reação em que é formado um composto fosfatado de alta energia. Na oxidação de um grupo aldeído para um ácido carboxílico, muito da energia que seria liberada na forma de calor é conservada na formação do grupo acil-fosfato do ácido 1,3-difosfoglicérico. O agente de oxidação envolvido é o NAD^+ . Esta reação é catalizada pela enzima *giceraldeído-3-fosfato desidrogenase*

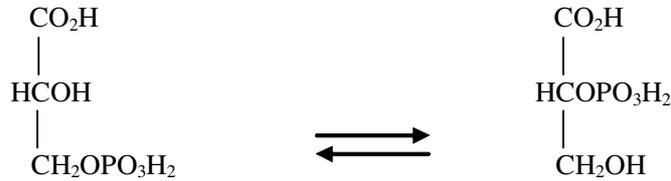


Transferência de fosfato do ácido 1,3-difosfoglicérico para o ADP: Esta reação completa a transferência do fosfato, do acil-fosfato formado na reação anterior, para o ADP e formar ATP. A enzima *fosfoglicerato-quinase* catalisa esta transferência.



Revisão Bibliográfica

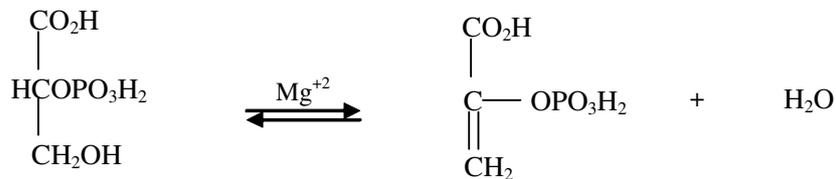
Conversão do ácido 3-fosfoglicérico a ácido 2-fosfoglicérico: Esta reação é catalisada pela enzima fosfogliceromutase. O Mg^{+2} é essencial para essa reação, que envolve a transferência do grupo de fosfato da posição 3 para posição 2 do ácido glicérico. Esta reação, na célula, é livremente reversível.



Ácido 3-fosfoglicérico

Ácido 2-fosfoglicérico

Desidratação do ácido 2-fosfoglicérico a ácido fosfoenolpirúvico: Esta é a segunda reação no qual se forma um composto de fosfato altamente energético, o ácido fosfoenolpirúvico. O ácido fosfoenolpirúvico é um composto com um grupo enólico fosfato altamente energético. A reação é catalisada pela *enolase*. Esta reação tem uma dependência absoluta de um cátion bivalente (Mg^{+2} ou Mn^{+2}) para formar um complexo com a enzima antes que o substrato se ligue. A enzima é inibida intensamente pelo fluoreto, especialmente se houver fosfato, sendo a espécie inibidora o íon fosfofluoridrato que forma um complexo com o Mg^{+2} .

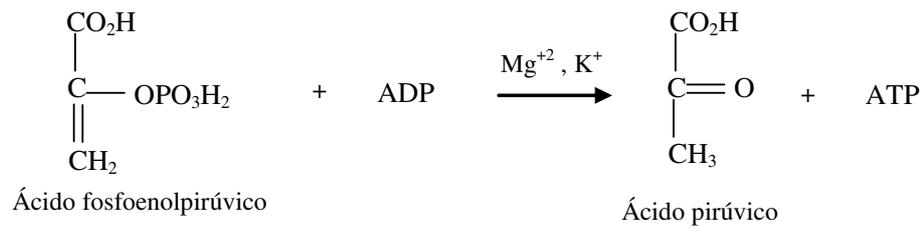


Ácido 2-fosfoglicérico

Ácido fosfoenolpirúvico

Transferência do fosfato do ácido fosfoenolpirúvico para o ADP: A enzima piruvato-quinase catalisa a transferência do grupo fosfato do ácido fosfoenolpirúvico para o ADP produzindo ATP e ácido pirúvico. A reação é altamente exotérmica e é essencialmente irreversível nas condições intracelulares. A enzima requer Mg^{+2} ou Mn^{+2} para formar um complexo antes de ligar-se ao substrato. O Ca^{+2} compete com estes cátions bivalentes (Mg^{+2} ou Mn^{+2}) e forma um complexo inativo. A enzima também requer um cátion metálico alcalino, que pode ser K^+ , Rb^+ ou Cs^+ , onde o K^+ é o ativador fisiológico. Acredita-se que o K^+

provoque uma modificação conformacional na enzima tornando-a mais ativa. A enzima é inibida quando a concentração de ATP na célula for elevada ou quando existe outros combustíveis tais como ácidos graxos, citrato, acetil-CoA ou alanina. Ela é ativa quando houver um acúmulo dos intermediários precedentes da glicólise, particularmente a frutose-1,6-difosfato e o fosfoenolpiruvato.



Descarboxilação do ácido pirúvico a acetaldeído e CO₂: Nesta etapa o ácido pirúvico é descarboxilado a acetaldeído e CO₂ pela enzima *piruvato-descarboxilase*. Esta reação é irreversível. A enzima requer Mg⁺² e possui uma coenzima ligada firmemente, a *tiamina-pirofosfato*. A descarboxilação do piruvato se processa através de uma série de intermediários ligados covalentemente à tiamina-pirofosfato (Figura 3).

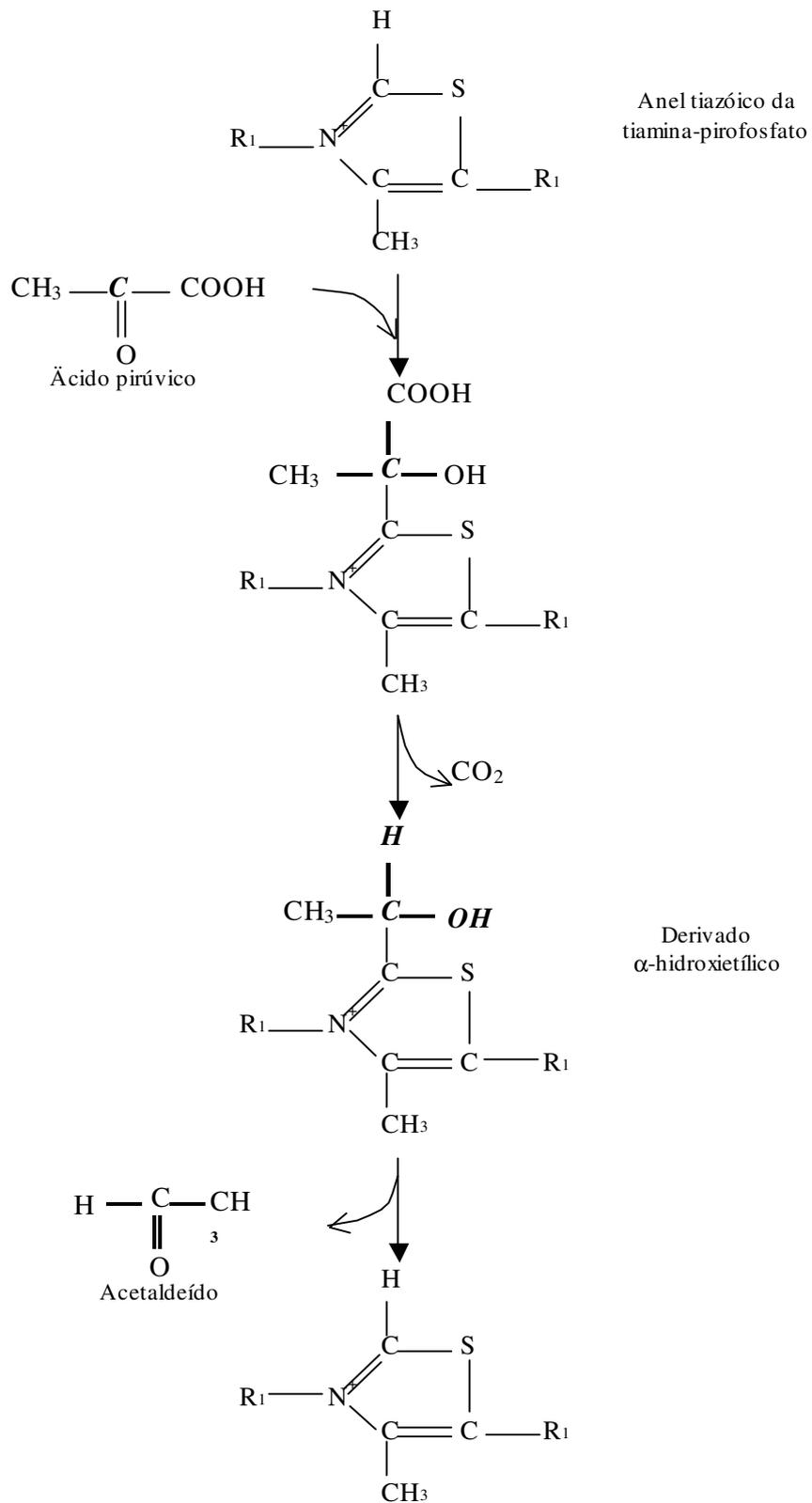
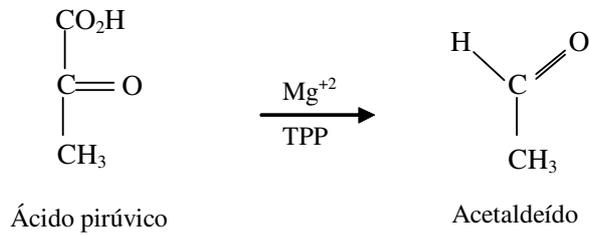
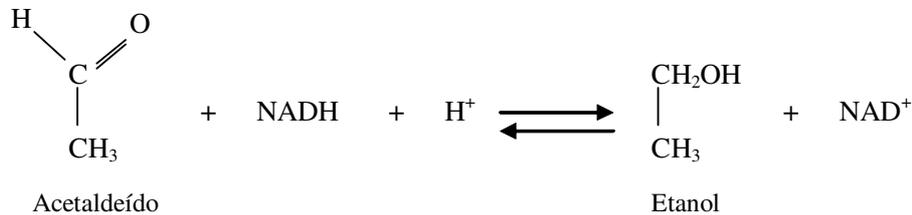


Figura 3: Etapas da descarboxilação do ácido pirúvico

Resumidamente, temos:



Redução do acetaldeído a etanol: Na reação final da fermentação alcoólica, o acetaldeído é reduzido a etanol pelo NADH na presença da enzima *álcool-desidrogenase*.



b) Oxidação monofosfato ou Via HMP (desvio hexose-monofosfato ou via do fosfogluconato)

Muitos organismos que metabolizam glicose via EMP podem também metabolizá-la pela via monofosfato. A função primária da via HMP no metabolismo microbiano é produzir redutores potentes como NADPH, necessários no desenvolvimento da biossíntese. A segunda função é de converter hexoses em pentoses, particularmente a D-ribose-5-fosfato necessária na síntese dos ácidos nucleicos. Uma terceira função é a degradação oxidativa completa das pentoses pela conversão a hexoses, que então podem entrar na sequência glicolítica.(LEHNINGER, 1976).

A via do fosfogluconato contém duas reações capazes de produzir o redutor NADPH. Esta também pode produzir diferentes açúcares fosfatados (CONN, *et al.* 1987).

A seguir tem-se o esquema geral, segundo REHM & REED (1981), do metabolismo da glicose via HMP.

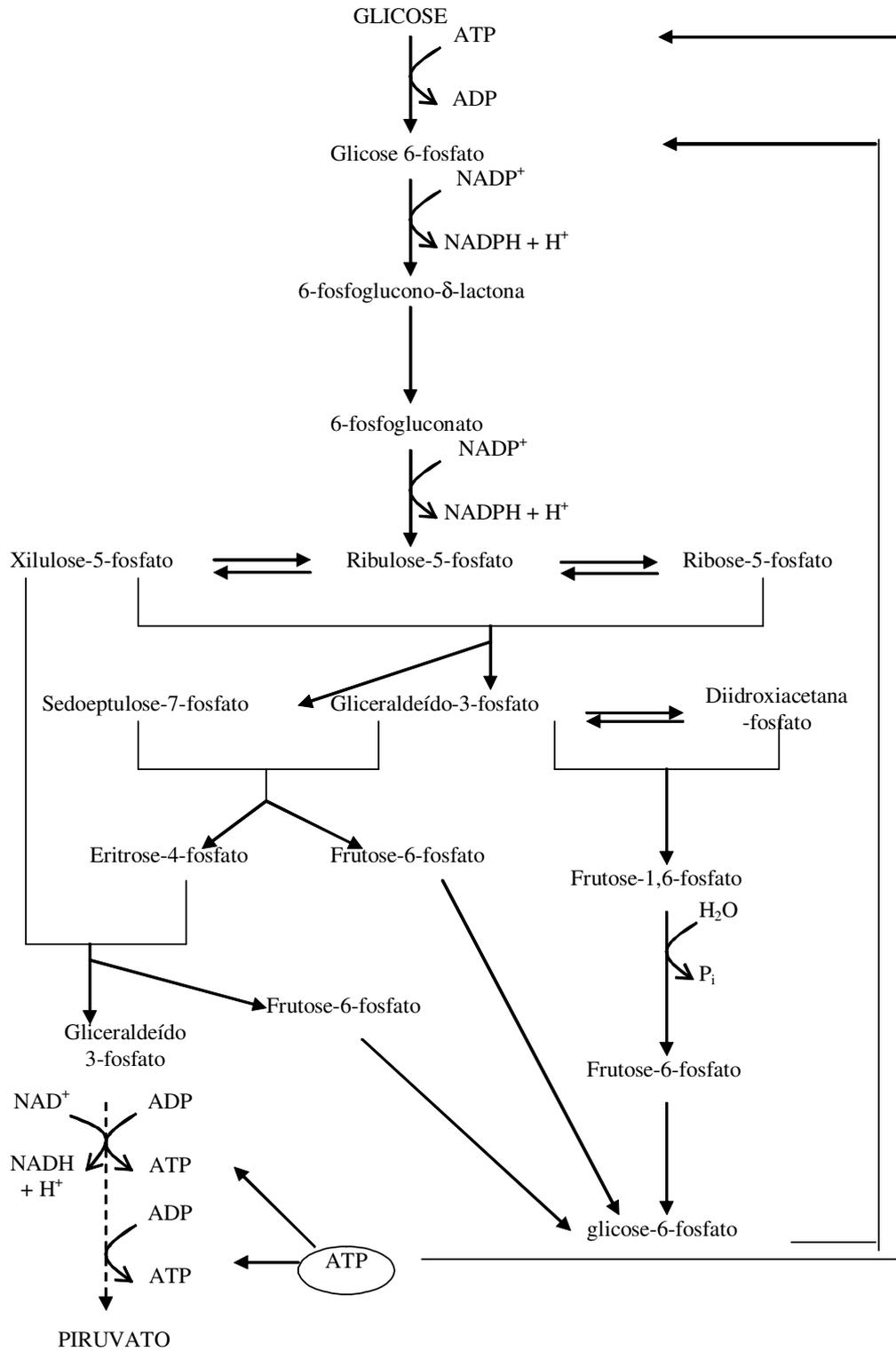


Figura 4: Degradação da glicose via HMP

A primeira reação da via HMP (Figura 4) é a desidrogenação enzimática da glicose-6-fosfato para formar 6-fosfogluconato pela *glucose-6-fosfato-desidrogenase*, produzindo NADPH. Esta enzima produz a 6-fosfoglucono- δ -lactona, que é hidrolizada pela enzima *lactonase*, formando 6-fosfogluconato. Na etapa seguinte, o 6-fosfogluconato sofre oxidação e descarboxilação pela *6-fosfogluconato-desidrogenase*, uma enzima dependente de Mg^{+2} , para formar ribulose-5-fosfato, uma reação que produz a segunda molécula de NADPH. Pela ação da *ribose-fosfato-isomerase* a ribulose-5-fosfato é transformada reversivelmente em ribose-5-fosfato. O metabolismo pode terminar neste ponto e o resultado líquido é a formação de NADPH para as reações biossintéticas e a produção de ribose-5-fosfato como um precursor para a síntese de nucleotídeos. No entanto, pela ação de três enzimas adicionais, *ribulose-fosfato-3-epimerase*, *transcetolase* e *transaldolase*, o metabolismo pode continuar e as pentoses-5-fosfato podem sofrer outras transformações. A *ribulose-fosfato-3-epimerase* catalisa a conversão de ribulose-5-fosfato em xilulose-5-fosfato. A *transcetolase* faz a transferência de um grupo de glicaldeído da xilulose-5-fosfato para a ribose-5-fosfato formando sedoepitulose-7-fosfato (7 carbonos) e gliceraldeído-3-fosfato (3 carbonos). A *transaldolase* age sobre os produtos da *transcetolase* –um açúcar de 7 carbonos e um de três carbonos-, transformando-os em açúcares de 6 e 4 carbonos, frutose-6-fosfato e eritrose-4-fosfato. As reações da *transcetolase* e *transaldolase* suprem não apenas a conversão das pentoses a hexoses para a subsequente degradação pela glicólise e pelo ciclo TCA, como também torna possível, com o auxílio de enzimas da sequência glicolítica, a interconversão dos açúcares de três, quatro, cinco, seis e sete carbonos. A *transcetolase* pode catalisar outra reação, transformando a xilulose-5-fosfato e eritrose-4-fosfato em frutose-5-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, ou seja, dois intermediários da via do fosfogluconato podem ser convertidos em dois intermediários da via glicolítica (LEHNINGER, 1976).

Assim uma variedade de reações pode ocorrer pela ação de enzimas da via do fosfogluconato (HMP), as quais agem independentemente ou relacionadas com as enzimas da via glicolítica. O metabolismo da glicose via HMP é, portanto, não um caminho que leva a um único produto final, mas um conjunto de percursos

divergentes capazes de grande flexibilidade metabólica (LEHNINGER, 1976).

A via HMP está fortemente relacionada com o metabolismo biossintético. Esta via também é importante visto que tem ligação com a via EMP, e assim a célula deve regular a quantidade de glicose metabolizada por cada uma das vias (REHM & REED, 1981).

A direção do fluxo e o percurso tomado pela glicose-6-fosfato após entrar nas vias do fosfogluconato são determinados largamente pelas necessidades relativas da célula pelo NADHP e pela ribose-5-fosfato (LEHNINGER, 1976).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, durante a fermentação, o nível de glicose-6-fosfato desidrogenase é muito baixo e é provável que muito das necessidades da levedura por pentose venham da ação da *transquetolase* sobre a frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato produzido pela via EMP (PRIEST & CAMPBELL, 1999).

c) Ciclo do ácido tricarbóxico

Vários intermediários da via EMP são usados pela célula em reações biossintéticas. Entretanto, para o crescimento celular mais intermediários são necessários do que a via EMP pode suprir. No processo de respiração das leveduras (que ocorre na presença de oxigênio), o ciclo de Krebs (ciclo do ácido tricarbóxico) é usado para suprir substratos adicionais para a biossíntese. Sob as condições anaeróbicas da fermentação, os níveis de enzimas do ciclo de Krebs são bem menores e como o ciclo opera nestas condições não é clara. A questão é como as células sintetizam intermediários essenciais como ácido succínico, o ácido 2-oxoglutárico e o ácido oxalacético. Dois mecanismos têm sido propostos: o primeiro considera uma operação limitada do ciclo do ácido tricarbóxico com a formação de succinato, fumarato, malato e oxalacetato por um processo oxidativo (OURA, 1977); o segundo, envolve a síntese de enzimas adicionais levando à formação de succinato por uma via redutiva (SOLS *et al.*, 1971). Neste segundo mecanismo é proposto que o ciclo de Krebs é inoperante por causa da falta de enzima 2-oxoglutatarato desidrogenase (PRIEST & CAMPBELL, 1999).

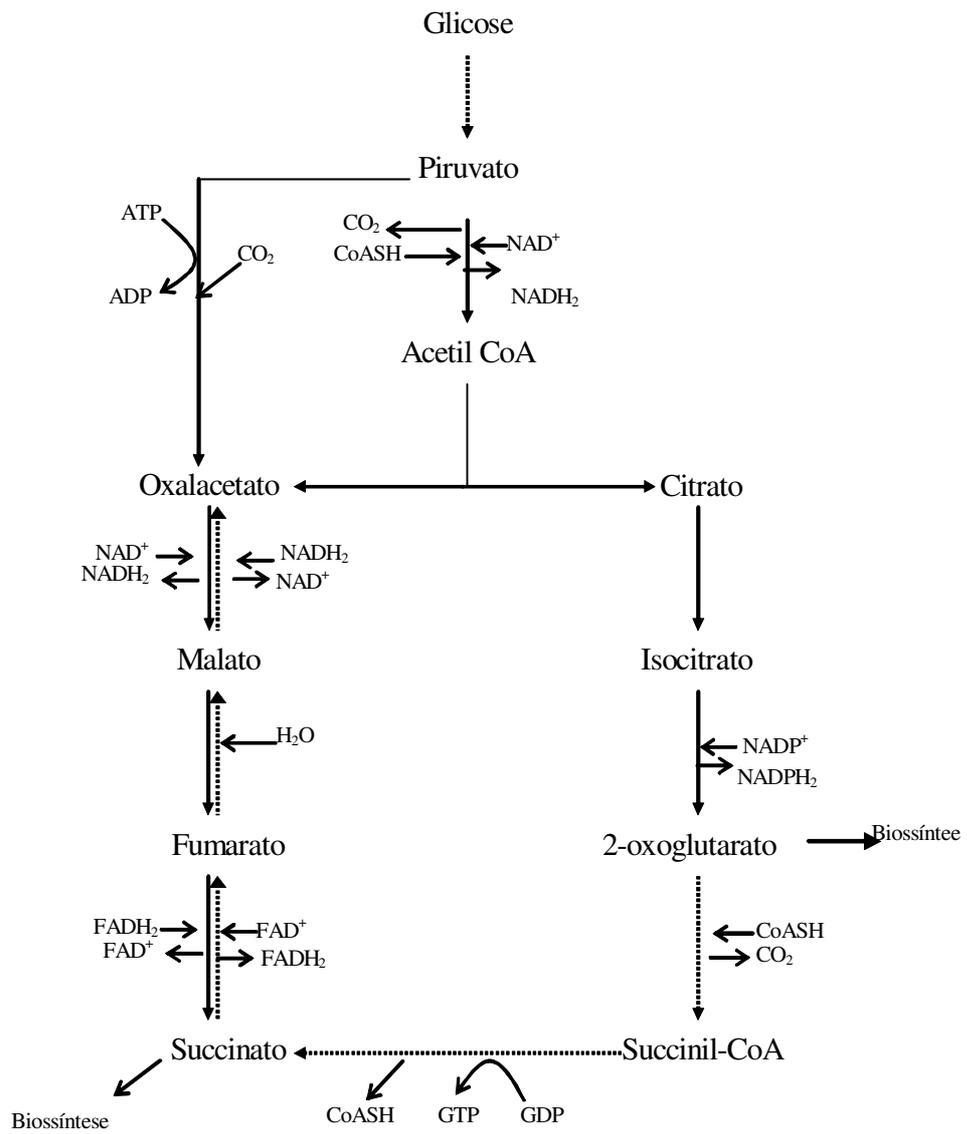


Figura 5 :Ciclo do Ácido Tricarboxílico (PRIEST & CAMPBELL,1999).

2.2) MODELO MATEMÁTICO NÃO ESTRUTURADO

A transformação dos açúcares redutores (sacarose) em etanol é realizada pela *Saccharomyces cerevisiae* envolvendo um grande número de ações enzimáticas.

Uma modelagem cinética não estruturada muito utilizada é o sugerido por *Lee et al. (1983)* o qual se mostrou adequado através de testes realizados em unidades industriais de fermentação alcoólica (*ANDRIETTA & MAUGERI, 1994*). Na sua forma algébrica pode ser escrito como:

$$\mu = \mu_{\max} G_S G_P G_X \quad (2.2.1)$$

Sendo este um modelo derivado do modelo de '**Monod**', sua aplicação também fica restrita aos casos onde se assume crescimento balanceado sendo portanto aplicável a processos contínuos de fermentação alcoólica no estado estacionário, ou então com dinâmica relativamente lenta, como é o caso dos processos fermentativos em geral. Sobre o modelo de **Monod**, citado acima, para uma literatura básica indica-se *BAILEY & OLLIS (1986)*.

Identificando os termos de limitação e inibição do modelo utilizado, tem-se as definições:

$$G_S = \frac{S}{S + K_s} \quad \text{Termo de limitação pela concentração do substrato} \quad (2.2.2)$$

$$G_P = \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n \quad \text{Termo de inibição pelo produto} \quad (2.2.3)$$

$$G_X = \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)^m \quad \text{Termo de inibição pela concentração microbiana.} \quad (3.2.4)$$

μ_{\max} - Velocidade específica máxima do crescimento celular

O acoplamento destes termos torna o valor da velocidade específica menor que o valor máximo, pois estes são termos de inibição, e restringem o valor de μ com relação ao valor de μ_{\max} .

Com relação aos valores máximos de P_{\max} e de μ_{\max} , as restrições são as seguintes:

- Abaixo de uma temperatura crítica superior, P_{\max} é constante e igual ao correspondente à temperatura crítica superior;
- Acima desta temperatura crítica superior, o valor de P_{\max} decresce exponencialmente segundo a equação:

$$P_{\max} = K_0 e^{aT} \quad (2.2.5)$$

Segundo *Andrietta e Maugeri (1994)* a temperatura crítica superior esta próxima de 32°C.

- Com relação à velocidade específica máxima μ_{\max} , esta também é afetada pela temperatura e segue a equação de Arrhenius, ou seja:

$$\mu_{\max} = A e^{\left(-\frac{E}{RT}\right)} \quad (2.2.6)$$

Aplicando estas equações para as variações de substrato, células (levedura) e etanol, tem-se, por definição:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (2.2.7)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (2.2.8)$$

Substituindo a equação (2.2.8) na equação (2.2.1), tem-se a equação (2.2.9), que descreve a variação de células com o tempo:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X \left(\frac{S}{S + K_S} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)^n \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right)^m \quad (2.2.9)$$

Por definição $Y_{X/S}$ relaciona a variação da concentração de células com as de substrato:

$$Y_{X/S} = \frac{dX/dt}{dS/dt} \quad (2.2.10)$$

As equações de taxa para a concentração de substrato, são:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} \quad (2.2.11)$$

ou

$$r_s = -\frac{dS}{dt} = \frac{\mu_{\max} X}{Y_{X/S}} \left(\frac{S}{S + K_s} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)^n \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right)^m \quad (2.2.12)$$

ou ainda,

$$r_s = \frac{1}{Y_{X/S}} \mu X \quad (2.2.13)$$

Analogamente, $Y_{P/S}$ relaciona a variação do produto etanol com a de substrato:

$$Y_{P/S} = \frac{dP/dt}{dS/dt} \quad (2.2.14)$$

obtendo também uma expressão para a velocidade de formação de etanol:

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/S} \frac{dS}{dt} \quad (2.2.15)$$

ou

$$r_p = \frac{dP}{dt} = \frac{\mu_{\max} X}{Y_{X/S}} \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \left(\frac{S}{S + K_s} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)^n \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right)^m \quad (2.2.16)$$

ou ainda,

$$r_p = \frac{Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \mu X \quad (2.2.17)$$

O modelo apresentado neste capítulo é do tipo não estruturado, conforme será visto na seção posterior, não sendo adequado para descrever o

comportamento dinâmico do processo segundo *Dunn e Mor (1981)*, devido a alterações resultantes de qualquer mudança dinâmica no meio.

2.3) MODELOS ESTRUTURADOS E NÃO-ESTRUTURADOS

Modelos descrevendo a cinética microbiana podem ser divididos em dois grandes grupos: modelos estruturados e não estruturados. A mais simples cinética microbiana é designada como um modelo não estruturado e descreve o crescimento de biomassa, consumo de substrato e formação produtos metabólicos. Os modelos não estruturados incluem as observações mais fundamentais sobre processos de crescimento microbiano: a taxa de produção de massa celular é proporcional a concentração de biomassa, há um limite para a taxa de crescimento em cada substrato, e as células precisam de substrato e podem sintetizar produtos quando não crescem (MONTESINOS *et al*, 1995).

Estes mesmos autores citam que estes modelos não reconhecem qualquer estrutura interna das células, nem a diversidade entre as formas celulares. Estes modelos são satisfatórios em muitas situações, como quando a condição de crescimento balanceado é realizado, ou em muitos problemas de controle e otimização em processos de fermentação com complexidade matemática mínima. Entretanto, eles não são apropriados para descrever situações onde a composição celular e/ou a morfologia da cultura celular são variáveis importantes, e são profundamente variáveis no tempo. A solução é desenvolver um modelo estruturado que inclui aspectos da fisiologia microbiana e estrutura a descrição matemática do metabolismo do microrganismo. Alguns autores enfatizam os modelos estruturados simples contra os modelos altamente estruturados. Modelos com alto grau de complexidade não são recomendados, a menos que estritamente necessário. Assim, uma completa descrição metabólica da cinética microbiana pode não ser necessária, e fenômenos de excreção junto com algumas concentrações intracelulares podem ser suficientes para descrever corretamente a dinâmica do processo.

Segundo HARDER & ROELS (1982), um grande número de variáveis composicionais podem ser atribuídos à biomassa. A classe dos modelos potencialmente útil é formada por uma simples extensão da aproximação não

estruturada, nos quais a quantidade e as propriedades da biomassa são especificadas por duas ou três variáveis. Estes são chamados de modelos de dois ou três compartimentos. Eles combinam uma descrição melhor do comportamento do sistema com complexidade matemática razoável e um número suficiente de parâmetros para permitir a verificação experimental.

2.4) MODELOS COMPARTIMENTAIS

Em modelos estruturados simples a biomassa é dividida em compartimentos. Os componentes celulares com função similar serão colocados no mesmo compartimento (NIELSEN & VILLADSEN, 1992).

Recentes estudos incluem a estrutura na descrição da biomassa, baseando-se na distinção de duas seções. Uma aproximação distingue entre uma seção, responsável pela síntese de macromoléculas celulares e uma seção estrutural contendo macromoléculas necessárias para o funcionamento da maquinaria celular. O primeiro compartimento consiste de RNA e moléculas precursoras e a segunda de proteínas e DNA (HARDER & ROELS, 1982). Os modelos de WILLIAMS (1967 e 1975) e RAMKRISMA et al. (1967), STREMEL (2001) são baseados nesta distinção.

Estes mesmos autores descrevem um modelo típico de dois compartimentos, onde se considera uma cultura em que o microrganismo cresce em uma única fonte de carbono e energia. O microrganismo é constituído de dois compartimentos: compartimento G contém enzimas que convertem o substrato em vários blocos de macromoléculas da célula. O compartimento K contém o remanescente da célula; material de armazenamento, material genético, RNA e precursores.

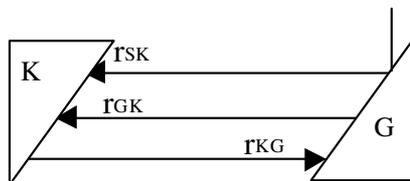


Figura 6 - Representação esquemática de um modelo de dois compartimentos, onde r_{SK} é a taxa de conversão do substrato para o compartimento K; r_{KG} é a taxa

de conversão do compartimento K para o compartimento G e r_{GK} é a taxa de depolimerização do compartimento G para o compartimento K

2.5) CONSTRUÇÃO DE MODELOS ESTRUTURADOS

Segundo HARDER & ROELS (1982), considerando uma cultura de microrganismos, a concentração de biomassa presente na cultura é C_x . O estado da cultura é definido por um vetor estado C que engloba a concentração de compostos nas fases bióticas e abióticas

Dividindo o vetor estado C em partes bióticas e abióticas, tem-se:

$$C = \{x, y\} \quad (2.5.1)$$

O vetor estado abiótico, y , engloba a concentração de k compostos que não são parte da biomassa. O vetor estado, x , engloba a concentração de n compostos que são parte da biomassa.

Estes mesmos autores citam que componentes presentes em ambas as fases são identificadas por números distintos nos vetores estado. Os compostos especificados para o vetor estado x , levam em consideração toda a biomassa da matéria seca que, no entanto, não implica necessariamente a especificação da concentração de cada componente da biomassa separadamente. Os elementos de x também podem se referir a grupos de compostos. Nesta condição tem-se a seguinte relação:

$$C_x = \sum_{i=1}^n x_i \quad (2.5.2)$$

As concentrações bióticas (Concentração de compostos celulares) são melhor expressas como fração mássica da massa celular, a chamada concentração intrínseca. Então o vetor w das concentrações intrínsecas deve ser definido.

Os elementos, w_i , do vetor são dados por:

$$w_i = x_i / C_x \quad (2.5.3)$$

Em uma cultura de volume constante, a concentração dos vários compostos presentes pode ser tratada como quantidades extensivas e sua taxa de mudança

pode ser obtida através de equações de balanço:

$$\textit{Acúmulo no sistema} = \textit{Conversão} + \textit{Transporte}$$

Duas fontes contribuem para o acúmulo de um componente no sistema. Estes são transporte do componente para o sistema e produção daquele componente no sistema. Em notação vetorial, pode-se representar como:

$$\dot{\mathbf{C}} = \mathbf{r}_A + \boldsymbol{\phi} \quad (2.5.4)$$

Nesta equação \mathbf{r}_A é o vetor de taxas líquidas de produção de cada componente na reação no sistema. $\boldsymbol{\phi}$ é o vetor de taxas de transporte destes componentes para o sistema. As reações internas do sistema são agora caracterizadas pelo vetor \mathbf{r} de m reações independentes ocorrendo no sistema. A taxa líquida de formação de cada componente é dada por:

$$\mathbf{r}_A = \mathbf{r} \boldsymbol{\alpha} \quad (2.5.5)$$

A equação (2.5.5) define a matriz estequiométrica, $\boldsymbol{\alpha}$, como uma matriz $m \times p$ (p é a dimensionalidade do vetor \mathbf{C}). Nesta matrix, o elemento α_{ij} fornece a quantidade de componentes j produzida na i -ésima reação.

Expressões análogas às equações (2.5.4) e (2.5.5) podem ser formuladas para as taxas de mudanças dos vetores estado abiótico e biótico:

$$\dot{\mathbf{y}} = \mathbf{r} \boldsymbol{\alpha}_y + \boldsymbol{\phi}_y \quad (2.5.6)$$

$$\dot{\mathbf{x}} = \mathbf{r} \boldsymbol{\alpha}_x + \boldsymbol{\phi}_x \quad (2.5.7)$$

Nas equações (2.5.6) e (2.5.7) $\boldsymbol{\alpha}_y$ e $\boldsymbol{\alpha}_x$ são matrizes estequiométricas para os componentes abióticos e bióticos; $\boldsymbol{\phi}_y$ e $\boldsymbol{\phi}_x$ são os vetores de taxas de transporte para os componentes bióticos e abióticos. A equação (2.5.7) pode ser usada para descrever a dinâmica do vetor estado abiótico. A equação de balanço para o vetor estado biótico apresenta problemas. Primeiramente, uma equação para $\boldsymbol{\phi}_x$ deve ser formulada, com o vetor estado \mathbf{x} referindo-se à células intactas. Isto exclui a possibilidade de remoção ou adição de células de uma outra composição que não seja a da população média. Assim tem-se a seguinte equação:

$$\dot{\phi}_x = \phi_x \mathbf{w} \quad (2.5.8)$$

onde ϕ_x é um escalar representando a taxa de transporte de biomassa para o sistema, expresso por unidade de volume do sistema. Segundo, as equações cinéticas são, até que os componentes bióticos sejam considerados, melhor expressas em termos de concentrações intrínsecas, isto é, em termos do vetor \mathbf{w} . Uma formulação direta de um balanço para o vetor estado biótico é, entretanto, prejudicada pelo fato que, mesmo se o volume do sistema for constante, as variáveis intrínsecas não são quantidades extensivas. Contudo é possível formular uma expressão para a dinâmica do vetor estado intrínseco a partir da equação (2.5.7). Inserindo as equações (2.5.3) e (2.5.8) tem-se:

$$(\dot{\mathbf{w}} C_x) = \mathbf{r} \alpha_x + \phi_x \mathbf{w} \quad (2.5.9)$$

Diferenciando o lado esquerdo da equação (2.5.9) tem-se:

$$C_x \dot{\mathbf{w}} + \mathbf{w} \dot{C}_x = \mathbf{r} \alpha_x + \phi_x \mathbf{w} \quad (2.5.10)$$

Se adicionar n componentes na equação vetorial (2.5.10), tem-se:

$$C_x \sum_{i=1}^n \dot{w}_i + \dot{C}_x \sum_{i=1}^n w_i = (\mathbf{r} \alpha_x \mathbf{1}) + \phi_x \sum_{i=1}^n w_i \quad (2.5.11)$$

Nesta equação $\mathbf{1}$ é um vetor coluna de dimensão n. A matriz produto $(r \alpha_x \mathbf{1})$ na equação (2.5.11) é igual à taxa líquida de crescimento, r_x , da quantidade total da massa seca. Como a soma de todos n elementos do vetor \mathbf{w} é igual a unidade, e a soma das derivadas em relação ao tempo dos n elementos de \mathbf{w} é igual a zero, a equação (2.5.11) pode ser escrita:

$$\dot{C}_x = r_x + \phi_x \quad (2.5.12)$$

Substituindo a equação (2.5.12) na equação (2.5.10), a seguinte equação para a dinâmica de \mathbf{w} é obtida:

$$\dot{\mathbf{w}} = (\mathbf{r} \alpha_x - \mathbf{w} r_x) / C_x \quad (2.5.13)$$

As equações (2.5.6), (2.4.12) e (2.5.13), juntamente com um conjunto de equações para as taxas de reações r e equações para ϕ_x e ϕ_y , formam um modelo

estruturado contínuo em que componentes bióticos são tratados em termos de concentrações intrínsecas. A equação (2.5.13) mostra que na equação estado para o vetor estado biótico intrínseco \mathbf{w} , um termo $\mathbf{w}r_x$ aparece. Este leva em conta a diluição dos componentes bióticos pelo aumento na quantidade total de biomassa. A omissão deste termo na formulação de uma equação para a dinâmica do vetor estado biótico é uma importante fonte de erro em modelos estruturados contínuos.

2.6) EVOLUÇÃO DOS MODELOS ESTRUTURADOS

WILLIAMS (1967) em BAYLEY & OLLIS (1986) mostra um modelo bicompartimental o qual reproduz adequadamente vários aspectos da dinâmica de crescimento. O modelo foi corrigido para levar em conta os aspectos da concentração dos componentes intracelulares devido à diluição da biomassa. Os principais postulados deste modelo são:

- 1- A porção sintética (1) é produzida pelo consumo de nutriente externo S com coeficiente de rendimento Y. A taxa de formação do componente sintético é de primeira ordem com relação a densidade celular x (massa de célula/volume de cultura).
- 2- O componente celular genético estrutural é produzido do componente (1) a uma taxa proporcional a ρ_1 . ρ_2 (ρ_i = massa i/unidade de volume de células).
- 3- Dobrando o componente (2) é suficiente e necessário para a divisão celular. Desta forma, a densidade do número de células é proporcional à densidade do componente (2) na cultura.
- 4- A biomassa é constituída somente dos componentes (1) e (2).

Para um bioreator batelada, o modelo é:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y}k_1sx \quad (2.6.1)$$

$$\frac{dX}{dt} = k_1sx \quad (2.6.2)$$

$$\frac{d\rho_1}{dt} = k_1s(\rho_1 + \rho_2) - k_2\rho_1\rho_2 - \mu\rho_1 \quad (2.6.3)$$

$$\frac{d\rho_2}{dt} = k_2\rho_1\rho_2 - \mu\rho_2 \quad (2.6.4)$$

Note que:

$$\mu = k_1s \quad e \quad \rho_1 - \rho_2 = \rho_c = const. \quad (2.6.5)$$

A equação (2.6.4) pode ser escrita como:

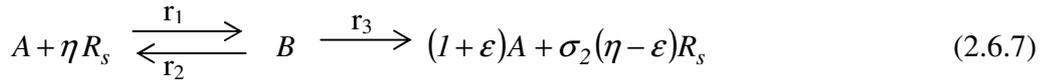
$$\frac{df_2}{dt} = -k_1sf_2 + (k_2\rho_c)f_2(1 - f_2) \quad (2.6.6)$$

onde f_2 é $\frac{\rho_2}{\rho_c}$, a fração de massa celular composta do componente (2).

Este modelo foi usado para simular crescimento em batelada usando um inóculo em nutriente exausto, que corresponde a $\rho_1 = 0$.

VERHOFF & SUNDARESAN (1972) empregaram expressões empíricas, especialmente a de Monod para descrever o crescimento microbiano na limitação de substrato. O crescimento é admitido ocorrer através de um mecanismo envolvendo transferência de massa, assimilação, ingestão e processo de divisão. O processo de assimilação é assumido ser limitante pelo substrato e somente depende das concentrações das taxas de reações internas.

O processo pode ser representado na forma estequiométrica:



Este simbolismo mostra que uma célula viável A , após a divisão, combina-se com η quantidades de substrato necessário, R_s , para formar uma célula de ingestão B . Uma unidade de B pode sofrer dois processos: reverter a forma original de A e ηR_s ou ingerir o substrato e produzir $(1 + \varepsilon)$ unidades de A liberando nutrientes. Esta ingestão pode ser acompanhada divisão. Se a divisão celular sempre acompanha ingestão, como é provavelmente o caso com algumas bactérias, então ε é aproximadamente igual a 1. Durante a ingestão alguns dos substratos podem retornar ao meio para o uso novamente de outras células, desta forma $\sigma_2(\eta - \varepsilon)$ representa a massa de substrato retornado ao meio.

A seguinte equação foi desenvolvida para o crescimento microbiano em função do substrato limitante:

$$\frac{\mu}{k_3 \varepsilon} = -\left(\frac{k_1 S}{2k_3 \varepsilon} + \frac{k_2 + k_3}{2k_3 \varepsilon}\right) + \left[\left(\frac{k_1 S}{2k_3 \varepsilon} + \frac{k_2 + k_3}{2k_3 \varepsilon}\right)^2 + \frac{k_1 S}{2k_3 \varepsilon}\right]^{1/2} \quad (2.6.8)$$

Sob certas limitações esta expressão pode ser reduzida à equação de Monod. Este mecanismo foi aplicado à culturas contínuas e bateladas, e os resultados obtidos são comparados quantitativamente com experimentos. No caso contínuo, o mecanismo prediz muito das dependências empregadas. No caso batelada o mecanismo prediz todas as 4 fases do crescimento celular.

FREDERICKSON (1976) trabalhou com modelo estruturado de crescimento, quimicamente estruturado, segundo o qual emprega dois processos:

- 1- Balanços de massa para os vários componentes do material sobre um sistema escolhido,
- 2- Postulando a existência de reações cinéticas ocorrendo dentro do material e suas fronteiras.

Tomando $m(t)$ como a massa do sistema no tempo t , \hat{V} o volume de biomaterial por unidade de massa é assumido constante e $c_j(t)$ a massa do j éximo componente do material por unidade de volume do material no tempo t , então $m(t) \hat{V} c_j(t)$ é a massa do j éximo no sistema no tempo t , e a taxa da variação desta quantidade deve ser a taxa líquida de aparecimento dentro do sistema do componente para todo processo ocorrendo dentro do sistema e nas suas fronteiras com a porção das fase biótica da cultura.

A taxa de reação por volume de material no qual o j éximo componente aparece devido a ocorrência de j éximo processo é r_{ij} . O termo r_{ij} inclui a contribuição não somente de reação intracelulares, mas também das trocas de espécies com o meio biótico adjacente. O balanço de massa para o j éximo componente do biomaterial então é:

$$\frac{d}{dt} (m(t) \hat{V} c_{ij}) = m \hat{V} \sum_i r_{ij} \quad (2.6.9)$$

$$\frac{d}{dt}(c_{ij}) = \sum_i r_{ij} - \mu c_j \quad (2.6.10)$$

onde,

$$\mu = \frac{1}{m} \frac{dm}{dt} \quad (2.6.11)$$

é a taxa específica de crescimento do material, é a taxa líquida da produção de biomassa pela quantidade de biomassa já presente. A taxa específica de crescimento, para a hipótese de \hat{V} constante e as definições de c_j como massa por unidade de biomaterial, obtém-se que:

$$\mu = \hat{V} \sum_i \sum_j r_{ij} \quad (2.6.12)$$

Segundo FREDRICKSON (1976), a presença do termo $-\mu c_j$ no lado direito da equação (2.6.10) é essencial. Ela representa a diluição de componentes celulares provocadas pelo crescimento de biomassa. É um termo que tem sido incorretamente omitido em um grande número de publicações sobre modelos estruturados. A equação (2.6.10) (há uma equação para cada componente no qual o biomaterial é dividido) é uma equação com balanço apropriado para modelos quimicamente estruturados. É válida para culturas na qual não ocorrem misturas de materiais de diferentes estados. Assim, é válida para tanques perfeitamente agitados, com reciclo e para reatores tubulares com escoamento próximo ao "plug flow". Não é válido para culturas com grau de agitação baixo, para reatores com dispersão axial, ou para segundo e terceiros estágios em reatores cascata, porque nestas situações o biomaterial do sistema está continuamente sendo misturado com biomaterial de diferentes estágios e a equação (2.6.10) não contém nenhum termo que leve em conta esta situação.

O segundo passo na formulação do modelo é a formulação de r_{ij} , que deve ser expresso em termos de variáveis intrínsecas, isto é concentrações celulares dos componentes do material (c_j) e concentrações de substâncias presentes no meio, adjacente às células. É legítimo escrever expressões para r_{ij} em termos de quantidades de componentes do biomaterial por unidade de volume de cultura,

Revisão Bibliográfica

mas tais expressões devem ser reduzíveis a equações contendo somente variáveis intrínsecas. Vários modelos estruturados contêm expressões que não são simplificáveis. Modelos estruturados podem ser representados por (2.6.10), com r_{ij} dependendo somente de variáveis intrínsecas, são os chamados modelos estruturados intrínsecos, significando que eles são intrínsecos para a fase biótica.

PAMMENT, HALL & BARFORD (1978) apresentaram um modelo determinístico de dois estágios, mecanístico, do crescimento aeróbio de *Saccharomyces cerevisiae*. O ciclo celular do microrganismo foi usado para sugerir a estrutura básica. O modelo representa o processo de consumo de substrato e conversão separadamente da replicação e divisão. A regulação da fração da cultura devotada a cada uma destas áreas do metabolismo e taxa global de crescimento está relacionada á natureza da disponibilidade do substrato energético. A simulação da respiração e glicólise é alcançada pela inclusão de duas rotas energéticas alternativas de produção. A regulação destas rotas é descrita em termos da regulação primária das proporções da cultura requerida para consumo de substrato, conversões e reações para cada rota. A regulação é ditada primariamente pelo crescimento em vez da natureza ou concentração do substrato. O modelo descreve com sucesso o crescimento em batelada e contínuo sob considerações de limitação de glicose e excesso de oxigênio. Um estudo preliminar indica que ajuste nos parâmetros relevantes permitirá ao modelo descrever o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*. em condições de limitações de oxigênio e excesso de glicose. São as seguintes hipóteses do modelo:

- 1- Segregado, matéria celular e meio de cultura formam um único sistema distribuído;
- 2- O substrato é fonte de carbono e energia, E denota etanol;
- 3- Biomassa consiste de duas partes A e B;
- 4- A parte A é responsável pelo consumo de substrato e produção de energia, B sintetiza célula e faz divisão;
- 5- O primeiro passo no processo sequencial de crescimento e divisão envolve a

acumulação de energia e outros metabólitos;

6- O segundo passo envolve os eventos levando á replicação de DNA e mitose. Assume-se que este processo é realizado por B e descritos pela conversão de B para A;

7- Todas as enzimas na rota fermentativa são agrupadas juntas e representadas como E_f . As enzimas da rota respiratória, denotadas E_r , são similarmente tratadas;

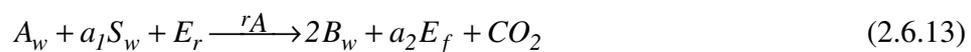
8- Dois modos de controle diferentes influenciam a produção de cada sistema enzimático. Primeiro, as enzimas são produzidas a taxas proporcionais ao fluxo metabólico através do sistema enzimático. Segundo, há uma produção adicional adaptativa de cada sistema enzimático a qual é proporcional a diferença entre a concentração e enzima existente em um valor "alvo" (e_f e e_r para fermentação e respiração, respectivamente). Os valores desejados (alvo) são proporcionais ao fluxo que ocorreriam se as concentrações de enzimas não fossem limitantes,

9- As taxas de glicólise e respiração são linearmente dependentes em e_f/e_F e e_r/e_R , respectivamente,

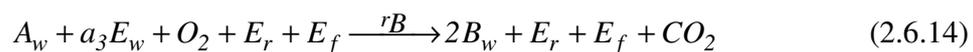
10- Enzimas glicolíticas são produzidas como uma consequência do fluxo através da rota respiratória.

Este ponto de vista do crescimento pode ser restabelecido pela seguinte estequiometria (w denota variável em unidade de massa, de outra forma unidades molares, são assumidos):

Fermentação:



Respiração:



Divisão:



O total; de biomassa é:

$$X = A_w + B_w \quad (2.6.16)$$

As taxas de reações r_A , r_B , r_C são dados por:

$$r_A = \frac{k_1 A_w S}{K_s + S} \left(\frac{e_f}{e_F} \right) \quad (2.6.17)$$

$$r_B = \frac{k_2 A_w E_w}{K_E + E_w} \left(\frac{e_r}{e_R} \right) \quad (2.6.18)$$

$$r_C = K B_w \quad (2.6.19)$$

Um balanço de massa resulta nas seguintes equações diferenciais:

$$\frac{dB_w}{dt} = 2r_A + 2r_B - r_C \quad (2.6.20)$$

$$\frac{dA_w}{dt} = r_A - r_B + r_C \quad (2.6.21)$$

$$\frac{dE}{dt} = a_2 r_A - a_3 r_B \quad (2.6.22)$$

$$\frac{dS}{dt} = -a_1 r_A \quad (2.6.23)$$

As enzimas de interesse são:

$$e_R = \frac{k_h k_2 A_w E_w}{K_E + E_w} \quad (2.6.24)$$

$$e_F = \frac{k_f k_1 A_w E S}{K_s + S} + \frac{k_7 k_2 A_w E}{K_E + E} \quad (2.6.25)$$

As taxas de enzimas respiratórias e fermentativas são:

$$\frac{de_f}{dt} = r_A + k_5 r_C + k_4 (e_F - e_f) \quad (2.6.26)$$

$$\frac{de_r}{dt} = r_B + k_6 (e_R - e_r) \quad (2.6.27)$$

Nestas equações e_r e e_f denotam atividade enzimática por unidade de

volume de cultura. Baseado em dados de simulações do modelo, valores para os parâmetros foram determinados e estão disponíveis em PAMMENT *et al.* (1978) e BAYLEY & OLLIS (1986).

STEINMEYER & SHULER (1989) apresentaram um modelo estruturado, não segregado para *Saccharomyces cerevisiae*.

O modelo divide a célula em 12 diferentes conjuntos distribuídos de metabólitos, precursores e grupos de macromoléculas, os quais representam agrupamentos de componentes celulares. Todos os componentes celulares estão ligados a um destes grupos. Amônio, aminoácidos, bases de ácidos nucleicos e glicose são explicitamente retirados do meio celular pelas células, para fornecer concentrações intracelulares destes componentes na célula. Aminoácidos são armazenados internamente em um grupo vacuolar. Metabólitos e precursores são reunidos em macromoléculas, os quais constituem o seio da massa celular. Por exemplo P_1 representa um grupo de aminoácidos citoplasmático, M_2 representa todas as espécies de RNA, e M_4 representa a parede celular (carboidratos e lipídios).

Embora o modelo se refira a uma única célula, este é baseado na média da população. A consequência desta aproximação é que a média celular deste modelo não segue o ciclo celular com distintos eventos cronológicos, mas do contrário, todos os processos ocorrem continuamente. Isto é uma aproximação uma vez que a maioria dos precursores e macromoléculas são construídos continuamente através do ciclo celular, visto que os eventos causam e efeito temporais do ciclo não são completamente compreendidos.

Heterogeneidade é assumida ser de menor importância para a célula. Por exemplo, nenhuma atenção tem sido dada para descrever o processo e transporte externo do núcleo de RNA, nem o processamento ou seqüestro dentro de várias organelas de várias proteínas, conseqüentemente, toda atividade metabólica é modelada levando em conta um citoplasma bem misturado. A única organela que é representada no modelo é o vacúolo, que age como uma reserva de aminoácidos.

Muitas das expressões contém o termo carga pseudoenergética:

$$ECT = k_1^* \exp(k_2^* EC) \quad (2.6.28)$$

que representa a dependência energética das reações biossintéticas.

Todas as reações são modeladas como a soma de dois ou mais sistemas paralelos reacionais. Muitos trabalhos publicados sobre *Saccharomyces cerevisiae* incluem somente consumo de glicose, modelando-os com um simples termo de saturação de Monod. Nestes modelos, a taxa é geralmente o passo limitante e o termo que governa o comportamento do modelo, contudo a conversão de glicose em *Saccharomyces cerevisiae* é mediada por pelo menos dois sistemas de conversão distintos, um sistema de baixa afinidade $K_s = 2,7-6,3$ g/L e outro de alta afinidade $K_s = 0,18-0,36$ g/L o qual está sob repressão de glicose. Cada sistema tem um papel fisiológico distinto. O sistema de baixa afinidade domina a taxa a altas concentrações de glicose. Claramente um termo de saturação de Monod é insuficiente para descrever o consumo no curso da fermentação, quando a concentração de glicose é menor que 20 g/L, como é o freqüente caso, e se um modelo é usado para descrever ambos CSTR e batelada, o sistema alta afinidade deve ser feito sem repressão de glicose.

O efeito de inibição também é levado em conta. Contudo, uma vez que o consumo de um determinado componente é geralmente mediado por mais de um sistema e a inibição dos sistemas é freqüentemente uma função complexa da composição da membrana e no caso do transporte ativo, energização da célula, um simples termo de inibição, governando o transporte de aminoácidos por exemplo, é menor que o ideal.

A estrutura de vários modelos estruturados para *Saccharomyces cerevisiae* está principalmente no seu caminho glicolítico. Neste modelo o mecanismo do metabolismo energético da célula não é levado em conta, mas do contrário ATP celular é ligado ao catabolismo de glicose interna a CO_2 e etanol.

As constantes para expressões de taxa são dadas em STEINMEYER E SHULER (1989).

Devido as grandes variações de potencial na taxa de respiração e energia capturada por unidade de substrato, taxa de respiração e rendimento variável de

ATP são incluídos no modelo.

A produção de glicerol é frequentemente notada em *Saccharomyces cerevisiae* e é função de muitas variáveis, incluindo o estado metabólico das células, pH, osmolaridade e composição nutricional do meio.

Componentes necessários para o crescimento tal como S, P e vitaminas, são assumidas estarem disponíveis em excesso. Nenhum mecanismo para incorporação de lipídios extracelulares está incluído no modelo neste tempo, e assume-se que a composição da membrana da célula é invariante no tempo e não tem influência no metabolismo.

Produtos como etanol, glicerol e CO₂ são assumidos difundir-se rapidamente para fora da célula e concentrações intra e extracelulares destes produtos são assumidas serem as mesmas. Finalmente assume-se que nenhum gradiente de concentração no contorno da célula exista, ao invés, a concentração de substrato e produto na superfície da célula é igual aquela do meio líquido.

A lista de reações pseudoquímicas do modelo, assim como as taxas individuais de reação, balanços da massa global da célula e constantes cinéticas e estequiométricas podem ser vistas em STEINMEYER & SHULER (1989) e são listadas a seguir.

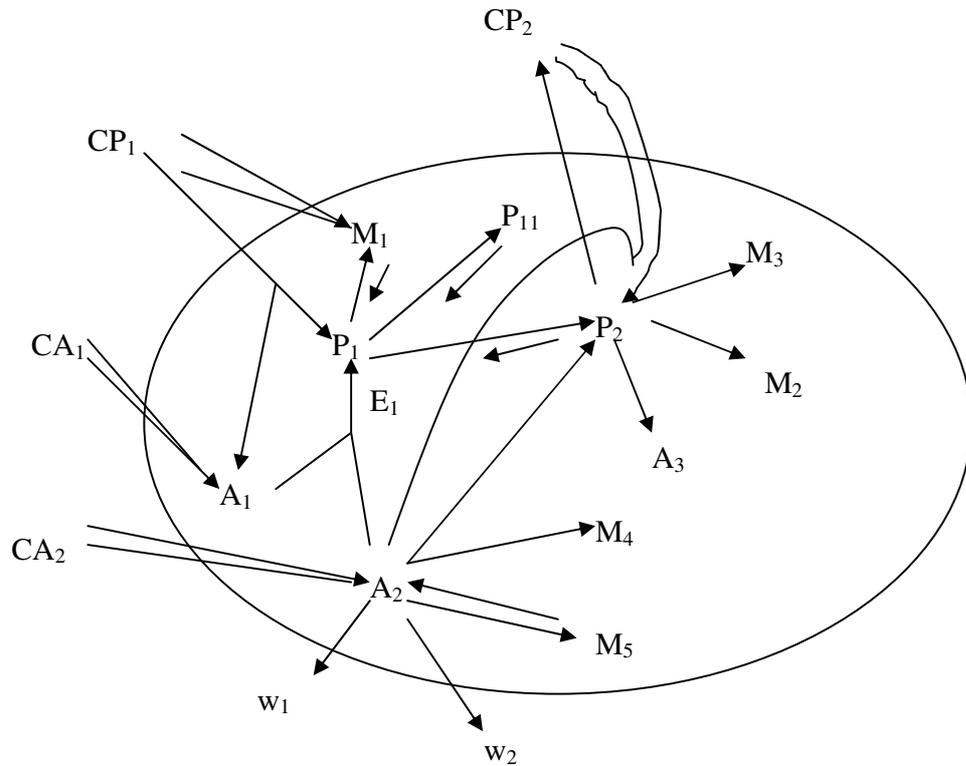


Figura 7: Esquema de fluxo de massa na levedura (STEINMEYER & SHULER, 1989).

Os símbolos na figura 7 são definidos como:

CP ₁ = aminoácido extracelular	M ₁ = proteína
CA ₁ = amônio extracelular	M ₂ = RNA
CA ₂ = glicose extracelular	M ₃ = DNA
CP ₂ = ácidos nucléicos e bases	M ₄ =envelope celular
A ₁ = amônio	M ₅ =carboidratos
A ₂ = glicose	E ₁ = aminoácidos biossintéticos
P ₁ , P ₁₁ =aminoácidos	W ₁ = etanol + CO ₂
P ₂ = nucleotídeos	W ₂ = glicerol

QUADRO I- Lista das reações pseudoquímicas do modelo celular

Reações primárias	Reações energéticas	
	Ligações fosfato	Elétron
Transporte		
$A_1^* \rightarrow A_1$	$a_{1T}A_3 \rightarrow a_{1T}A_{3s}$	
$A_2^* \rightarrow A_2$		
$P_1^* \rightarrow p_{\text{gap}}P_1 + a_{\text{gap}}A_1$		
$P_1^* \rightarrow P_1$	$p_{1T}A_3 \rightarrow A_{3s}$	
	$p_{2TU}A_3 \rightarrow p_{2TU}A_{3s}$	
$a_{2Tp_2}A_2 + P_2^* + \dots \leftrightarrow pp_2P_2 + \dots$	$p_{2TE}A_3 \leftarrow p_{2TE}A_{3s}$	$2gp_{2T}R_o \rightarrow gp_{2T}R_R$
$P_1 \rightarrow P_{11}$		
Precursores		
$a_1p_1A_1 + a_2p_1A_2 + \dots \leftrightarrow P_1 + \dots$	$p_{1F}A_3 \rightarrow p_{1F}A_{3s}$	$gp_{1F}R_o \rightarrow gp_{1F}R_R$
$p_1p_2P_1 + a_2p_2A_2 + \dots \leftrightarrow P_2 + \dots$	$p_{2F}A_3 \rightarrow p_{2F}A_{3s}$	$gp_{2F}R_o \rightarrow gp_{2F}R_R$
Macromoléculas		
$p_1m_1P_1 + \dots \leftrightarrow M_1 + \dots$	$m_{1F}A_3 \rightarrow m_{1F}A_{3s}$	
$p_2m_2P_2 + \dots \rightarrow M_2 + \dots$	$m_{2F}A_3 \rightarrow m_{2F}A_{3s}$	
$p_2m_3P_2 + \dots \rightarrow M_3 + \dots$	$m_{3F}A_3 \rightarrow m_{3F}A_{3s}$	$gm_{3F}R_o \rightarrow gm_{3F}R_R$
$a_2m_4A_2 + \dots \rightarrow M_4 + \dots$	$m_{4F}A_3 \rightarrow m_{4F}A_{3s}$	$gm_{4F}R_o \rightarrow gm_{4F}R_R$
$a_2m_5A_2 + \dots \leftrightarrow M_5 + \dots$	$m_{5F}A_3 \rightarrow m_{5F}A_{3s}$	

QUADRO II- Expressões individuais de taxa

(1) Taxa de consumo de amônio

$$R_{A1} = \left[V_{1A1} \left(\frac{CA_1^*}{CA_1^* + K_{1A1}} \right) + V_{2A1} \left(\frac{CA_1^*}{CA_1^* + K_{2A1}} \right) \right] \left(\frac{K_{1A1}}{K_{1A1} + P_{1/M}} \right) \times \left\{ \exp[k_{cA1}^* (C_E^* - k_{2cA1})] \right\} ECTE_1$$

(2) Taxa de consumo de aminoacido anabólico

$$R_{ANA} = \left\{ \begin{array}{l} V_{1AN} \left(\frac{C_{P1}^*}{C_{P1}^* + K_{1A1}} \right) \left(\frac{K_{11P1}}{K_{11P1} + P_{1/M}} \right) + \\ \left[V_{2AN} \left(\frac{C_{P1}^*}{C_{P1}^* + K_{2P1}} \right) + V_{3AN} \left(\frac{C_{P1}^*}{C_{P1}^* + K_{3P1}} \right) \left(\frac{K_{12P1}}{K_{12P1} + P_{1/M}} \right) \right] \\ \exp[k_{leA1}^* (C_E^* - k_{2eA1}^*)] \end{array} \right\} ECT/M$$

(3) Taxa de consumo de aminoacido catabólico

$$R_{CATA} = V_{CAT} \left(\frac{C_{P1}^*}{C_{P1}^* + K_{CAT}} \right) \left(\frac{K_{ICP1}}{K_{ICP1} + P_{1/M}} \right) \left(\frac{K_{ICA1}}{K_{ICA1} + A_{1/M}} \right) \times \exp[k_{leA1}^* (C_E^* - k_{2eP1}^*)] ECT/M$$

4) Taxa de consumo de glicose

$$R_{A2} = \left[V_{1A2} \left(\frac{C_{A2}^*}{C_{A2}^* + K_{1A2}} \right) + V_{2P2} \left(\frac{C_{A2}^*}{C_{A2}^* + K_{2A2}} \right) \right] \left[1 - k_{leA2}^* (C_E^* - k_{2eA2}^*) \right] M$$

(5) Taxa de consumo de ácido nucléico

$$R_{NBU} = \left[V_{1P2} \left(\frac{C_{P2}^*}{C_{P2}^* + K_{2P2}} \right) + V_{2P2} \left(\frac{C_{P2}^*}{C_{P2}^* + K_{2P2}} \right) \right] \left\{ \exp[k_{leP1}^* (C_E^* - k_{2eP1}^*)] \right\} ECT M$$

(6) Fluxo de ácido nucléico

$$R_{NBE} = \left[V_{1P2} \left(\frac{C_{P2}^*}{C_{P2}^* + K_{3P2}} \right) + V_{2P2} \left(\frac{C_{P2}^*}{C_{P2}^* + K_{4P2}} \right) \right] M$$

(7) Taxa de síntese de aminoácido

$$R_{PIS} = V_{PIS} \left(\frac{A_{2/M}}{A_{2/M} + K_{IPIS}} \right) \left(\frac{A_{1/M}}{A_{1/M} + K_{2PIS}} \right) \left(\frac{K_{IPIS}}{K_{IPIS} + P_{1/M}} \right) ECT E_1$$

(8) Taxa de degradação de aminoácido

$$R_{PID} = V_{PID} \left(\frac{K_{IPID}}{K_{IPID} + A_{1/M}} \right) P_1$$

(9) Taxa de síntese de ácido nucléico

$$R_{P2S} = V_{P2S} \left(\frac{A_{2/M}}{A_{2/M} + K_{IP2S}} \right) \left(\frac{P_{1/M}}{P_{1/M} + K_{2P2S}} \right) \left(\frac{K_{IA2S}}{K_{IP2S} + P_{2/M}} \right) ECT M$$

(10) Taxa de degradação de ácido nucléico

$$R_{P2D} = V_{P2D} \left(\frac{K_{IP2D}}{K_{IP2D} + A_{2/M}} \right) P_2$$

(11) Taxa de consumo de aminoácido vacuolar

$$R_{P11} = V_{P11} \left(\frac{P_{1/M}}{P_{1/M} + K_{P11}} \right) \left(\frac{K_{IP11}}{K_{IP11} + P_{11/M}} \right) ECT M$$

(12) Fluxo de aminoácido vacuolar

$$R_{P110} = V_{P110} \left(\frac{K_{IP110}}{K_{IP110} + P_{1/M}} \right) P_{11}$$

(13) Taxa de síntese de proteína

$$R_{MIS} = V_{MIS} \left(\frac{P_{1/M}}{P_{1/M} + K_{MIS}} \right) ECT M$$

(14) Taxa de degradação de proteína

$$R_{MID} = V_{MID} \left(\frac{K_{IMID}}{K_{IMID} + P_{1/M}} \right) M_1$$

Revisão Bibliográfica

(15) Taxa de síntese de RNA

$$R_{M2S} = V_{M2S} \left(\frac{P_{2/M}}{P_{2/M} + K_{1M2S}} \right) \left(\frac{P_{1/M}}{P_{1/M} + K_{2M2S}} \right) ECT M$$

(16) Taxa de síntese de DNA

$$R_{M3S} = V_{M3S} \left(\frac{P_{2/M}}{P_{2/M} + K_{M3S}} \right) ECT M$$

(17) Taxa de síntese de envelope celular

$$R_{M4S} = V_{M4S} \left(\frac{A_{2/M}}{A_{2/M} + K_{1M4S}} \right) \left(\frac{P_{1/M}}{P_{1/M} + K_{2M4S}} \right) ECT M$$

(18) Taxa de síntese de reserva de carboidratos

$$R_{M5S} = V_{M5S} \left(\frac{A_{2/M}}{A_{2/M} + K_{1M5S}} \right) \left(\frac{K_{1/M5}}{K_{1M5} + M_{5/M}} \right) \left[\left(\frac{K_{1M5A1}}{K_{1M5A1} + A_{1/M}} \right) \left(\frac{K_{1M5A2}}{K_{1M5A2} + A_2} \right) \right] ECT M$$

(19) Taxa de quebra da reserva de cabohidratos

$$R_{M5D} = V_{M5D} \left(\frac{K_{1M5D}}{K_{1M5D} + A_{2/M}} \right) M_5$$

(20) Taxa de respiração

$$R_{ESP} = V_{resp} \left(\frac{O_2^*}{O_2^* + K_{O_2}} \right) M$$

(21) Taxa de síntese de enzimas biossintéticas de aminoacido

$$R_{E1S} = V_{E1S} [1/(P_1/M)] M ECT$$

(22) Taxa de degradação de enzimas biossintéticas de aminoacidos

$$R_{E1D} = V_{E1D} E_1$$

(23) Taxa de morte de biomassas

$$R_D = V_{D1} \exp(V_{D2} C_2^*) M$$

(24) Taxa de ATP gasto para manutenção

$$R_{\text{MAINT}} = (k_{1m} + k_{2m}C_2^* + k_{3m}C_E^{*2} + k_{4m}C_E^{*3})$$

(25) Taxa de uso total de ATP

$$R_{\text{ATP}} = -R_{\text{MAINT}} - a_{1T}R_{A1} - p_{1T}(R_{\text{ANA}} + R_{\text{CATA}}) - p_{2T}R_{\text{NBU}} + p_{2TE}R_{\text{NBE}} - p_{1T}R_{\text{P111}} - p_{1F}R_{\text{P1S}} - m_{4F}R_{\text{M4S}} - m_{1F}R_{\text{M1S}} - m_{2F}R_{\text{M2S}} - m_{3F}R_{\text{M3S}} - m_{5F}R_{\text{M5S}} - g_{\text{ge}}R_{\text{G}} - \dots \dots \dots Q_0R_{\text{M}}$$

(26) Taxa de redução dos transportadores de elétron

$$R_{\text{G}} = gp_{2T}(R_{\text{NBU}}p_{p2} - R_{\text{NBE}}) + gp_{1F}R_{\text{P1S}} + gp_{2F}R_{\text{P2S}} - gm_{3F}R_{\text{M3S}} + gm_{4F}R_{\text{M4S}} - \dots \dots \dots R_{\text{ATP}} Y_{\text{SATP}} g_{\text{gluace}}$$

QUADRO III- Balanço de massa global da célula

$$\frac{dA_1}{dt} = R_{A1} + a_1p_1(R_{\text{PID}} - R_{\text{P1S}})a_{1\text{GAP}}R_{\text{CATA}} - R_{\text{D}}(A_1/M)$$

$$\begin{aligned} \frac{dA_2}{dt} = & R_{a2} + a_2p_1(R_{\text{PID}} - R_{\text{P1S}}) + a_2p_2(R_{\text{P2D}} - R_{\text{P2S}}) - a_2m_4R_{\text{M4S}} + \\ & a_2m_5(R_{\text{M5D}} - R_{\text{M5S}}) + a_{2\text{TP2}}(R_{\text{NBE}} - R_{\text{NBU}}) - g_{a2g}R_{\text{G}} + \\ & \left[\begin{array}{l} -a_{1T}R_{A1} - p_{1T}(R_{\text{ANA}} + R_{\text{CATA}}) - p_{2T}R_{\text{NBU}} + \\ p_{2TE}R_{\text{NBE}} - p_{1T}R_{\text{P111}} - p_{1F}R_{\text{P1S}} - m_{4F}R_{\text{M4S}} - \\ m_{1F}R_{\text{M1S}} - m_{2F}R_{\text{M2S}} - m_{3F}R_{\text{M3S}} - m_{5FR}R_{\text{M5S}} - \\ g_{\text{ge}}R_{\text{G}} - Q_0R_{\text{M}} - R_{\text{MAINT}} \end{array} \right] \text{ATP} - R_{\text{D}}(A_2/M) \end{aligned}$$

$$\frac{dA_3}{dt} = \left\{ R_{\text{ATP}} \left[\begin{array}{l} R_{A2} - a_2p_1(R_{\text{P1S}} - R_{\text{PID}}) + a_2p_2(R_{\text{P2S}} - R_{\text{P2D}}) - \\ Q_1R_{\text{M}} - a_2m_4R_{\text{M5S}} - a_2m_5(R_{\text{M5S}} + R_{\text{M\%D}}) - \\ a_{2\text{TP2}}(R_{\text{NBU}} - R_{\text{NBE}}) - g_{a2g}R_{\text{G}} \end{array} \right] \right\} \text{ATP} - R_{\text{D}}(A_3/M)$$

$$\begin{aligned} \frac{dP_1}{dt} = & R_{\text{ANA}} + p_{\text{GAP}}R_{\text{CATA}} + R_{\text{P1S}} - R_{\text{PID}} - R_{\text{P111}} + R_{\text{P110}} - p_1p_2(R_{\text{P2S}} + R_{\text{P2D}}) - \\ & p_1m_1(R_{\text{M1S}} + R_{\text{M1D}}) - R_{\text{d}}(P_1/M) \end{aligned}$$

$$\frac{dP_2}{dt} = pp_2(R_{\text{NBU}} - R_{\text{NBE}}) + R_{\text{P2S}} - R_{\text{PeD}} - p_2m_3R_{\text{M3S}} - p_2m_2R_{\text{M2S}} - R_{\text{D}}(P_2/M)$$

$$\frac{dP_{11}}{dt} = R_{P111} - R_{P110} - R_d(P_2/M)$$

$$\frac{dM_2}{dt} = R_{M2S} - R_D(M_2/M)$$

$$\frac{dM_3}{dt} = R_{M3S} - R_D(M_3/M)$$

$$\frac{dM_4}{dt} = R_{M4S} - R_D(M_4/M)$$

$$\frac{dM_5}{dt} = R_{M5S} - R_{M5D} - R_D(M_5/M)$$

$$\frac{dE_1}{dt} = R_{ELSYN} - R_{ELDEG} - R_D(E_1/M)$$

$$\frac{dC_{EC}}{dt} = (-R_{ATP} - R_{ESP}PO)46/V_{CELL}$$

$$\frac{dC_{GC}}{dt} = R_G/V_{CELL}$$

$$\frac{dC_{A2C}}{dt} = -(R_{ANA} + R_{CATA})/V_{CELL}$$

$$\frac{dC_{PIC}}{dt} = -(R_{ANA} + R_{CATA})/V_{CELL}$$

$$\frac{dC_{P2C}}{dt} = (R_{NBE} - R_{NBU})/V_{CELL}$$

$$\frac{dC_{A2C}}{dt} = -R_{A1}/V_{CELL}$$

O modelo foi avaliado comparando fermentações experimentais e simuladas. Uma vez que a base do modelo é o conceito de consumo de metabólitos e suas conversões passo a passo nas macromoléculas as quais constituem o meio da massa celular. Dois experimentos foram escolhidos: no primeiro experimento extrato de levedura foi usado como fonte de nitrogênio para obter um meio de fermentação rico em blocos construtores macromoleculares, no segundo experimento, um meio mais pobre foi usado para compelir as células a construir estruturas a partir de glicose e amônio. A habilidade do modelo em simular o crescimento nestes dois diferentes modos de metabolismo capacita-o de descrever o curso de fermentação em termos do que medido macroscopicamente, ou seja Glicose, etanol e células.

Os símbolos para cada espécie são fornecidos na legenda da Figura 07. Os valores dos parâmetros e constantes cinéticas estão em STEINMEYER & SHULER (1989). a_{1P_1} indica a massa de A_1 consumida ao transformar 1g de P_1 . A_{1T} indica o número de moles de ATP gasto por 1g de A_1 transportado, e gp_{2T} indica o número de moles de NAD^+ reduzido por grama de P_2 transformado.

Nas taxas individuais de reação, R com subscrito denota a taxa de consumo (R_{A_1}), síntese ($R_{P_{1S}}$) e degradação ($R_{P_{1D}}$). Para os parâmetros cinéticos, V denota a máxima taxa de reação de consumo para um sistema particular e o subscrito denota a reação relevante. Por exemplo: V_{1A_1} denota a máxima taxa de A_1 por consumo do sistema 1, $v_{P_{1S}}$ denota a máxima taxa de síntese de aminoácidos, enquanto $V_{P_{1D}}$ denota a taxa máxima de degradação.

Os parâmetros de saturação são denotados por K com um apropriado subscrito, por exemplo $K_{1M_{2S}}$ é referente ao primeiro termo para a síntese de RNA. Para inibição, o termo $K_{1P_{1S}}$ indica inibição da síntese de aminoácido. Outras constantes, incluindo Y_{SWATP} , g_{gluace} , g_{a2g} , Q_0 e Q_1 , correlacionam proporções.

ROTBOLL & JORGENSEN (1993) desenvolveram modelo estruturado simples, do tipo bicompartimental, para simular o cultivo batelada-alimentada para *Saccharomyces cerevisiae* caracterizado pela parte ativa (X_A) onde ocorrem as reações químicas e pela parte inativa (X_P), que constitui a estrutura

Revisão Bibliográfica

relacionada com o material celular. As taxas de reações são modeladas como se fossem reações cinéticas enzimáticas reversíveis.

Para tentar representar com maior precisão e detalhamento a fisiologia celular, é proposto um modelo estruturado, onde as reações metabólicas se baseiam na inclusão de uma rota glicolítica simplificada descrita por um modelo bicompartimental constituído por uma composição ativa (responsável pela síntese ou maquinaria celular) e outra inativa (parte estrutural da célula).

O modelo estruturado inclui na parte ativa as rotas metabólicas da fermentação etanólica e respiração. Estas rotas mostram as concentrações enzimáticas responsáveis pela oxidação total do acetaldeído e piruvato através do ciclo do ácido cítrico (X_{ACDH}) e redução do acetaldeído à etanol (X_{ALDH}), tendo sido testados por simulação para verificar o efeito de diferentes condições operacionais na performance do modelo estruturado para representar o curso da fermentação via concentração de glicose, etanol e células.

3) PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Em processos biotecnológicos, um grande número de fatores pode influenciar o rendimento, produtividade e conversão. Normalmente, não é evidente qual desses fatores são os mais importantes. Deve-se portanto, recorrer a técnicas de análise multivariada como a do planejamento experimental. Assim, é possível, além da determinação dos fatores importantes do processo, identificar as estruturas de controle para estratégias de operação diferenciadas. O planejamento fatorial é uma técnica estatística multivariada que agrupa variáveis que estão altamente correlacionadas. Quando existe um grande número de variáveis pode-se aplicar um planejamento fatorial fracionado ou um planejamento proposto por Plackett e Burman (1946). Os planejamentos Plackett-Burman permitem estimar todos os $k = n - 1$ efeitos principais (onde n representa o número de ensaios) com variância mínima.

O planejamento fatorial vem sendo aplicado com grande frequência na área de processos biotecnológicos para a otimização operacional devido às inúmeras variáveis que estes processos envolvem. Entretanto, a utilização do planejamento Plackett-Burman, está mais voltada à elaboração de meios de cultura. Alguns trabalhos bem sucedidos são citados a seguir: GRADO e CHANDRA (1998) utilizaram o planejamento fatorial para comparar o impacto relativo de vários parâmetros nos custos de produção de etanol. Verificaram que uma análise de sensibilidade utilizando planejamento fatorial pode ser utilizada como um guia para reduzir custos no produto final. KALIL et al. (2000), utilizou planejamento fatorial e técnicas de superfície de resposta em combinação com modelagem e simulação para projetar e otimizar um bioprocessamento industrial. Foi considerado um processo de fermentação alcoólica contínua em múltiplos estágios com reciclo de células. As condições de operação para máximo rendimento e produtividade foram determinadas com dez parâmetros. Estes autores utilizaram como partida a metodologia de Plackett-Burman, (PLACKETT & BURMAN, 1946) muito utilizada para selecionar os fatores mais importantes dentro de uma longa lista de candidatos a fatores. Esta metodologia mostrou-se uma importante ferramenta para determinação das variáveis relevantes para o processo de otimização.

Planejamento Experimental

RODRIGUES et al. (1993) otimizaram um processo contínuo de purificação de enzima através de análise de superfície de resposta, baseado em um planejamento fatorial e análise de regressão. Neste trabalho, o planejamento fatorial foi utilizado como uma ferramenta para avaliar a influência das principais variáveis do processo de purificação sobre o rendimento e produtividade. Os efeitos de cada variável (entre um grupo de sete) foram quantificados, e altos rendimentos foram alcançados manuseando a concentração de enzima na alimentação, a taxa de fluxo de alimentação no estágio de adsorção, a porosidade do leito e a taxa de fluxo de reciclo. Estes autores citam que a metodologia de superfície de resposta é uma poderosa ferramenta encontrar a melhor faixa de condições para otimizar a operação de sistemas com grande número de variáveis. Através deste procedimento é possível identificar quais variáveis são mais significantes para conduzir o processo à operar em alta performance. RODRIGUES et al. (2002) propuseram uma aproximação para ajustar o controlador GPC (Generalized Predictive Control) nas configurações adaptativas e não adaptativas aplicadas a um processo de produção de penicilina utilizando o planejamento fatorial completo, o qual fornecia o conjunto ótimo de parâmetros. BURKERT et al. (2004) utilizaram com sucesso o planejamento fatorial e a metodologia de superfície de resposta para estudar os efeitos das concentrações de fontes de carbono e nitrogênio na produção de lipase por *Geotrichum sp.* BENNAMOUN et al. (2004) utilizaram com sucesso o planejamento PB de 12 ensaios (7 variáveis reais e 4 variáveis inertes) para a otimização da produção de α -amylase por *Apergillus oryzae Ahlburg (Cohen)*. VAIDYA, et al. (2003) usaram o mesmo planejamento para a formulação de um meio nutritivo para otimizar a produção de chitinase por *Alcaligenes xylosoxydans*. WANG E LU (2004) estudaram a influência dos efeitos quantitativos do tempo de fermentação, da temperatura e o meio de caldo no crescimento micelial de fungos *Boletus sp* numa fermentação submersa. Os três fatores escolhidos foram baseados nos resultados de um planejamento prévio PB.

O planejamento fatorial é uma ferramenta que visa facilitar o estudo de um sistema, minimizando a quantidade de experimentos necessários para obtenção de informações sobre o comportamento do mesmo. Segundo BOX & DRAPPER

Planejamento Experimental

(1987), o planejamento experimental fatorial facilita a elaboração de modelos interagindo os dados, fazendo comparações, buscando similaridades, diferenças e tendências.

3.1) PLANEJAMENTO FATORIAL

Através de um planejamento fatorial, as variáveis de interesse no processo que realmente apresentam influências significativas na resposta são avaliadas ao mesmo tempo.

Para executar um planejamento fatorial, inicia-se especificando os níveis em que cada fator deve ser estudado, isto é, os valores dos fatores que vamos usar para fazer os experimentos. As variáveis estudadas são denominadas fatores e os diferentes valores escolhidos para estudar os fatores são chamados níveis (BARROS NETO *et al.*, 2001)

Especificando os níveis permissíveis superiores e inferiores de cada uma das n variáveis. A faixa permissível é então discretizada em níveis equidistantes. A região limitada pelos níveis das variáveis é denominada espaço do planejamento cujos vértices determinam um cubo n -dimensional. Se cada uma das variáveis for especificada somente nos limites superior e inferior (dois níveis), o planejamento fatorial é chamado de fatorial completo 2^n . Neste tipo de planejamento, costuma-se identificar os níveis superior e inferior com os valores (+1) e (-1), respectivamente. Analogamente, um planejamento fatorial completo 3^n é feito especificando os limites superior, central e inferior (três níveis: {-1, 0, 1}) para cada uma das n variáveis. O planejamento fatorial pode ser utilizado para ajustar modelos quadráticos. Um modelo quadrático pode melhorar significativamente o processo de otimização quando o modelo linear mostra-se insatisfatório para o ajuste, devido à interação entre as variáveis e a curvatura da superfície. A construção de um modelo quadrático de n variáveis requer ao menos $(n+1)(n+1)/2$ avaliações da resposta.

Em um planejamento fatorial completo, todas as possíveis combinações dos níveis selecionados dos fatores são feitas. Os Planejamentos Fatoriais mais comuns e de maior utilidade em investigações preliminares são os de dois níveis,

Planejamento Experimental

2ⁿ. O planejamento fatorial de dois níveis é de grande utilidade em investigações preliminares, quando se deseja saber se determinados fatores têm ou não influência sobre a resposta (variável dependente), sem que se tenha uma descrição muito rigorosa dessa influência.

Os dois níveis avaliados em um planejamento fatorial de dois níveis, (+) e (-), representando os níveis superiores e inferiores, permite esquematizar o planejamento facilmente na forma de matrizes de planejamento, as quais nada mais são do que uma listagem das combinações de fatores.

Os efeitos dos fatores, definidos como a mudança ocorrida na resposta quando se move do nível inferior (-) para o nível superior (+), podem ser divididos em efeitos principais e efeitos de interação. O efeito principal permite definir qual o efeito médio da variável examinada sobre as condições das demais variáveis.

Quando um número relativamente grande de fatores é avaliado, o número de combinações total (número de experimentos / simulações) pode ser muito grande. Além do mais, de maneira geral, as interações de ordem alta (terceira, quarta ou superiores) são pequenas e podem ser confundidas com o desvio padrão dos efeitos. Neste caso um planejamento completo pode ser um desperdício. É aconselhável, primeiro fazer uma triagem para decidir quais fatores merecem um estudo mais aprofundado. Utiliza-se então o Planejamento Fatorial Fracionário, sem que seja necessária a determinação de todos os parâmetros de interação. O número de experimentos / simulações realizados diminui e determinam-se os efeitos mais importantes.

A vantagem de se reduzir o número de experimentos / simulações ao se fazer um Planejamento Fatorial Fracionário (redução do número de graus de liberdade) traz a desvantagem de confundir os efeitos principais com as interações entre fatores (BARROS NETO *et al.*, 2001).

Na interpretação dos resultados gerados por um Planejamento Fatorial, seja ele completo ou fracionário, é necessário decidir quais os efeitos calculados são significativamente diferentes de zero e, portanto merecedores de interpretação. A

Planejamento Experimental

prática usual é utilizar o conceito de significância estatística (geralmente 95% de confiança) (BARROS NETO *et al.*, 2001).

3.2) PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN

Quando se necessita investigar um grande número de fatores a fim de estabelecer aqueles mais importantes (isto é, aqueles que estão relacionados à variável dependente de interesse), emprega-se um projeto que permita verificar os efeitos principais do maior número possível de fatores com um menor número de observações. Tais projetos são chamados de projetos saturados, porque toda informação é usada para estimar os efeitos principais, não restando graus de liberdade para estimar os efeitos de interação e as vezes, nem o erro experimental. PLACKETT E BURMAN (1946) mostraram como os projetos fatoriais podem ser fracionados em diferentes maneiras para gerar projetos saturados onde o número de experimentos é um múltiplo de 4 ao invés de potências de 2.

Os planejamentos mais usuais propostos neste método são para 12, 20, 24, 28 e 36 ensaios, sendo conveniente realizar quatro ensaios a mais que o número de variáveis a serem estudadas (denominadas variáveis inertes).

4) OTIMIZAÇÃO POR PROGRAMAÇÃO QUADRÁTICA SEQUENCIAL (SQP)

Um processo de otimização consiste em encontrar valores que maximizem ou minimizem uma função objetivo sujeita a um conjunto de restrições.

Não existe um único método de otimização que pode ser aplicado eficientemente para todos os problemas. O método escolhido, para um caso particular, depende das características da função objetivo, da natureza das restrições e do número de variáveis do problema (MELO, 2005). No entanto, segundo este autor, os seguintes passos devem ser observados na formulação e solução do problema:

- análise do processo e suas variáveis;
- determinação do critério para otimização e especificação da função objetivo em termos das variáveis de processo;
- desenvolvimento do modelo para o processo, relacionando suas variáveis através das restrições de igualdade e desigualdade. Cálculo do grau de liberdade do sistema;
- se a formulação do problema é dimensão elevada, então procurar particionar o problema em partes menores ou simplificar a função objetivo e/ou modelo;
- aplicação de técnicas apropriadas de otimização;
- analisar a solução obtida e sua sensibilidade frente a variações em parâmetros do modelo e suas considerações (hipóteses).

Programações quadráticas sequencial, sucessivas, recursivas, iterativas, ou ainda chamadas de método de variáveis com restrições, são as várias formas de representação do método SQP, que é basicamente usado para resolver o sistema de equações do tipo Karush-Kuhn-Tucker (KKT), ou simplesmente condições de primeira ordem. O resultado ótimo é obtido pela resolução do sistema de equações não-lineares. A idéia básica consiste em resolver o problema por aproximação com o método de Newton, geralmente usado para resolver problemas sem

Programação Quadrática Sucessiva

restrições (MELO, 2005). Ainda segundo este autor, para o caso estudado foi necessário estabelecer uma função objetivo que dependa basicamente das variáveis de decisão e das restrições relacionadas com estas variáveis no problema de otimização previamente definido. Com a intenção de conseguir uma boa implementação da otimização SQP, uma escolha adequada das variáveis de decisão deve ser feita para que não aconteçam limitações devido a problemas de convergência.

O problema tem a seguinte forma geral: minimize uma função objetivo $f(x)$ sujeita as restrições de igualdade $h(x)$ e desigualdade $g(x)$, ou seja;

$$\begin{array}{lll} \text{Minimizar} & f(x) & \text{sendo } x \in \mathbb{R}^n \\ \text{Sujeito a} & h_j(x) = 0 & j = 1, 2, \dots, m_1 \\ & g_j(x) \geq 0 & j = 1, 2, \dots, m_2 \end{array} \quad (4.1)$$

Este problema não é simples, por isso na obtenção de uma solução para o mesmo, muitas vezes, é suficiente que se encontre uma solução x^* tal que o conjunto de equações abaixo (4.2), seja satisfeito. Diz-se que x^* é uma solução local de (4.1) e a solução global de (4.1) é o ponto x^* em que $f(x^*)$ seja o menor possível dentro da região factível (TVRZSKÀ DE GOUVÊA, 1997).

$$\begin{array}{lll} f(x^*) = \min_{x \in \mathbb{R}^n \cap B_\delta(x^*)} f(x) \\ \text{Sujeito a} & h_j(x) = 0 & j = 1, 2, \dots, m_1 \\ & g_j(x) \geq 0 & j = 1, 2, \dots, m_2 \end{array} \quad (4.2)$$

Onde $B_\delta(x^*)$ é a bola aberta de raio δ em torno de x^* , ou seja, é suficiente que $f(x^*) \leq f(x)$ para todo x suficientemente próximo de x^* .

Uma hipótese muito utilizada em relação às funções f , h e g é que estas funções sejam duplamente diferenciáveis em todos os pontos do domínio de definição. Neste caso, a caracterização da solução ótima pode ser feita através da função Lagrangiana, que associada ao problema (4.1) é definida como (REZENDE, 2003):

$$L(x, \lambda, \mu) = f(x) + \lambda \cdot h(x) + \mu \cdot g(x)$$

Programação Quadrática Sucessiva

Onde λ e μ são vetores formados pelos multiplicadores de Lagrange das restrições de igualdade e desigualdade, respectivamente.

Aplicando as condições KKT, definidas da seguinte forma:

- *Condição necessária de KKT:*

Seja x^* uma solução local ou global de (4.1) e f , h e g diferenciáveis em x^* e h e g tais que x^* seja ponto regular de h e g , ou seja, $h_j(x^*) = 0$ e $g_j(x^*) \leq 0$ e os componentes de h e g (correspondentes a $g_j(x^*) = 0$) são linearmente independentes em x^* . Então sistema (4.3) tem solução:

$$\nabla L_x(x^*, \lambda^*, \mu^*) = 0$$

$$h_j(x^*) = 0$$

$$g_j(x^*) \leq 0$$

$$(3.8.3)$$

$$\mu_j g_j(x^*) = 0$$

$$\mu_j \geq 0$$

- *Condição suficiente de KKT:*

Seja x^* uma solução local ou global de (4.1) e f , h e g duplamente diferenciáveis em x^* . Seja ainda $I_a = \{i: g_i(x^*) = 0; i = 1, \dots, p\}$, onde I_a é o conjunto ativo correspondente à solução ótima do problema. Suponha que alguma qualificação de restrições seja válida. Então x^* é a solução do sistema (3.8.3) e $d^T \nabla^2 L_{xx}(x^*) d \geq 0$ para todo o $d \in C$ e $C = \{d \in \mathbb{R}^n, d \neq 0, \nabla g_i^T(x^*) d \leq 0, i \in I_a, \nabla h^T d = 0\}$

A obtenção do ponto x que satisfaça o sistema (4.3) é mais fácil do que resolver o problema (4.1), isto faz as condições KKT muito utilizadas.

Os algoritmos de otimização, a exemplo do SQP, são normalmente implementados com funções objetivos e/ou restrições com comportamentos bem definidos, modelos com uma combinação linear ou não de funções entre as variáveis de decisão e todas as funções diferenciáveis (MELO, 2005)

O algoritmo SQP corresponde a um método iterativo que gera uma

Programação Quadrática Sucessiva

seqüência de valores $\{x_k, \lambda_k, \mu_k\}$ que converge para a solução do problema (4.2) dado por (x^*, λ^*, μ^*) . A forma de como esta seqüência de valores é gerada é que diferencia um método do outro.

Os métodos SQP podem ser definidos como aqueles em que para cada iteração do algoritmo efetua-se uma aproximação linear do conjunto de restrições do problema não linear. Uma função quadrática é então minimizada sobre este conjunto simplificado a fim de se obter novos valores da seqüência $\{x_k, \lambda_k, \mu_k\}$ (WRIGHT, 1989).

A minimização de uma função quadrática sujeita a restrições lineares corresponde a um problema de programação quadrática. (QP). Assim, aplicando as condições KKT e com o uso da função de Lagrange no problema de otimização, chega-se a um conjunto de equações que é transformado em sucessivos problemas de programação quadrática:

$$\begin{aligned} \min \quad & \nabla f^T(x_k)d_k + \frac{1}{2}d_k^T H(x_k, \lambda_k, \mu_k)d_k \\ \text{Sujeito a:} \quad & \nabla h^T(x_k)d_k + h(x_k) = 0 \\ & \nabla g^T(x_k)d_k + g(x_k) \leq 0 \end{aligned} \tag{4.4}$$

Para se determinar a melhor direção de busca a partir do ponto x_k e então, proceder à atualização para o próximo ponto $x_{k+1} = x_k + \alpha_k d_k$. Assim como no método de Newton, apesar do valor ótimo do passo ser $\alpha_k=1$, valores de $\alpha_k \in (0, 1)$ são determinados para garantir as propriedades de convergência global do método. Este procedimento, geralmente, é feito com o uso de técnicas de direção de busca em linha (“linesearch” – minimização unidirecional de uma função mérito) ou pela limitação do problema quadrático acima da região de confiança (“trust region”). Na verdade, α_k é um fator de amortecimento, a partir da minimização da função mérito. A matriz $H(x_k, \lambda_k, \mu_k)$ é uma aproximação positiva definida pela matriz hessiana da função de Lagrange, que pode ser atualizada por qualquer método (DFP-Fórmula Davidon-Fletcher-Powell, BFGS-Fórmula Broyden, Fletcher, Goldfarb, Shanno, etc). Como parte da solução do problema de programação quadrática, tem-se também os multiplicadores de

Lagrange λ_{k+1} , μ_{k+1} . Um outro fator importante para complementar a robustez do algoritmo é a necessidade de definição de um critério de parada na busca da solução ótima (MELO, 2005).

Os métodos determinísticos de otimização, como o SQP, são métodos de busca do ponto ótimo local que empregam o conceito de derivada de uma função, com o objetivo de maximizá-la ou minimizá-la tendendo para a melhor resposta. Métodos considerados não tradicionais estão se tornando populares na solução destes problemas. É o caso do método não-determinístico ou heurístico, que é um método de busca global, ou seja, encontra-se o ponto ótimo global. Têm-se como exemplo a algoritmo genético.

5) MODELO ESTRUTURADO

ROTBOLL & JORGENSEN (1993) desenvolveram modelo estruturado simples, do tipo bicompartimental, para simular o cultivo batelada-alimentada para *Saccharomyces cerevisiae* caracterizado pela parte ativa (X_A) onde ocorrem as reações químicas e pela parte inativa (X_P), que constitui a estrutura relacionada com o material celular. As taxas de reações são modeladas como se fossem reações cinéticas enzimáticas reversíveis.

Para tentar representar com maior precisão e detalhamento a fisiologia celular, foi proposto um modelo estruturado, onde as reações metabólicas se baseiam na inclusão de uma rota glicolítica simplificada descrita por um modelo bicompartimental constituído por uma composição ativa (responsável pela síntese ou maquinaria celular) e outra inativa (parte estrutural da célula).

O modelo estruturado inclui na parte ativa as rotas metabólicas da fermentação etanólica e respiração. Estas rotas mostram as concentrações enzimáticas responsáveis pela oxidação total do acetaldeído e piruvato através do ciclo do ácido cítrico (X_{ACDH}) e redução do acetaldeído à etanol (X_{ALDH}), tendo sido testados por simulação para verificar o efeito de diferentes condições operacionais na performance do modelo estruturado para representar o curso da fermentação via concentração de glicose, etanol e células. Na representação das rotas metabólicas as concentrações enzimáticas consideradas são as responsáveis pela oxidação total do acetaldaído e piruvato através do ciclo do ácido cítrico, X_{ACDH} e pela redução do acetaldeído à etanol, X_{ALDH} .

Termos reacionais:

$$R_1 = \frac{k_1 S_{glu} X_a}{S_{glu} + S_1} + \frac{k_1 S_{glu} S_{acetald} X_a}{S_{glu} (1 + k_{1i} S_{acetald}) + S_{1e}} \quad (5.1)$$

$$R_2 = \frac{k_2 S_{pyr} X_a}{(S_{pyr} (m_2 S_{acetald} + 1) + S_2) (m_{2e} S_{glu} + 1)} \quad (5.2)$$

$$R_3 = \frac{k_3 S_{pyr} X_a}{S_{pyr} + S_3} \quad (5.3)$$

Modelo Estruturado

$$R_4 = k_4 S_{acetald} \left(k_{4e} - (k_{4i} S_{glu} + 1)^{-1} \right) X_{ACDH} X_a (S_{acetald} + S_4)^{-1} \quad (5.4)$$

$$R_5 = k_5 \left(S_{acetald} - \frac{k_{5r} P_{etOH}}{1 + k_{5i} S_{acetald}} \right) X_{ALDH} X_a (S_{acetald} + S_5 + S_{5e} P_{etOH})^{-1} \quad (5.5)$$

$$R_6 = \frac{k_6 X_{glu} X_a}{S_{glu} + S_6} \quad (5.6)$$

$$R_7 = \frac{k_4 S_{acetald} X_{ACDH} X_a}{(S_{acetald} + S_4)(k_{4i} S_{glu} + 1)} \quad (5.7)$$

$$R_8 = \frac{k_8 S_{glu} X_a}{S_{glu} + S_8} + \frac{k_{8e} P_{etOH} X_a}{P_{etOH} + S_{8e}} \quad (5.8)$$

$$R_9 = k_9 \left(\frac{S_{glu}}{S_{glu} + S_9} + \frac{P_{etOH}}{P_{etOH} + S_{9e}} \right) X_a (k_{9i} S_{glu}^2 + 1)^{-1} \quad (5.9)$$

$$R_{10} = \frac{k_{10} X_a}{k_{10i} S_{glu}^2 + 1} + \frac{k_{10e} S_{acetald} X_a}{S_{acetald} + S_{10e}} \quad (5.10)$$

Equações dinâmicas:

Neste caso o modelo estruturado descreve o crescimento da levedura em um biorreator operando em sistema batelada e batelada alimentada. As equações dinâmicas apenas consideram o comportamento das variáveis no meio fluido, isto é célula livre. As equações em termos de taxa de diluição (D), proposta por Rotboll para um sistema agregado podem ser escritas como:

Glicose:

$$\frac{dS_{glu}}{dt} = -(R_1 + R_6)X + (S_{glu,f} - S_{glu})D \quad (5.11)$$

Piruvato:

$$\frac{dS_{pyr}}{dt} = (0,9778R_1 - R_2 - R_3)X - S_{pyr}D \quad (5.12)$$

Acetaldeído:

$$\frac{dS_{acetald}}{dt} = (0,5R_3 - R_4 - R_5 - R_7)X - S_{acetald}D \quad (5.13)$$

Etanol:

$$\frac{dP_{etOH}}{dt} = (1,045R_5 - R_7)X - P_{etOH}D \quad (5.14)$$

Células Totais:

$$\frac{dX}{dt} = (0,732R_6 + 0,850R_7 - D)X \quad (5.15)$$

Componentes Sintéticos:

$$\frac{dX_A}{dt} = 0,732R_6 + 0,850R_7 - R_8 - R_9 - R_{10} - (0,732R_6 + 0,850R_7)X_A \quad (5.16)$$

Componentes estruturais:

$$\frac{dX_P}{dt} = R_8 - (0,732R_6 + 0,850R_7)X_P \quad (5.17)$$

Enzimas Respiratórias:

$$\frac{dX_{ACDH}}{dt} = R_9 - (0,732R_6 + 0,850R_7)X_{ACDH} \quad (5.18)$$

Enzimas Fermentativas:

$$\frac{dX_{ALDH}}{dt} = R_{10} - (0,732R_6 + 0,850R_7)X_{ALDH} \quad (5.19)$$

Modelo Estruturado

Quadro IV – Valores dos parâmetros cinéticos do modelo de Rotboll

Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
k_1	$0,469 \text{ h}^{-1}$	S_{1e}	146,4 mg/L
k_2	$0,262 \text{ h}^{-1}$	S_{5e}	57,57 mg/L
k_3	$8,08 \text{ h}^{-1}$	S_{8e}	1,98 g/L
k_4	0	S_{9e}	9595 mg/L
k_5	1414 h^{-1}	S_{10e}	0,1683 mg/L
k_6	$1,14 \text{ h}^{-1}$	k_{1e}	$29,29 \text{ h}^{-1}$
k_8	$0,378 \text{ h}^{-1}$	k_{4e}	$1,262 \text{ h}^{-1}$
k_9	$0,0287 \text{ h}^{-1}$	k_{8e}	$0,0036 \text{ h}^{-1}$
k_{10}	$0,00229 \text{ h}^{-1}$	k_{10e}	$0,891 \text{ h}^{-1}$
S_1	12,1 mg/L	k_{1i}	6,435 kg/kg
S_2	0,495 mg/L	m_2	3,465 kg/kg
S_3	80,8 mg/L	m_{2e}	3,465 kg/kg
S_4	$9,9 \times 10^{-4} \text{ mg/L}$	k_{41}	9900 kg/kg
S_5	356 mg/L	k_{5i}	1980 kg/kg
S_6	18,1 mg/L	k_{5r}	0,303 kg/kg
S_8	20,2 mg/L	k_{9i}	2727 kg/kg
S_9	$9,9 \times 10^{-4} \text{ mg/L}$	k_{10i}	505 kg/g

5.1) MODELO INTRACELULAR

STREMEL (2001) desenvolveu um modelo estruturado, baseado no modelo de ROTBOLL & JORGENSEN (1993), para um sistema de produção de etanol constituído de um reator tipo torre com células imobilizadas (Figura 08).

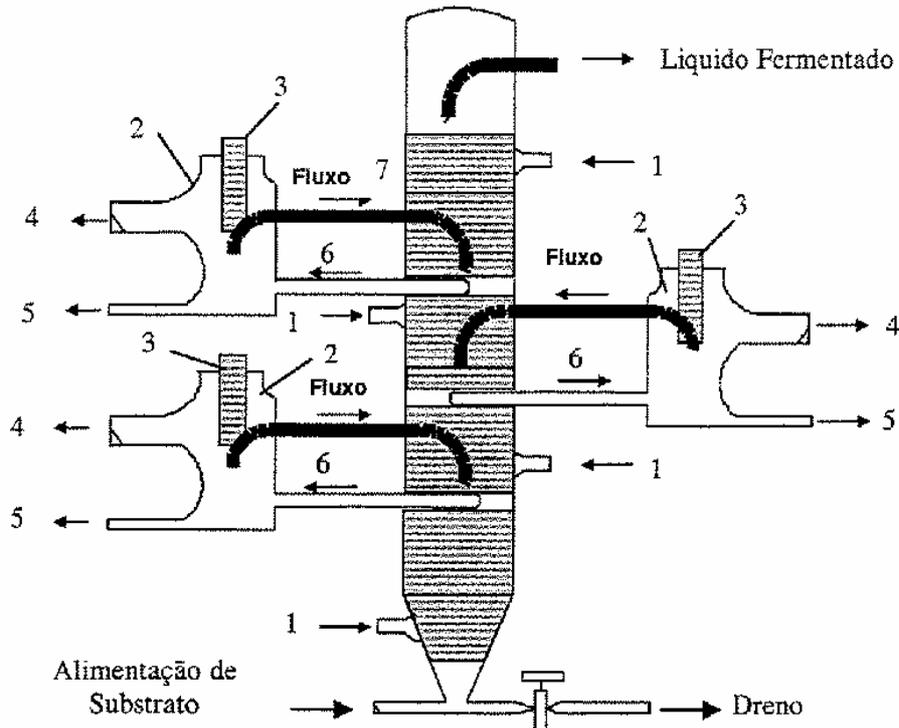
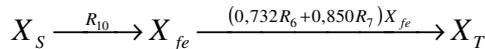
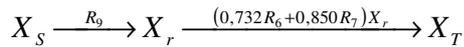
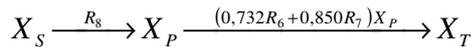
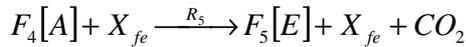
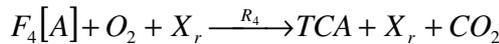
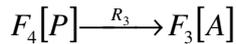
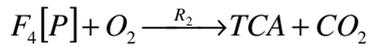
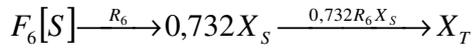
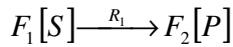


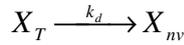
Figura 8: Biorreator tipo torre com células imobilizadas com separadores externos de gás para produção de etanol, onde: (1) Alimentação e retirada de pellets; (2) Separador gás-líquido; (3) sensor indutivo; (4) saída de CO₂; (5) Retirada de amostras; (6) Líquido fermentado; (7) Líquido fermentado sem fluxo de CO₂.

Modelo Estruturado

Alguns termos reacionais que aparecem no modelo são semelhantes a cinética de Michaelis Mentem. Os componentes A (acetaldeído), E (etanol), P (piruvato), S (substrato) correspondem às substâncias que se difundem para dentro e para fora da célula. TCA corresponde à rota respiratória do ciclo do ácido cítrico, responsável pela conversão completa do substrato a CO_2 e H_2O . Neste caso o mecanismo é aeróbico e menos significativo no processo de fermentação etanólica. As variáveis X_r e X_f correspondem a todas as enzimas da rota respiratória e fermentativa, respectivamente. X_s representa todos componentes intracelulares responsáveis pelas atividades celulares de respiração, fermentação e constituição dos componentes X_p , os quais são responsáveis pela parte estrutural e genética da célula.

A seqüência de reações conforme STREMEEL (2001), que representam as rotas metabólicas respiratória e fermentativa envolvidas no processamento do substrato pelo *Saccharomyces cerevisiae* em uma célula bicompartimentalizada, são representadas através das reações a seguir:





Onde, F_1, F_2, F_3, F_5, F_6 são constantes estequiométricas a serem ajustadas para as rotas glicolítica e respiratória, as quais são fornecidas em termos de $g[]/X_s$ e $F_4 = 1g[]/X_s$. A fração sintética X_s (g/g massa seca) é responsável pelas reações metabólicas da síntese, fermentação e respiração.

O modelo desenvolvido por STREMEL (2001) adaptado para o sistema de produção de etanol deste trabalho é apresentado a baixo. Os primeiros termos das equações abaixo se referem ao termo relacionado à difusão do etanol, substrato, piruvato e acetaldeído. Considera-se que estes componentes se difundem para dentro e para fora da célula.

Balço de massa na célula

Substrato:

$$\frac{\partial S}{\partial t} = \frac{D_s}{R^2} \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial S}{\partial r} \right) - (F_1 R_1 + F_6 R_6) \exp(-K_E E_f) X \quad (5.1.1)$$

Acetaldeído:

$$\frac{\partial A}{\partial t} = \frac{D_s}{R^2} \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial A}{\partial r} \right) + (F_3 R_3 - R_4 - R_5 - R_7) \exp(-K_E E_f) X \quad (5.1.2)$$

Etanol:

$$\frac{\partial E}{\partial t} = \frac{D_s}{R^2} \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial E}{\partial r} \right) + (F_5 R_5 - R_7) \exp(-K_E E_f) X \quad (5.1.3)$$

Piruvato:

$$\frac{\partial P}{\partial t} = \frac{D_s}{R^2} \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial P}{\partial r} \right) + (F_2 R_1 - R_2 - R_3) \exp(-K_E E_f) X \quad (5.1.4)$$

Modelo Estruturado

Nas equações acima r é a posição radial adimensional na partícula, R é o raio da partícula e D é a difusividade intraparticular, que depende da substância considerada.

Componentes Sintéticos:

$$\frac{\partial X_s}{\partial t} = R_{6-7} - R_{8-10} - R_{6-7}X_s \quad (5.1.5)$$

Componentes Estruturais:

$$\frac{\partial X_p}{\partial t} = R_8 - R_{6-7}X_p \quad (4.1.6)$$

Enzimas Respiratórias:

$$\frac{\partial X_r}{\partial t} = R_9 - R_{6-7}X_r \quad (5.1.7)$$

Enzimas Fermentativas:

$$\frac{\partial X_f}{\partial t} = R_{10} - R_{6-7}X_f \quad (5.1.8)$$

Células Totais:

$$\frac{\partial X_t}{\partial t} = R_{6-7}X_T \left(1 - \frac{X_t}{X_{sat}}\right) \exp(-K_E' E_f) - k_d X_t \quad (5.1.9)$$

Taxas reacionais:

$$R_{8-10} = R_8 + R_9 + R_{10} \quad (4.1.10)$$

$$R_{6-7} = 0,732R_6 + 0,850R_7 \quad (5.1.11)$$

As equações a seguir (5.1.12 – 5.1.21) são as mesmas apresentadas anteriormente (5.1 – 5.10), porém com algumas alterações na nomenclatura visando facilitar implementação no programa.

$$R_1 = \frac{k_1 S(X_s)}{S + S_1} + \frac{k_1 SA(X_s)}{S(1 + k_1 A) + S_{1e}} \quad (5.1.12)$$

$$R_2 = \frac{k_2 P(X_s)}{(P(m_2 A + 1) + S_2)(m_{2e} S + 1)} \quad (5.1.13)$$

$$R_3 = \frac{k_3 P(X_s)}{P + S_3} \quad (5.1.14)$$

$$R_4 = k_4 A (k_{4e} - (k_{4i} S + 1)^{-1}) (X_r)(X_s)(A + S_4)^{-1} \quad (5.1.15)$$

$$R_5 = k_5 \left(A - \frac{k_{5r} E}{1 + k_{5i} A} \right) (X_f)(X_s)(A + S_5 + S_{5e} E)^{-1} \quad (5.1.16)$$

$$R_6 = \frac{k_6 S(X_s)}{S + S_6} \quad (5.1.17)$$

$$R_7 = \frac{k_4 A (X_r)(X_s)}{(A + S_4)(k_{4i} S + 1)} \quad (5.1.18)$$

$$R_8 = \frac{k_8 S(X_s)}{S + S_8} + \frac{k_{8e} E(X_s)}{E + S_{8e}} \quad (5.1.19)$$

$$R_9 = k_9 \left(\frac{S}{S + S_9} + \frac{E}{E + S_{9e}} \right) (X_s)(k_{9i} S^2 + 1)^{-1} \quad (5.1.20)$$

$$R_{10} = \frac{k_{10} (X_s)}{k_{10i} S^2 + 1} + \frac{k_{10e} A(X_s)}{A + S_{10e}} \quad (5.1.21)$$

Modelo Estruturado

Quadro V – Valores dos parâmetros cinéticos utilizados inicialmente na simulação do modelo estruturado de Rotboll e Jorgensen adaptado

Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
k ₁	0,469 h ⁻¹	S _{10e}	0,1683 mg/L
k ₂	0,262 h ⁻¹	k _{1e}	29,29 h ⁻¹
k ₃	8,08 h ⁻¹	k _{4e}	1,262 h ⁻¹
k ₄	0	k _{8e}	0,0036 h ⁻¹
k ₅	1414 h ⁻¹	k _{10e}	0,891 h ⁻¹
k ₆	1,14 h ⁻¹	k _{1i}	6,435 kg/kg
k ₈	0,378 h ⁻¹	m ₂	3,465 kg/kg
k ₉	0,0287 h ⁻¹	m _{2e}	3,465 kg/kg
k ₁₀	0,00229 h ⁻¹	k _{4i}	9900 kg/kg
S ₁	12,1 mg/L	k _{5i}	1980 kg/kg
S ₂	0,495 mg/L	k _{5r}	0,303 kg/kg
S ₃	80,8 mg/L	k _{9i}	2727 kg/kg
S ₄	9,9 x 10 ⁻⁴ mg/L	k _{10i}	505 kg/g
S ₅	356 mg/L	K _E	0,06 L/g
S ₆	18,1 mg/L	K _{E'}	0,06 L/g
S ₈	20,2 mg/L	k _d	0,0008 h ⁻¹
S ₉	9,9 x 10 ⁻⁴ mg/L	F ₁	2,222
S _{1e}	146,4 mg/L	F ₂	1,3
S _{5e}	57,57 mg/L	F ₃	0,45
S _{8e}	1,98 g/L	F ₅	2,4
S _{9e}	9595 mg/L	F ₆	1,222
		C	0,8

Condições de contorno (célula)

Simetria no centro ($r = 0$):

$$\frac{\partial S}{\partial r} = \frac{\partial P}{\partial r} = \frac{\partial A}{\partial r} = \frac{\partial E}{\partial r} = 0 \quad (5.1.22)$$

Transferência de massa na superfície ($r = 1$):

$$\frac{\partial S}{\partial r} = Bi_{M,S} [S_f - S] \quad Bi_{M,S} = \frac{km_s R}{D_s} \quad (5.1.23)$$

$$\frac{\partial P}{\partial r} = Bi_{M,P} [P_f - P] \quad Bi_{M,P} = \frac{km_p R}{D_p} \quad (5.1.24)$$

$$\frac{\partial A}{\partial r} = Bi_{M,A} [A_f - A] \quad Bi_{M,A} = \frac{km_A R}{D_A} \quad (5.1.25)$$

$$\frac{\partial E}{\partial r} = Bi_{M,E} [E_f - E] \quad Bi_{M,E} = \frac{km_E R}{D_E} \quad (5.1.26)$$

Bi_M é o número de Biot mássico, que representa a relação a resistência interna à difusão de um determinado soluto e a resistência à convecção mássica associada ao meio externo que envolve o soluto (CREMASCO,1998).

Transferência de massa:

Os coeficientes de transferência de massa foram considerados para cada componente, visto que cada componente se difunde com velocidade própria. Para obter cada coeficiente de transferência de massa são necessários o número de Schmidt, o fator Chilton-Colburn e o número de Reynolds.

STREMEL (2001) cita que várias correlações para estimativa destes coeficientes podem ser encontradas em BIRD *et al.*(1960), RYU *et al.* (1984), CREMASCO (1998) e STREMEL (1994). As correlações utilizadas neste trabalho serão aquelas propostas por STREMEL (2001), apresentadas a seguir.

Coefficiente de transferência de massa:

$$km_{[]} = J_d u (Sc_{[]})^{-2/3} \quad (5.1.27)$$

Número de Schmidt

$$Sc_{[]} = \frac{\mu'}{\rho D_{[]}} \quad (5.1.28)$$

Relação para cálculo de J_D (Fator Chilton-Colburn)

$$J_D = 1,82(\text{Re}^{-0,51}) \quad (5.1.29)$$

Onde [] representa um determinado componente.

Difusividade intraparticular:

Estas correlações foram sugeridas por STREMEL (1994) e depois estendidas às outras substâncias por STREMEL (2001).

Substrato:

$$D_{[s]} = 2,142 \times 10^{-4} [e^{-0,00199[s]}] \quad (5.1.30)$$

Acetaldeído, etanol, piruvato:

$$D_{[A,E,P]} = 1,64 \times 2,142 \times 10^{-4} [e^{-0,00199[A,E,P]}] \quad (5.1.31)$$

Condições iniciais

O Quadro VI apresenta as condições iniciais, ou seja, no tempo zero. Considerou-se que os componentes estavam presentes na célula numa concentração inicial diferente de zero. Assumiu-se isto para evitar problemas numéricos em algumas equações.

Quadro VI– Valores para concentração inicial na célula para simulação do modelo estruturado de Rotboll e Jorgensen adaptado

Variável	Valor Inicial
S (substrato)	1g/L
P (piruvato)	10^{-3} g/L
A (acetaldeído)	10^{-3} g/L
E (etanol)	10^{-3} g/L
X_T (concentração)	21,0gms/L
X_S (componentes)	0,35g/g
X_P (componentes)	0,63g/g
X_r (enzimas)	0,01un/mL
X_f (enzimas)	0,01un/mL

5.2) REDUÇÃO DE MODELO

É interessante para aplicação prática em engenharia, propor formulações mais simples do sistema de equações diferenciais parcial original, através da redução do número de variáveis independentes do mesmo. Diferentes níveis de aproximações, reduções, gerando formulações diferenciais agregadas são investigadas, começando com a técnica de redução clássica em direção da técnica baseada nas fórmulas de integração de Hermite. Estas técnicas promovem uma formulação aproximada para descrever perfis axiais como uma função do tempo de conveniente eliminação explícita da dependência na variável radial. Isto é alcançado pela definição de novas variáveis dependentes baseadas nos valores radiais médios em qualquer posição.

STREMEL (1994) utilizou várias técnicas de redução a modelos estruturados e observou que todas foram satisfatórias entre si. Notou-se que a redução do modelo proporciona um ganho de velocidade de processamento em alguns casos, mas a principal vantagem acaba sendo na redução da complexidade de modelagem. Dentre os modelos testados, o modelo reduzido de Rotboll foi empregado no trabalho, pois além de se ajustar melhor aos dados experimentais,

Modelo Estruturado

sem perda de informações na forma reduzida, contém mais detalhes do fenômeno intracelular.

5.3) MODELO ESTRUTURADO REDUZIDO DE ROTBOLL E JORGENSEN

Com a aplicação das técnicas de redução ao modelo bidimensional foi gerado um modelo unidimensional. Devido à redução, as variáveis aparecem agora como variáveis radiais médias (subscrito m).

Substrato:

$$\frac{dS_m}{dt} = 3 \frac{D_S}{R^2} Bi_{M,S}^* (S_f - \lambda S_m) - (F_1 R_{m1} + F_6 R_{6m}) \exp(-K_E E_f) X_m \quad (5.3.1)$$

Acetaldeído:

$$\frac{dA_m}{dt} = 3 \frac{D_A}{R^2} Bi_{M,A}^* (A_f - \lambda A_m) + (F_3 R_{3m} - R_{4m} - R_{5m} - R_{7m}) \exp(-K_E E_f) X_m \quad (5.3.2)$$

Etanol:

$$\frac{dE_m}{dt} = 3 \frac{D_E}{R^2} Bi_{M,E}^* (E_f - \lambda E_m) + (F_5 R_{5m} - R_{7m}) \exp(-K_E E_f) X_m \quad (5.3.3)$$

Piruvato:

$$\frac{dP_m}{dt} = 3 \frac{D_P}{R^2} Bi_{M,P}^* (P_f - \lambda P_m) + (F_2 R_{1m} - R_{2m} - R_{3m}) \exp(-K_E E_f) X_m \quad (5.3.4)$$

Componentes Sintéticos:

$$\frac{dX_{Sm}}{dt} = R_{6m-7m} - R_{8m-10m} - R_{6m-7m} X_{Sm} \quad (5.3.5)$$

Componentes Estruturais:

$$\frac{dX_{Pm}}{dt} = R_{8m} - R_{6m-7m} X_{Pm} \quad (5.3.6)$$

Enzimas Respiratórias:

$$\frac{dX_{rm}}{dt} = R_{9m} - R_{6m-7m} X_{rm} \quad (5.3.7)$$

nzimas Fermentativas:

$$\frac{dX_{fm}}{dt} = R_{10m} - R_{6m-7m} X_{fm} \quad (5.3.8)$$

Células Totais:

$$\frac{dX_{tm}}{dt} = R_{6m-7m} X_{tm} \left(1 - \frac{X_{tm}}{X_{sat}}\right) \exp(-K'_E E_{fm}) - k_d X_{tm} \quad (5.3.9)$$

Taxas reacionais:

$$R_{8m-10m} = R_{8m} + R_{9m} + R_{10m} \quad (5.3.10)$$

$$R_{6m-7m} = 0,732R_{6m} + 0,850R_{7m} \quad (5.3.11)$$

$$R_{1m} = \frac{k_1 S_m (X_{sm})}{S_m + S_1} + \frac{k_1 S_m A_m (X_{sm})}{S_m (1 + k_{i1} A_m) + S_{1e}} \quad (5.3.12)$$

$$R_{2m} = \frac{k_2 P_m (X_{sm})}{(P_m (m_2 A_m + 1) + S_2)(m_{2e} S_m + 1)} \quad (5.3.13)$$

$$R_{3m} = \frac{k_3 P_m (X_{sm})}{P_m + S_3} \quad (5.3.14)$$

$$R_{4m} = k_4 A_m (k_{4e} - (k_{4i} S_m + 1))^{-1} (X_{rm})(X_{sm})(A_m + S_4)^{-1} \quad (5.3.15)$$

$$R_{5m} = k_5 \left(A_m - \frac{k_{5r} E_m}{1 + k_{5i} A_m} \right) (X_{fm})(X_{sm})(A_m + S_5 + S_{5e} E_m)^{-1} \quad (5.3.16)$$

$$R_{6m} = \frac{k_6 S_m (X_{sm})}{S_m + S_6} \quad (5.3.17)$$

$$R_{7m} = \frac{k_4 A_m (X_{rm})(X_{sm})}{(A_m + S_4)(k_{4i} S_m + 1)} \quad (5.3.18)$$

$$R_{8m} = \frac{k_8 S_m (X_{sm})}{S_m + S_8} + \frac{k_{8e} E_m (X_{sm})}{E_m + S_{8e}} \quad (5.3.19)$$

$$R_{9m} = k_9 \left(\frac{S_m}{S_m + S_9} + \frac{E_m}{E_m + S_{9e}} \right) (X_{sm})(k_{9i} S_m^2 + 1)^{-1} \quad (5.3.20)$$

Modelo Estruturado

$$R_{10m} = \frac{k_{10}(X_{sm})}{k_{10i}S_m^2 + 1} + \frac{k_{10e}A_m(X_{sm})}{A_m + S_{10e}} \quad (5.3.21)$$

Os valores de $Bi_{M,[]}^*$ e λ dependem da técnica de redução aplicada. Para a redução de Hermite, aproximação $H_{1,1}$ tem-se:

$$Bi_{M,[]}^* = \frac{RK_{TM[]}}{D_{[]}} \quad \text{e} \quad \lambda = \frac{2}{3} \quad (5.3.22)$$

6) OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS

Os parâmetros utilizados são primeiramente consultados em bibliografias, e estes muitas vezes são estimados por métodos computacionais ou mesmo elaborados experimentalmente. Quando se pretende utilizar os valores destes parâmetros numa nova condição operacional, precisa-se analisar um por um, ou seja, se as condições para determinação destes parâmetros são as mesmas que serão empregadas no estudo em questão. Assim, visto que estes parâmetros foram adaptados para uma nova condição operacional, realizou-se a otimização destes parâmetros através da metodologia descrita por RIVERA *et al* (2006).

Segundo RIVERA *et al* (2005) a estimativa de parâmetros cinéticos de modelos determinísticos é complexo, principalmente devido a não linearidade, grande número de parâmetros e interação entre eles. Assim, a otimização, segundo estes autores, é melhor avaliada usando um procedimento com diferentes técnicas de otimização.

O procedimento para otimização descrito por RIVERA *et al* (2005) utiliza diferentes técnicas de otimização: Real Coded Genetic Algorithm (RGA- Algoritmo Genético), metodologia Plackett-Burman e o algoritmo Quase-Newton.

A metodologia, conforme RIVERA *et al* (2005), para estimativa dos parâmetros consiste em quatro passos para estimar os parâmetros cinéticos do modelo estruturado. Primeiramente valores iniciais foram encontrados na literatura. Em seguida, aplicou-se o Real Coded Genetic Algorithm (RGA- Algoritmo Genético de codificação real), para uma estimativa simultânea de parâmetros. No terceiro passo, o parâmetro mais significativo é identificado usando o Plackett-Burman (PB). E finalmente, um algoritmo Quase-Newton é utilizado para otimização dos parâmetros mais significativos, aproximando a região global ótima, enquanto o valor inicial foi determinado sempre através do algoritmo genético de busca global.

Esta técnica foi utilizada para otimizar os 43 parâmetros cinéticos do modelo estruturado em estudo, sendo eles: $k_1, k_2, k_3, k_4, k_5, k_6, k_8, k_9, k_{10}, s_1, s_2, s_3, s_4, s_5, s_6, s_8, s_9, s_{1e}, s_{5e}, s_{8e}, s_{9e}, s_{10e}, k_{1e}, k_{4e}, k_{8e}, k_{10e}, KE, KE_2, k_{1i}, m_2, m_{2e}, k_{4i}, k_{5i}, k_{5r}, k_{9i}, k_{10i}, kd, F_1, F_2, F_3, F_5, F_6, C$.

6.1) OBTENÇÃO DOS VALORES INICIAIS DOS PARÂMETROS

Os valores iniciais foram obtidos de STREMEL (2001). Os valores dos parâmetros apresentados por este autor são adaptados de ROTBOLL e JORNGENSEN (1993) para um processo de fermentação visando à obtenção do etanol, ou seja, a rota metabólica no sentido deste produto (etanol).

6.2) OTIMIZAÇÃO POR RGA

O Algoritmo genético utilizado neste trabalho foi a versão livre escrita em FORTRAN de um RGA (Real-Coded Genetic Algorithm- Algoritmo genético de codificação real) desenvolvido por YEDDER (2002), adaptado para as necessidades específicas de otimização dos parâmetros.

Os cromossomos ou indivíduos são vetores onde estão localizados valores reais (genes) para cada parâmetro desconhecido do modelo cinético.

O critério de parada é selecionado quando o número máximo de interações fixas é encontrado.

Os parâmetros do RGA foram ajustados para minimizar o número de interações necessárias para encontrar um valor satisfatório da função objetivo minimizando a equação (6.2.1), que reflete uma boa concordância entre concentrações medidas e as concentrações calculadas pelo modelo.

Na otimização pelo algoritmo genético (RGA) θ representa o vetor para os 43 parâmetros. O objetivo da otimização é encontrar um valor para θ que minimize a função objetivo, $\min E(\theta)$.

$$E(\theta) = \sum_{n=1}^{np} \left[\frac{(S_n - Se_n)^2}{Se_{max}^2} + \frac{(P_n - Pe_n)^2}{Pe_{max}^2} \right] = \sum_{n=1}^{np} \epsilon_n(\theta) \quad (6.2.1)$$

Onde Se_n e Pe_n são as concentrações de substrato e etanol medidas no tempo n . S_n e P_n são as concentrações encontradas pelo modelo no tempo n . Se_{max} e Pe_{max} são as concentrações máximas e o termo np é o número de pontos. $\epsilon_n(\theta)$ é erro.

Os principais aspectos técnicos do algoritmo genético são apresentados no Quadro VII

Quadro VII: Principais aspectos técnicos usados no algoritmo genético.

Opção escolhida - RGA	Parâmetros	Valores dos parâmetros
Niching, elitismo, cruzamento baricêntrico, mutação não uniforme.	Número de parâmetros do modelo (tamanho do indivíduo)	43
	Tamanho da população	10
	Probabilidade de cruzamento	0,9
	Probabilidade de mutação	0,03

6.3) IDENTIFICAÇÃO DOS PARÂMETROS MAIS SIGNIFICATIVOS

Nesta etapa foi aplicado a metodologia de Plackett-Burman (PB) para identificar os parâmetros cinéticos que são significativos no problema de otimização. A influência dos 43 parâmetros na Equação (6.2.1) foi investigada com esta metodologia. Quatro variáveis foram designadas como variáveis inertes porque não afetam as demais, mas elas são usada para dar um estímulo no erro padrão para cada fator. Cada parâmetro é testado em dois níveis, um alto (+) e um baixo (-), que foram determinados após a otimização pelo RGA. O planejamento PB contém 47 ensaios.

6.4) OTIMIZAÇÃO FINAL POR ALGORITMO QUASE NEWTON

As estimativas simultâneas dos parâmetros cinéticos selecionados no passo anterior foram efetuados utilizando o Algoritmo Quase Newton, enquanto todos outros parâmetros permaneceram fixados na região ótima global, calculado pelo RGA. A Rotina DNCONF da biblioteca IMSL do FORTRAN foi utilizada. Para implementar o problema de otimização como um problema de programação não linear:

Minimizar equação (6.2.1)

Sujeito a: $I_p \leq x_p \leq u_p$ $p = 1, \dots, 5$

Onde x_p são os parâmetros. I_p e u_p são especificamente menores e maiores limites dos parâmetros, com $I_p \leq u_p$

6.5) RESULTADO DA OTIMIZAÇÃO

Os valores iniciais dos parâmetros para o modelo cinético são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores dos parâmetros cinéticos utilizados inicialmente segundo Stremel (2001)

Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
k ₁	0,469 h ⁻¹	S _{10e}	0,1683 mg/L
k ₂	0,262 h ⁻¹	k _{1e}	29,29 h ⁻¹
k ₃	8,08 h ⁻¹	k _{4e}	1,262 h ⁻¹
k ₄	0	k _{8e}	0,0036 h ⁻¹
k ₅	1414 h ⁻¹	k _{10e}	0,891 h ⁻¹
k ₆	1,14 h ⁻¹	k _{1i}	6,435 kg/kg
k ₈	0,378 h ⁻¹	m ₂	3,465 kg/kg
k ₉	0,0287 h ⁻¹	m _{2e}	3,465 kg/kg
k ₁₀	0,00229 h ⁻¹	k _{4i}	9900 kg/kg
S ₁	12,1 mg/L	k _{5i}	1980 kg/kg
S ₂	0,495 mg/L	k _{5r}	0,303 kg/kg
S ₃	80,8 mg/L	k _{9i}	2727 kg/kg
S ₄	9,9 x 10 ⁻⁴ mg/L	k _{10i}	505 kg/g
S ₅	356 mg/L	K _E	0,06 L/g
S ₆	18,1 mg/L	K _{E'}	0,06 L/g
S ₈	20,2 mg/L	k _d	0,0008 h ⁻¹
S ₉	9,9 x 10 ⁻⁴ mg/L	F ₁	2,222
S _{1e}	146,4 mg/L	F ₂	1,3
S _{5e}	57,57 mg/L	F ₃	0,45
S _{8e}	1,98 g/L	F ₅	2,4
S _{9e}	9595 mg/L	F ₆	1,222
		C	0,8

Os novos valores, otimizados pelo RGA, são apresentados na Tabela 2

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos otimizados pelo RGA

Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
k ₁	0,469 h ⁻¹	S _{10e}	168,26x10 ⁻³ mg/L
k ₂	0,262 h ⁻¹	k _{1e}	29,262 h ⁻¹
k ₃	8,112 h ⁻¹	k _{4e}	1,264 h ⁻¹
k ₄	2,467x10 ⁻³ h ⁻¹	k _{8e}	3,615x10 ⁻³ h ⁻¹
k ₅	1418,132	k _{10e}	0,892 h ⁻¹
k ₆	1,150	k _{1i}	6,435 kg/kg
k ₈	0,377	m ₂	3,477 kg/kg
k ₉	2,883x10 ⁻²	m _{2e}	3,476 kg/kg
k ₁₀	2,275x10 ⁻³	k ₄₁	9919,791kg/kg
S ₁	1,213x10 ⁻²	k _{5i}	1981,616 kg/kg
S ₂	4,920x10 ⁻⁴	k _{5r}	0,303 kg/kg
S ₃	8,072x10 ⁻²	k _{9i}	2716,006 kg/kg
S ₄	1,00x10 ⁻⁶	k _{10i}	504,813 kg/g
S ₅	0,358	K _E	5,092x10 ⁻² L/g
S ₆	1.801x10 ⁻² mg/L	K _{E'}	6,038x10 ⁻² L/g
S ₈	2.016x10 ⁻² mg/L	k _d	7,910x10 ⁻⁴ h ⁻¹
S ₉	1,0x10 ⁻⁶	F ₁	2,249
S _{1e}	0,147	F ₂	1,276
S _{5e}	5,770x10 ⁻²	F ₃	0,420
S _{8e}	1,978x10 ⁻³	F ₅	2,362
S _{9e}	9,558	F ₆	1,212
		C	1,098

Lembrando, que F₁, F₂, F₃, F₅, F₆ são constantes estequiométricas a serem ajustadas para as rotas glicolítica e respiratória, as quais são fornecidas em termos de g[]/X_s e F₄= 1g[]/X_s. A fração sintética X_s (g/g massa seca) é responsável pelas reações metabólicas da síntese, fermentação e respiração.

O Projeto Fatorial Fracionário de Placket-Burman (PB) é aplicado para identificar os parâmetros cinéticos mais importantes, isto é, aqueles que estão relacionados à variável dependente de interesse (resposta).

Considerando os valores otimizados pela RGA como ponto central no planejamento PB, os efeitos para todos os parâmetros (Equação 6.2.1 - resposta), para 95% de confiança foram calculados. Os efeitos dos parâmetros são apresentados na Tabela 3. Os parâmetros mais significativos são marcados em negrito.

Otimização do Processo

Tabela 3: Efeito estimado pela equação 6.2.1 dos resultados do PB

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(4)	P	-95%	95%
Mean	0.081860*	0.000503*	162.6241*	0.000000*	0.080462*	0.083258*
k1	0.000571	0.001007	0.5673	0.600833	-0.002224	0.003366
k2	0.000514	0.001007	0.5107	0.636455	-0.002281	0.003309
k3	0.000470	0.001007	0.4669	0.664869	-0.002325	0.003265
k4	-0.000473	0.001007	-0.4696	0.663097	-0.003268	0.002322
k5	0.000766	0.001007	0.7604	0.489370	-0.002030	0.003561
k6	-0.012757*	0.001007*	-12.6718*	0.000223*	-0.015552*	-0.009962*
k8	0.006145*	0.001007*	6.1039*	0.003645*	0.003350*	0.008940*
k9	-0.001227	0.001007	-1.2185	0.289984	-0.004022	0.001568
k10	0.001798	0.001007	1.7855	0.148728	-0.000998	0.004593
s1	0.000386	0.001007	0.3830	0.721203	-0.002410	0.003181
s2	0.000459	0.001007	0.4557	0.672248	-0.002336	0.003254
s3	-0.000939	0.001007	-0.9324	0.403912	-0.003734	0.001856
s4	0.000494	0.001007	0.4910	0.649146	-0.002301	0.003289
s5	-0.000230	0.001007	-0.2285	0.830464	-0.003025	0.002565
s6	-0.000306	0.001007	-0.3036	0.776569	-0.003101	0.002489
s8	-0.000521	0.001007	-0.5174	0.632173	-0.003316	0.002274
s9	0.000187	0.001007	0.1855	0.861863	-0.002608	0.002982
s1e	-0.000262	0.001007	-0.2601	0.807626	-0.003057	0.002533
s5e	-0.001247	0.001007	-1.2391	0.283046	-0.004043	0.001548
s8e	0.000423	0.001007	0.4202	0.695930	-0.002372	0.003218
s9e	-0.000205	0.001007	-0.2038	0.848458	-0.003000	0.002590
s10e	-0.001174	0.001007	-1.1664	0.308253	-0.003969	0.001621
k1e	-0.002425	0.001007	-2.4092	0.073619	-0.005221	0.000370
k4e	-0.000807	0.001007	-0.8013	0.467855	-0.003602	0.001988
k8e	0.001162	0.001007	1.1543	0.312646	-0.001633	0.003957
k10e	0.000644	0.001007	0.6396	0.557227	-0.002151	0.003439
KE	0.016200*	0.001007*	16.0913*	0.000087*	0.013405*	0.018995*
KE2	0.007588*	0.001007*	7.5369*	0.001660*	0.004793*	0.010383*
k1i	0.001114	0.001007	1.1065	0.330574	-0.001681	0.003909
m2	0.000628	0.001007	0.6235	0.566748	-0.002167	0.003423
m2e	0.000541	0.001007	0.5371	0.619683	-0.002254	0.003336
k4i	-0.000171	0.001007	-0.1696	0.873557	-0.002966	0.002624
k5i	0.000715	0.001007	0.7101	0.516848	-0.002080	0.003510
k5r	0.000108	0.001007	0.1071	0.919866	-0.002687	0.002903
k9i	-0.000721	0.001007	-0.7166	0.513234	-0.003517	0.002074
k10i	-0.000685	0.001007	-0.6808	0.533368	-0.003481	0.002110
kd	0.000506	0.001007	0.5027	0.641591	-0.002289	0.003301
F1	-0.024644*	0.001007*	-24.4788*	0.000017*	-0.027439*	-0.021849*
F2	0.022353*	0.001007*	22.2032*	0.000024*	0.019558*	0.025148*
F3	0.023282*	0.001007*	23.1265*	0.000021*	0.020487*	0.026077*
F5	0.021074*	0.001007*	20.9330*	0.000031*	0.018279*	0.023869*
F6	-0.002826*	0.001007*	-2.8074*	0.048445*	-0.005621*	-0.000031*
C	-0.000778	0.001007	-0.7726	0.482874	-0.003573	0.002017

* Significância para 95% de nível de confiança

Observam-se pela Tabela 3 que foram cinco os parâmetros mais significativos (KE, F1, F2, F3, F5), isto é, aqueles que tiveram maior efeito sobre o erro (Equação 6.2.1). Estes parâmetros foram novamente estimados pelo algoritmo Quase Newton, mostrados na Tabela 4, enquanto todos os outros parâmetros permaneceram fixos na região do ótimo global. A construção desta metodologia pode ser mais detalhada em RIVERA *et al.* (2005).

Tabela 4: Parâmetros reestimados pelo algoritmo Quasi Newton

Parâmetros	Valores dos parâmetros otimizados pelo QN
KE	5.099E-02
F1	2.244
F2	1.276
F3	0.435
F5	2.353

Pela análise computacional, no processo de otimização verificou-se que o algoritmo Quasi Newton teve sucesso em otimizar até cinco parâmetros (KE, F1, F2, F3, F5). Sabe-se que os algoritmos de otimização baseados em gradiente estão limitados a um pequeno número de parâmetros devido aos cálculos complexos de derivadas. No presente trabalho a complexidade do modelo estruturado contribuiu também a não convergência de um número maior de parâmetros. Porém os resultados da otimização utilizando somente 5 parâmetros foram satisfatórios.

O parâmetro F_1 influi de forma mais significativa, pois é o que regula o substrato, ajustando ao consumo necessário da rota fermentativa, passando pela etapa intermediária de formação de piruvato, acetaldeído e redução deste a etanol.

Os perfis de etanol e substrato, para cada condição ótima foram calculados e são apresentados nas Figuras 9 e 10.

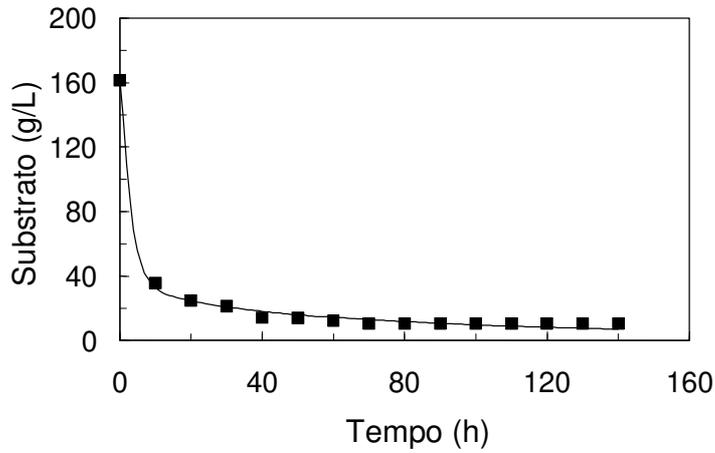


Figura 9- Gráfico da concentração de substrato em função do tempo: Experimental (■) e modelo (—)

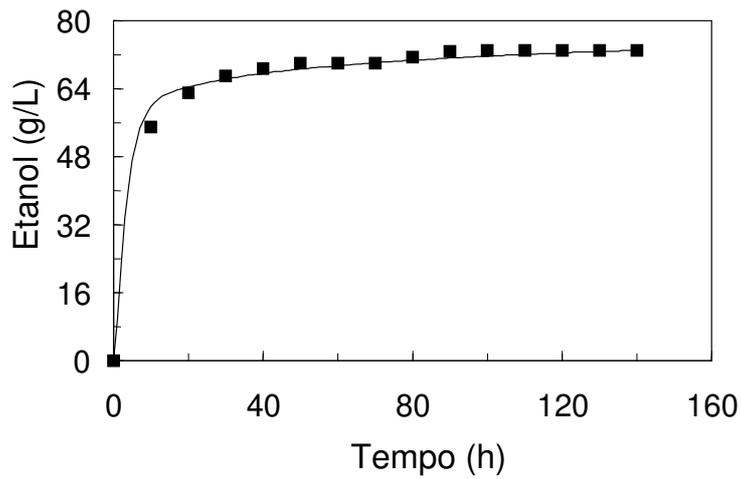


Figura 10- Gráfico da concentração de etanol em função do tempo: Experimental (■) e modelo (—)

Os resultados apresentados nas Figuras 9 e 10 mostram que o ajuste de parâmetros obtido está muito bom considerando os perfis de substrato e produto desejado (etanol). Desta forma assume-se que os parâmetros cinéticos para o modelo estruturado estão adequados possibilitando uma avaliação do processo através de simulação

7) OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO

A otimização do processo foi realizada utilizando a metodologia de análise de superfície de resposta e programação quadrática sucessiva.

O método de otimização por análise de superfície de resposta foi utilizado a princípio como uma pré-otimização, no sentido de direcionar a determinação dos valores iniciais que cumprem um papel importante na otimização utilizando algoritmos determinísticos. Um diagrama esquemático explicando todo o processo de otimização está representado na figura 11.

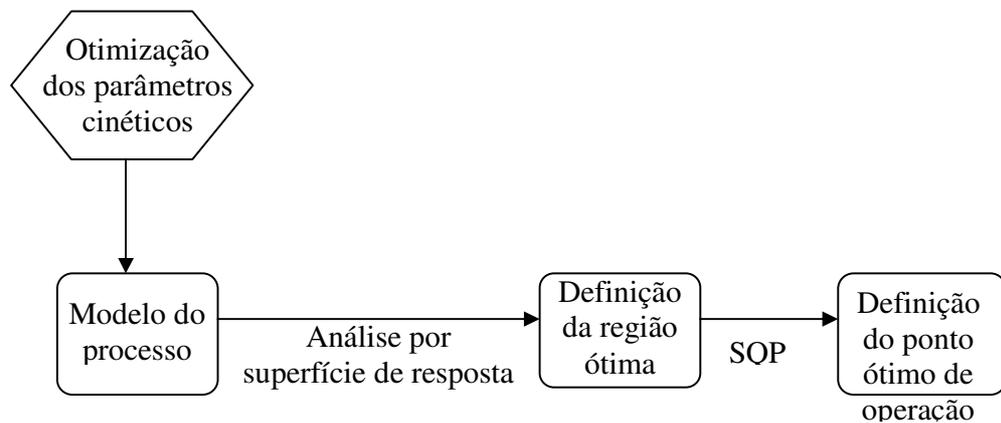


Figura 11: Diagrama Esquemático do processo de otimização

7.1) OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO POR ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

O método de otimização por análise de superfície de resposta foi aplicado ao processo fermentativo para produção de etanol estudado. Este método tem como base o planejamento fatorial, que consiste no estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas obtidas e um número de variáveis de entrada que possam ser controladas.

Otimização do Processo

As variáveis de entrada consideradas para a otimização do processo são: concentração de substrato (S_0) e vazão (Q), que são as variáveis de processo, e o diâmetro de partícula (Dpt) como uma variável de projeto. As variáveis de resposta consideradas foram a conversão e o rendimento, definidas da seguinte forma:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{e tan ol final}}{\text{substrato inicial}} \times \frac{100}{0,511}$$

$$\text{Conversão} = \frac{\text{substrato inicial} - \text{substrato final}}{\text{substrato inicial}}$$

Para aplicar este método de otimização primeiramente é necessário programar ensaios (simulações) através de um planejamento fatorial. Neste método selecionamos um número fixo de níveis para cada uma das variáveis de entrada. Então se executam simulações com todas as possíveis combinações.

Um planejamento fatorial em estrela de dois níveis (-1 e +1) com um ponto central foi aplicado. Como temos três variáveis de entrada obtemos um planejamento fatorial 2^3 , com um ponto central e com mais 6 simulações (pontos axiais), totalizando 15 simulações.

A Tabela 5 apresenta o planejamento experimental para o estudo do Rendimento e Conversão do processo fermentativo estudado.

Tabela 5: Faixa de valores no planejamento experimental para o estudo do Rendimento e Conversão do processo fermentativo, onde: Dpt: Diâmetro da partícula; Q: Vazão de alimentação e S_0 : Concentração inicial de substrato.

Nível	Dpt (dm)	Q(dm ³ /h)	S_0 (kg/m ³)
+1.68179 ^a	0.0549	0.06	280
+1	0.0475	0.052	253.6
0	0.0366	0.04	215
-1	0.0257	0.028	176.4
-1.68179 ^a	0.0183	0.02	150

^a $\pm 1.68179 = (2^3)^{1/4}$ (ponto axial)

A Tabela 6 apresenta o planejamento fatorial completo.

Tabela 6. Ensaios realizados no planejamento fatorial completo, onde: Dpt: Diâmetro da partícula; Q: Vazão de alimentação e S_0 : Concentração inicial de substrato.

Ensaio	Dpt (dm)	Q(dm ³ /h)	S ₀	Dpt (dm)	Q(dm ³ /h)	S ₀ (kg/m ³)
Valores Codificados			Valores decodificados			
1	-1	-1	-1	0.0257	0.028	176.4
2	-1	-1	1	0.0257	0.028	253.6
3	-1	1	-1	0.0257	0.052	176.4
4	-1	1	1	0.0257	0.052	253.6
5	1	-1	-1	0.0475	0.028	176.4
6	1	-1	1	0.0475	0.028	253.6
7	1	1	-1	0.0475	0.052	176.4
8	1	1	1	0.0475	0.052	253.6
9	-1.68179	0	0	0.0183	0.04	215.0
10	1.68179	0	0	0.0549	0.04	215.0
11	0	-1.68179	0	0.0366	0.02	215.0
12	0	1.68179	0	0.0366	0.06	215.0
13	0	0	-1.68179	0.0366	0.04	150.0
14	0	0	1.68179	0.0366	0.04	280.0
15	0	0	0	0.0366	0.04	215.0

A Tabela 7 apresenta os valores obtidos para o rendimento e conversão.

Otimização do Processo

Tabela 7. Ensaio realizados no planejamento composto central, onde: Dpt: Diâmetro da partícula; Q: Vazão de alimentação e S_0 : Concentração inicial de substrato.

Ensaio	Dpt	Q	S_0	Dpt	Q	S_0	Rend	Conv
	(dm)	(dm ³ /h)	(kg/m ³)	(dm)	(dm ³ /h)	(kg/m ³)	(%)	(%)
Valores Codificados				Valores Decodificados				
1	-1	-1	-1	0.0257	0.028	176.4	88.9	95.7
2	-1	-1	1	0.0257	0.028	253.6	61.9	66.6
3	-1	1	-1	0.0257	0.052	176.4	78.9	85.3
4	-1	1	1	0.0257	0.052	253.6	54.8	59.3
5	1	-1	-1	0.0475	0.028	176.4	84.3	90.9
6	1	-1	1	0.0475	0.028	253.6	58.6	63.2
7	1	1	-1	0.0475	0.052	176.4	73.5	79.5
8	1	1	1	0.0475	0.052	253.6	51.2	55.4
9	-1.68179	0	0	0.0183	0.04	215.0	69.5	75.0
10	1.68179	0	0	0.0549	0.04	215.0	62.6	67.6
11	0	-1.68179	0	0.0366	0.02	215.0	75.5	81.2
12	0	1.68179	0	0.0366	0.06	215.0	60.5	65.5
13	0	0	-1.68179	0.0366	0.04	150.0	93.6	99.3
14	0	0	1.68179	0.0366	0.04	280.0	50.9	55.0
15	0	0	0	0.0366	0.04	215.0	66.3	71.5

A partir dos dados da Tabela 7 e utilizando o “Software Statística 7.0” obtiveram-se os valores dos efeitos principais e de interação de cada variável para o rendimento e para a conversão.

Rendimento

A partir dos dados da Tabela 3 e utilizando o “Software Statística 7.0” obtiveram-se os valores dos efeitos principais e de interação de cada variável para o rendimento.

A estimativa dos efeitos principais e de interação sobre o rendimento do produto desejado (etanol) é apresentado na Tabela 8 onde se pode observar também os valores obtidos para o erro padrão, a estatística “t”, a probabilidade

”p”, os valores dos coeficientes das variáveis no modelo, o coeficiente de correlação R^2 (porcentagem de variação explicada) e o nível de confiança. Os valores em negrito indicam que o efeito é significativo para o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Tabela 8. Efeito estimado para o rendimento obtido através de um planejamento fatorial completo (Tabela 07)

	Efeito	Erro Padrão	t(5)	p	-95%	+95%	Coef.
Média	66,2603*	0,27186*	243,729*	0,00000*	65,5614*	66,9591*	66,2603*
(1)Dpt (L)	-4,1838*	0,14799*	-28,270*	0,00001*	-4,5643*	-3,8034*	-2,0919*
Dpt (Q)	-0,1004	0,22229	-0,452	0,670405	-0,6719	0,4710	-0,0502
(2)Q (L)	-8,8663*	0,14799*	-59,910*	0,00000*	-9,2468*	-8,4859*	-4,4332*
Q (Q)	1,2545*	0,22229*	5,643*	0,00242*	0,6831*	1,8259*	0,6272*
(3)S ₀ (L)	-25,035*	0,14799*	-169,17*	0,00000*	-25,416*	-24,6554*	-12,5179*
S ₀ (Q)	4,2888*	0,22229*	19,293*	0,00000*	3,7174*	4,8603*	2,1444*
1L e 2L	-0,3099	0,193363	-1,603	0,16988	-0,8070	0,1871	-0,1550
1L e 3L	0,7682*	0,19336*	3,973*	0,01060*	0,2711*	1,2652*	0,3841*
2L e 3L	1,6064*	0,19336*	8,308*	0,00041*	1,1094*	2,1035*	0,8032*

* Significância para um nível de confiança de 95%; $R^2=0,99985$

Analisando os dados contidos na tabela 8 verifica-se que ao variar o diâmetro de partícula de 0,0257 dm para 0,0475dm obteve-se um efeito negativo, ou seja, a variável resposta rendimento diminui aproximadamente 4,1%. Para a vazão quando se passa do nível -1 (0,028 dm³/h) para o nível +1 (0,052 dm³/h) observa-se um decréscimo de aproximadamente 8,9 % no rendimento. A concentração de substrato inicial também apresenta um efeito negativo, em torno de 25% de diminuição no rendimento, quando se passa do nível -1 (176,4 Kg/m³) para o nível +1 (253.6 Kg/m³).

Ao analisarmos o planejamento não podemos avaliar apenas separadamente as variáveis. Isto significa que ao variar a vazão de -1 para +1 a mudança na

Otimização do Processo

resposta pode não ser a mesma, pois ela depende da variação da concentração de substrato e do diâmetro de partícula. Na Tabela 4 isto pode ser verificado através do efeito interação, que corresponde aos três últimos valores.

Através do gráfico de Pareto (Figura 12) podem-se visualizar melhor os efeitos principais e os de interação. Este gráfico apresenta uma estimativa dos efeitos de cada variável estatisticamente significativa no nível de confiança de 95%.

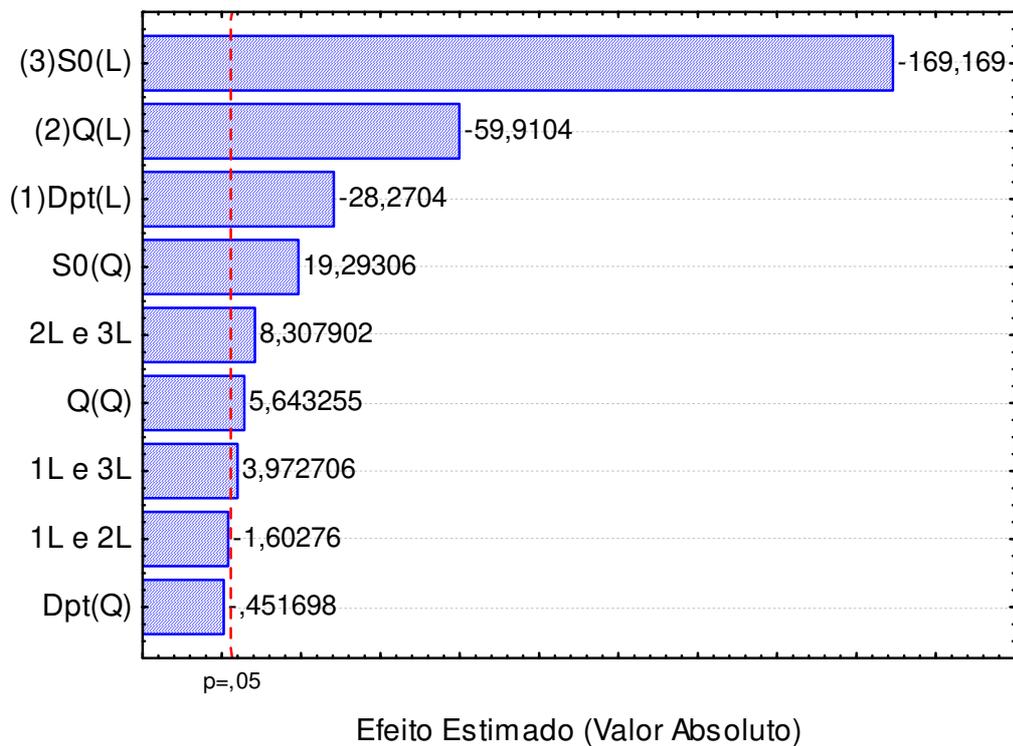


Figura 12. Gráfico de Pareto para o Rendimento

Pela Figura 12 verifica-se que apenas o diâmetro de partícula quadrático e a interação entre a vazão e o diâmetro de partícula não são significativos. Entre os demais efeitos nota-se a grande importância da concentração de substrato seguida pela vazão e diâmetro de partícula, na resposta (rendimento). Os valores negativos indicam que altos valores de rendimento podem ser obtidos através de baixos valores de vazão, concentração inicial de substrato e diâmetro de partícula.

O modelo obtido que relaciona o rendimento com a concentração de substrato, vazão e diâmetro de partícula é a equação de segundo grau descrita a seguir:

$$\text{Rendimento} = 66,260278 - 2,091915 * \text{Dpt} - 0,050206 * \text{Dpt}^2 - 4,433168 * \text{Q} + 0,627246 * \text{Q}^2 - 12,517936 * \text{S}_0 + 2,144418 * \text{S}_0^2 - 0,154957 * \text{Dpt} * \text{Q} + 0,384086 * \text{Dpt} * \text{S}_0 + 0,803219 * \text{Q} * \text{S}_0$$

A Tabela 9 (ANOVA) faz uma avaliação do desempenho do modelo obtido para o rendimento.

Tabela 9 Análise de variância para o modelo quadrático do rendimento obtido para o planejamento composto central, para 95% de nível de confiança.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de g.l.	Média quadrática	F valor
Regressão	2532,475	9	281,3861	3761,8462
Resíduos	0,374	5	0,0748	
Total	2532,849	14		

$$F_{0,95;9;5} = 4,772466 \text{ (valor tabelado)} \quad R^2 = 0,9999$$

Observa-se pela tabela 9 que a resposta apresenta alto coeficiente de correlação, o que significa que 99,99% das variações nos resultados obtidos podem ser explicados pelo modelo empírico.

O modelo pode ser considerado estatisticamente significativo de acordo com o teste F com 95% de nível de confiança. Para isto, foi comparado o F estimado a partir das simulações e o F tabelado. Observa-se que o F calculado (4,77) é muito maior que o F tabelado (3761,85). Segundo KALIL et al 2000, o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo se o F calculado for de 3 a 5 vezes maior que o F tabelado. Desta forma, pode-se afirmar que a quantidade de variação devido ao modelo é significativamente maior que a variação não explicada, atestando assim a validade do modelo obtido.

A precisão do modelo pode ser melhor visualizada pela Figura 13, onde são apresentados os valores observados experimentalmente e os valores preditos pelo modelo.

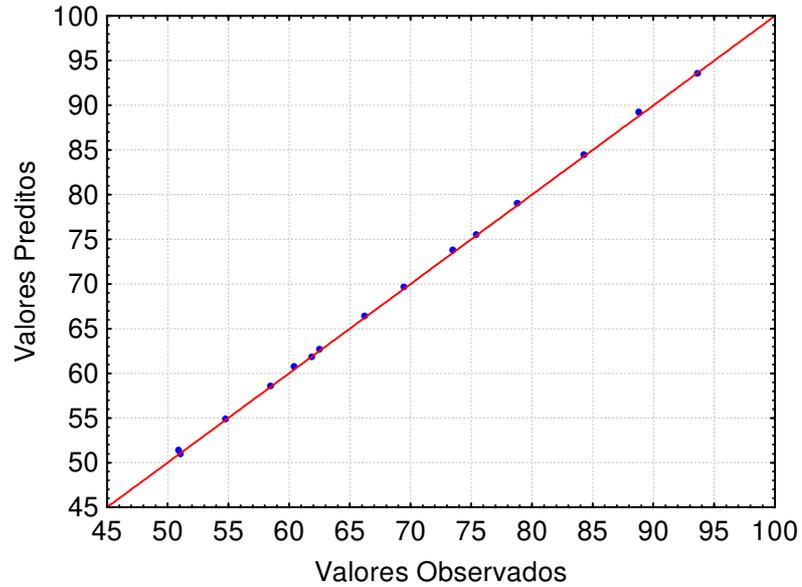


Figura 13. Valores Preditos versus Observados (Rendimento)

Assim, com o modelo quadrático válido, é possível gerar as superfícies de resposta e curvas de contorno que serão analisadas para definir as faixas ótimas de operação para otimização do rendimento.

As figuras 14, 15 e 16 a seguir apresentam as superfícies de resposta e as curvas de contorno para o rendimento.

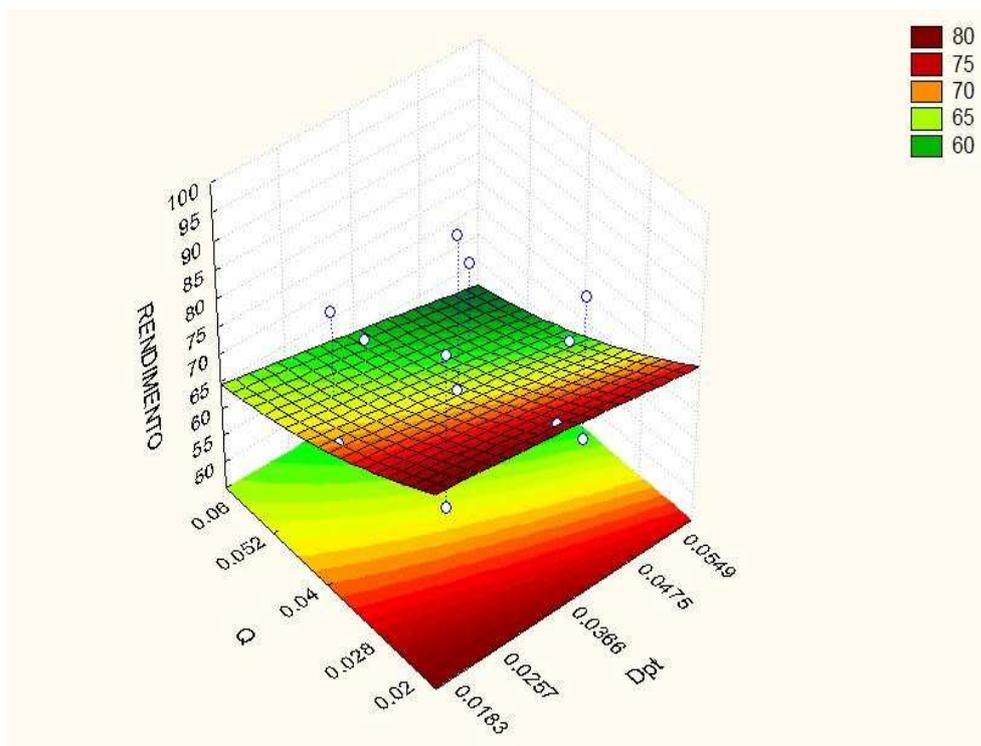
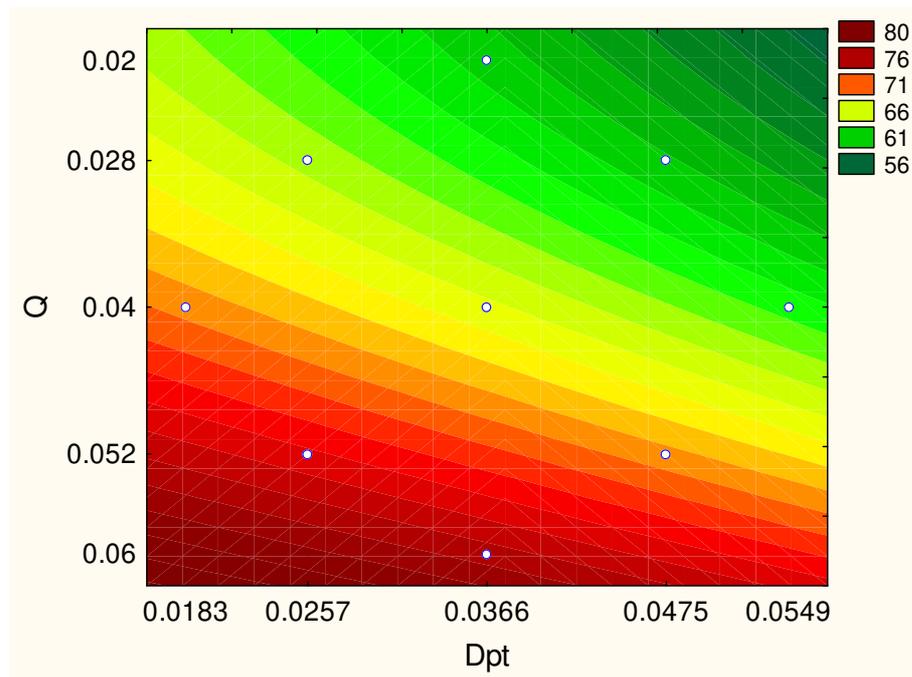


Figura 14. Superfície de resposta e diagrama de contorno do Rendimento como função de: Dpt e Q

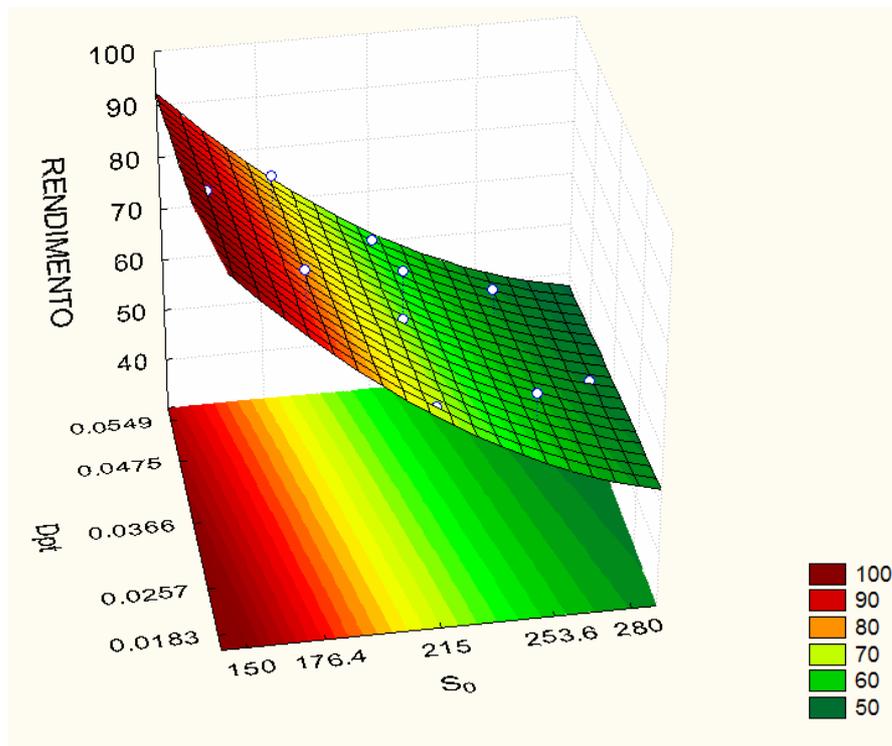
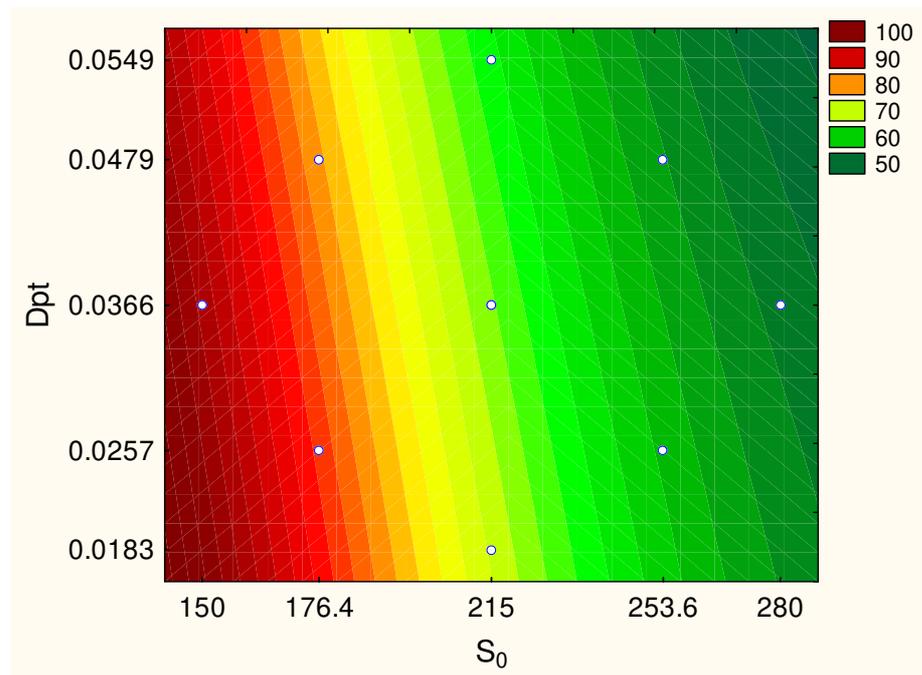


Figura 15. Superfície de resposta e diagrama de contorno do Rendimento como função de: Dpt e S_0

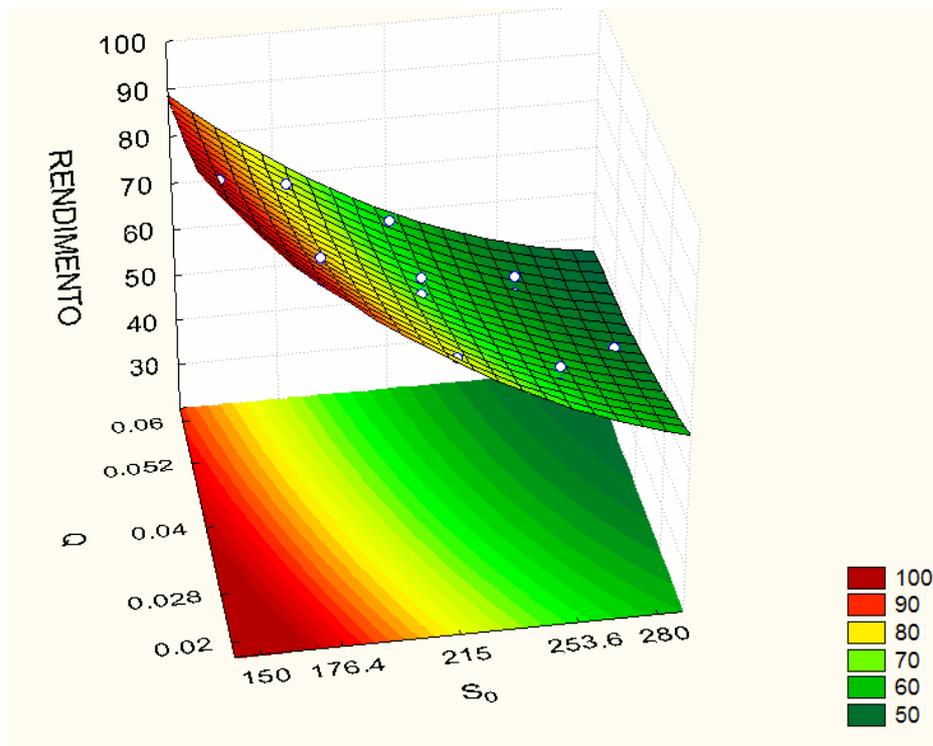
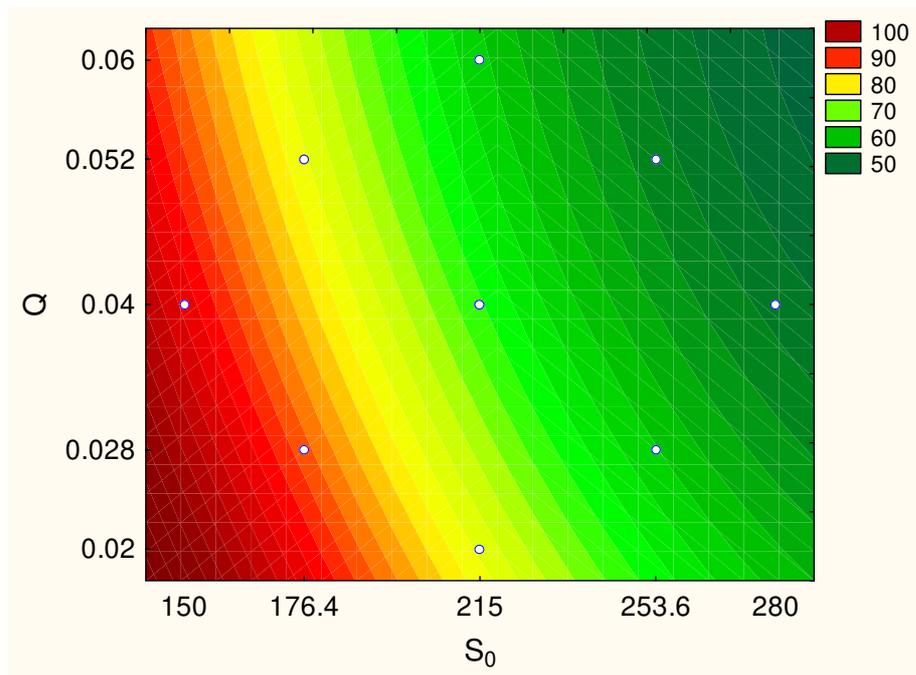


Figura 16. Superfície de resposta e diagrama de contorno do Rendimento como função de: Q e S_0

Otimização do Processo

Pela Figura 14 observa-se que quanto menor a vazão e menor o diâmetro de partícula maior o rendimento. Ou seja, quanto menor a vazão maior tempo de contato com os pellets, e quanto menor o diâmetro dos pellets, maior a concentração de células devido ao maior número de pellets, o que ocasiona uma maior área superficial total e maior a porosidade, aumentando também o rendimento.

Na Figura 15 observa-se que os melhores rendimentos são encontrados para baixas concentrações de substrato e baixos diâmetros de partícula. Ou seja, o diâmetro de partícula pode ser avaliado da mesma forma anterior, e quanto a concentração de substrato sabe-se que existe o efeito de inibição pelo substrato, havendo um ponto ótimo onde este efeito não se é notado. Desta forma, para cada processo existe uma concentração de substrato ótima onde se conseguem os melhores resultados.

Observando a Figura 16 pode-se verificar como a vazão e a concentração de substrato afetam o rendimento. Para menores vazões e menores concentrações de substrato obtemos o maior rendimento. Ou seja, quanto menor a vazão maior tempo de contato do substrato com as células e quanto menor a concentração de substrato, menor o efeito de inibição pelo substrato.

Conversão

A partir dos dados da Tabela 07 e utilizando o “Software Statistica 7.0” obtiveram-se os valores dos efeitos principais e de interação de cada variável para a conversão.

A estimativa dos efeitos principais e de interação sobre a conversão do produto desejado (etanol) é apresentado na Tabela 10 onde se pode observar também os valores obtidos para o erro padrão, a estatística “t”, a probabilidade “p”, os valores dos coeficientes das variáveis no modelo, o coeficiente de correlação R^2 (porcentagem de variação explicada) e o nível de confiança. Os valores em negrito indicam que o efeito é significativo para o intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Tabela 10 Efeito estimado para a conversão obtido através de um planejamento fatorial completo (Tabela 07)

	Efeito	E. Padrão	t(5)	p	-95%	+95%	Coef.
Média	0,714684*	0,003699*	193,219*	0,00000*	0,705176*	0,724192*	0,714684*
(1)Dpt (L)	-0,04463*	0,002014*	-22,164*	0,00000*	-0,049805*	-0,039453*	-0,02231*
Dpt (Q)	0,000701	0,003025	0,232	0,82596	-0,007074	0,008476	0,00035
(2)Q (L)	-0,09283*	0,002014*	-46,103*	0,00000*	-0,098006*	-0,087654*	-0,04642*
Q (Q)	0,014788*	0,003025*	4,889*	0,00452*	0,007013*	0,022563*	0,007394*
(3)S ₀ (L)	-0,26547*	0,002014*	-131,84*	0,00000*	-0,270643*	-0,260291*	-0,13273*
S ₀ (Q)	0,04153*	0,003025*	13,731*	0,000037*	0,033755*	0,049305*	0,020765*
1L e 2L	-0,00335	0,002631	-1,273	0,258907	-0,010112	0,003413	-0,001675
1L e 3L	0,00817*	0,002631*	3,107*	0,02663*	0,001412*	0,014938*	0,004088*
2L e 3L	0,01681*	0,002631*	6,391*	0,00139*	0,010050*	0,023575*	0,008406*

* Significância para um nível de confiança de 95%; $R^2=0.99975$

Analisando os dados contidos na tabela 06 verifica-se que ao variar o diâmetro de partícula de 0.0257 dm para 0.0475dm obtemos um efeito negativo, ou seja, a variável resposta conversão diminui aproximadamente 0,044%. Para a vazão quando se passa do nível +1 (0,052 dm³/h) para o nível -1 (0.028 dm³/h) observa-se um decréscimo de aproximadamente 0,093 % no rendimento. A concentração de substrato inicial também apresenta um efeito negativo, em torno de 0,26% de diminuição na conversão, quando se passa do nível +1 (176,4 Kg/m³) para o nível -1 (253.6 Kg/m³).

Ao analisarmos o planejamento não podemos avaliar apenas separadamente as variáveis. Isto significa que ao variar a vazão de -1 para +1 a mudança na resposta pode não ser a mesma, pois ela depende da variação da concentração de substrato e do diâmetro de partícula. Na Tabela 10 isto pode ser verificado através do efeito interação, que corresponde aos três últimos valores.

Através do gráfico de Pareto (Figura 17) podem-se visualizar melhor os efeitos principais e os de interação. Este gráfico apresenta uma estimativa dos

Otimização do Processo

efeitos de cada variável estatisticamente significativa no nível de confiança de 95%.

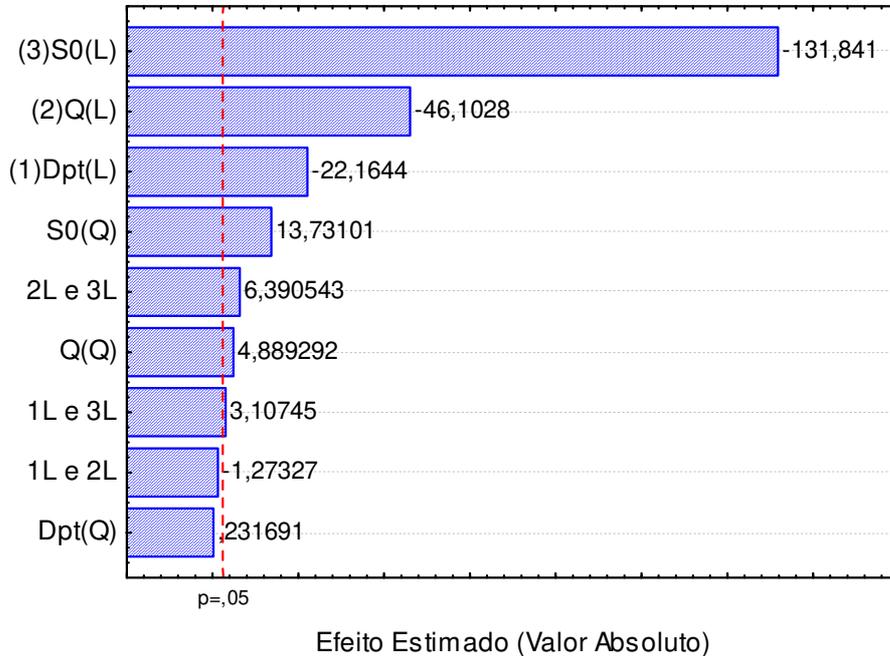


Figura 17. Gráfico de Pareto para a Conversão

Pela Figura 17 verifica-se que o diâmetro de partícula quadrático e as interações entre o diâmetro de partícula e a vazão e diâmetro de partícula e concentração inicial de substrato não são significativos. Entre os demais efeitos, da mesma forma que para o rendimento, nota-se a grande importância da concentração de substrato seguida pela vazão e diâmetro de partícula, na conversão. Os valores negativos indicam que altos valores para a conversão podem ser obtidos através de baixos valores de vazão, concentração inicial de substrato e diâmetro de partícula.

Comparando-se os efeitos para rendimento e conversão nota-se que os efeitos para a conversão são muito inferiores aos obtidos para o rendimento. Isto indica que as mudanças nos valores das variáveis dentro dos limites estudados afetam muito mais o rendimento, pouco influenciando na conversão.

O modelo obtido que relaciona a conversão com a concentração de substrato, vazão e diâmetro de partícula é a equação de segundo grau descrita abaixo:

$$\begin{aligned} \text{Conversão} = & 0.714684 - 0,022315 * \text{Dpt} + 0.000350 * \text{Dpt}^2 - 0.046415 * \text{Q} + \\ & 0.007394 * \text{Q}^2 - 0.132733 * \text{S}_0 + 0.020765 * \text{S}_0^2 - 0.001675 * \text{Dpt} * \text{Q} + 0.004088 \\ & * \text{Dpt} * \text{S}_0 + 0.008406 * \text{Q} * \text{S}_0 \end{aligned}$$

A Tabela 11 (ANOVA) faz uma avaliação do desempenho do modelo obtido para a conversão.

Tabela 11 Análise de variância para o modelo quadrático da conversão obtida para o planejamento composto central, para 95% de nível de confiança.

Fonte de variação	Soma quadrática	No de g.l.	Média quadrática	F valor
Regressão	0,281724	9	0,03130	2268,1159
Resíduos	0,000069	5	0,0000138	
Total	0,281793	14		

$$F_{0,95;9;5} = 4,772466 \text{ (valor tabelado)} \quad R^2 = 0,99975$$

Observa-se pela tabela 11 que a resposta apresenta um coeficiente de correlação (R^2) de 0,99975 o que significa que 99,98% das variações nos resultados obtidos podem ser explicados pelo modelo empírico.

O F estimado (2268,11) a partir das simulações é muito maior que o F tabelado (4,77) e o modelo pode ser considerado estatisticamente significativo da mesma forma que para o rendimento, conforme KALIL et al 2000. Assim, pode-se afirmar que a quantidade de variação devido ao modelo é significativamente maior que a variação não explicada, atestando assim a validade do modelo obtido.

A precisão do modelo pode ser melhor visualizada pela Figura 18 onde são apresentados os valores observados experimentalmente e os valores preditos pelo modelo.

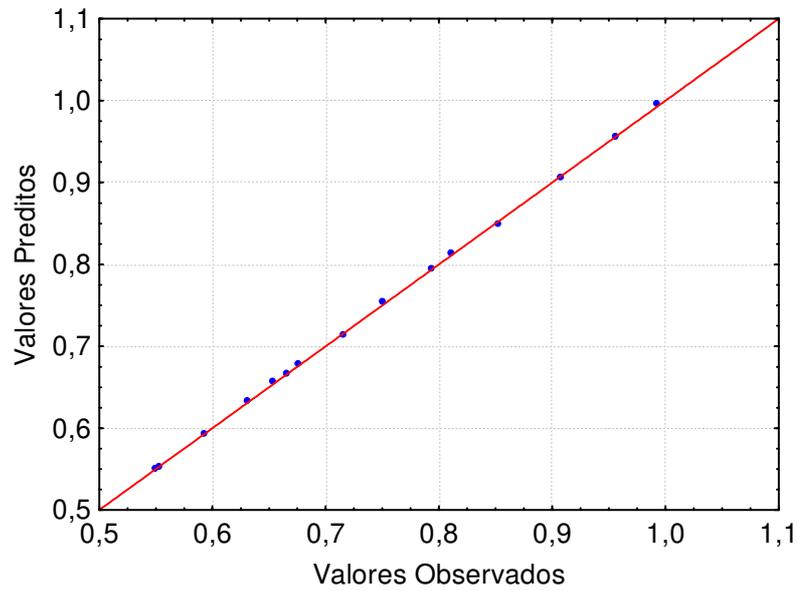


Figura 18. Valores Preditos versus Observados (Conversão)

Assim, com o modelo quadrático válido, é possível gerar as superfícies de resposta e curvas de contorno que serão analisadas para definir as faixas ótimas de operação para otimização da conversão.

As figuras 19, 20 e 21 a seguir apresentam as superfícies de resposta e as curvas de contorno para a conversão.

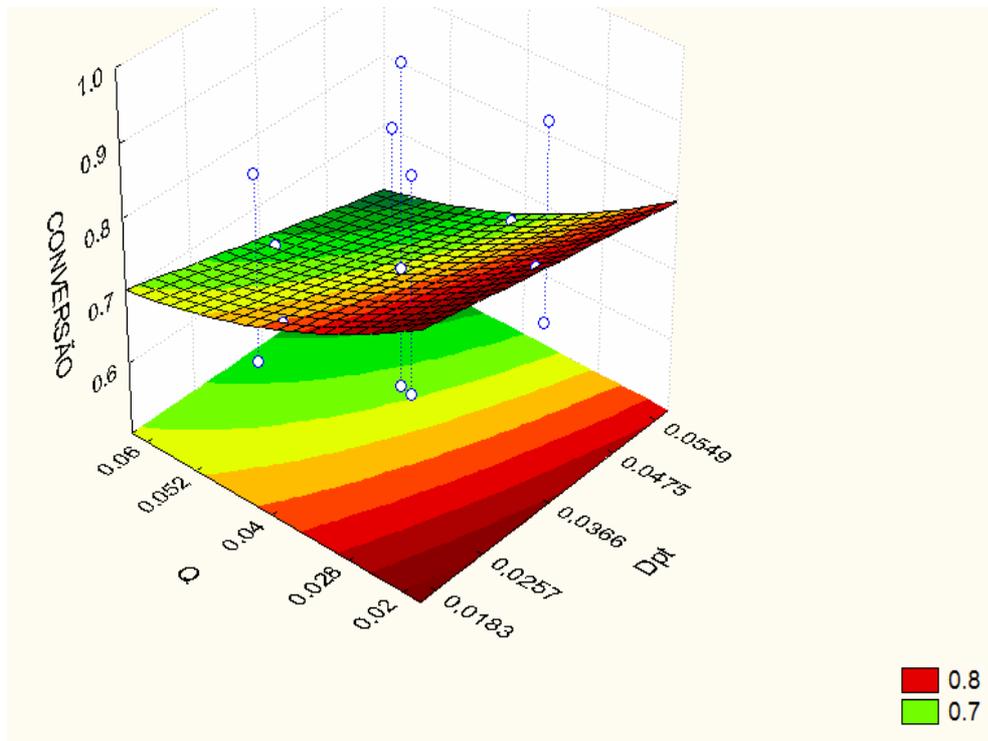
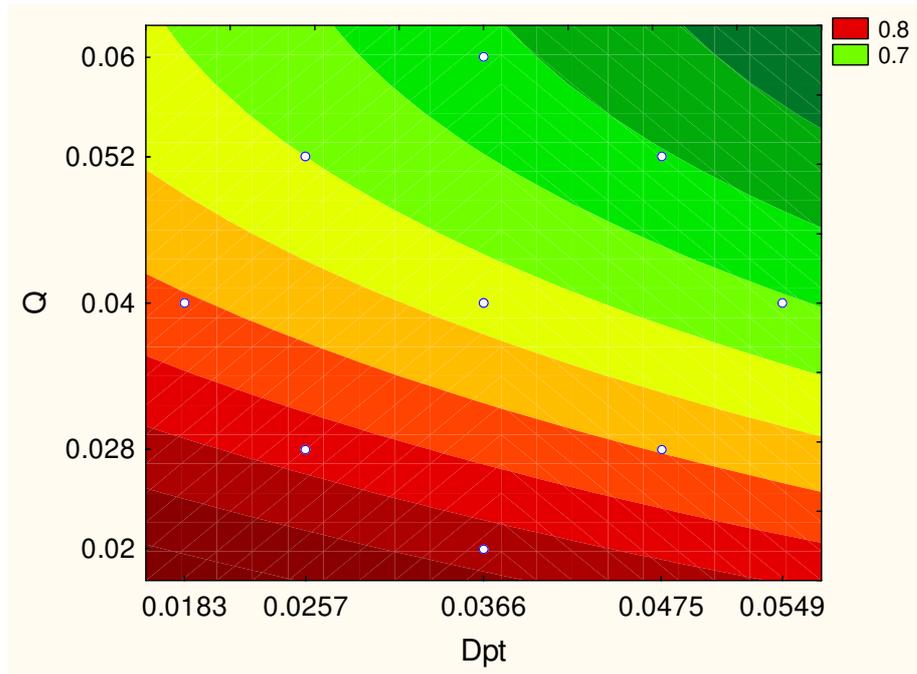


Figura 19. Superfície de resposta e diagrama de contorno da Conversão como função de: Dpt e Q

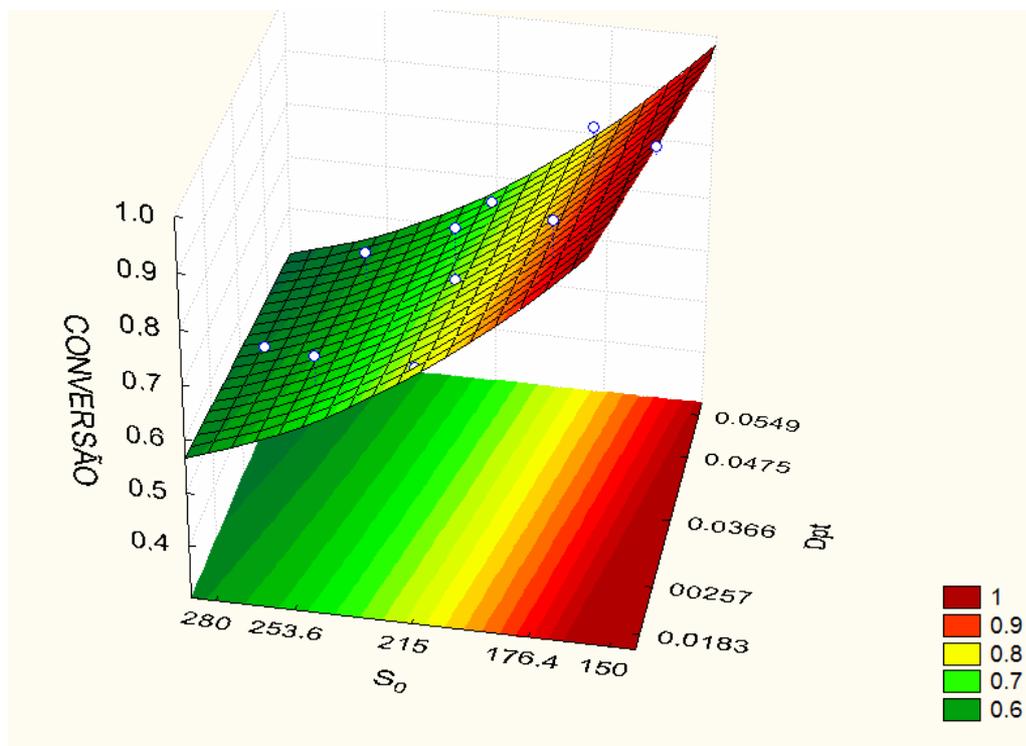
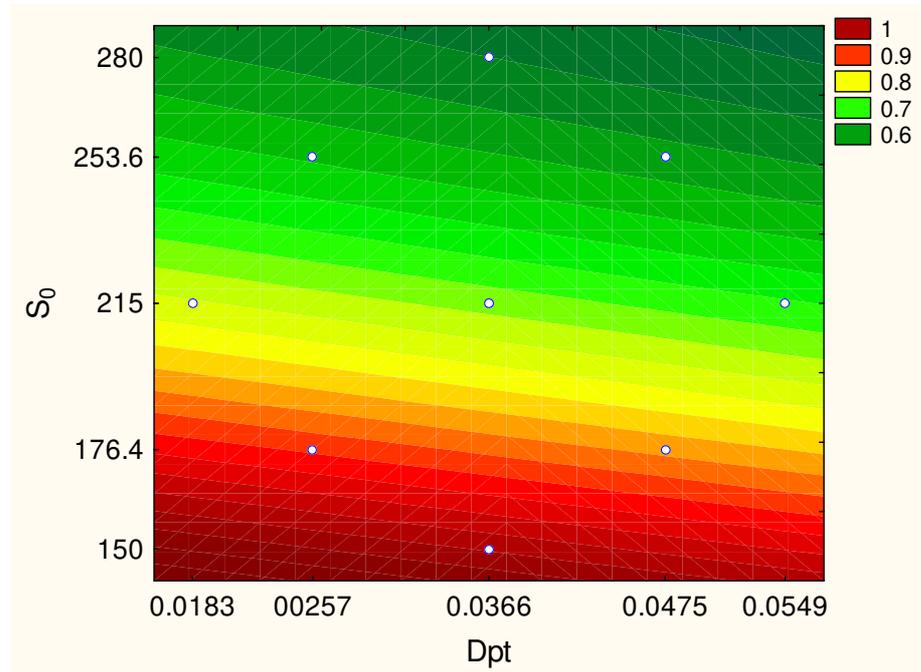


Figura 20. Superfície de resposta e diagrama de contorno da Conversão como função de: Dpt e S_0

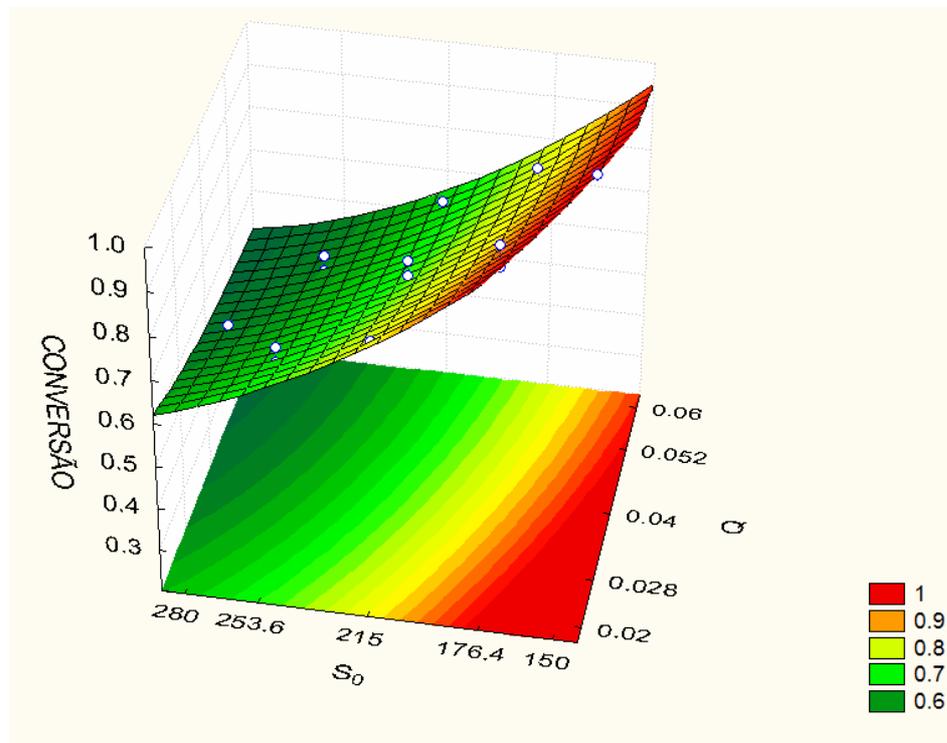
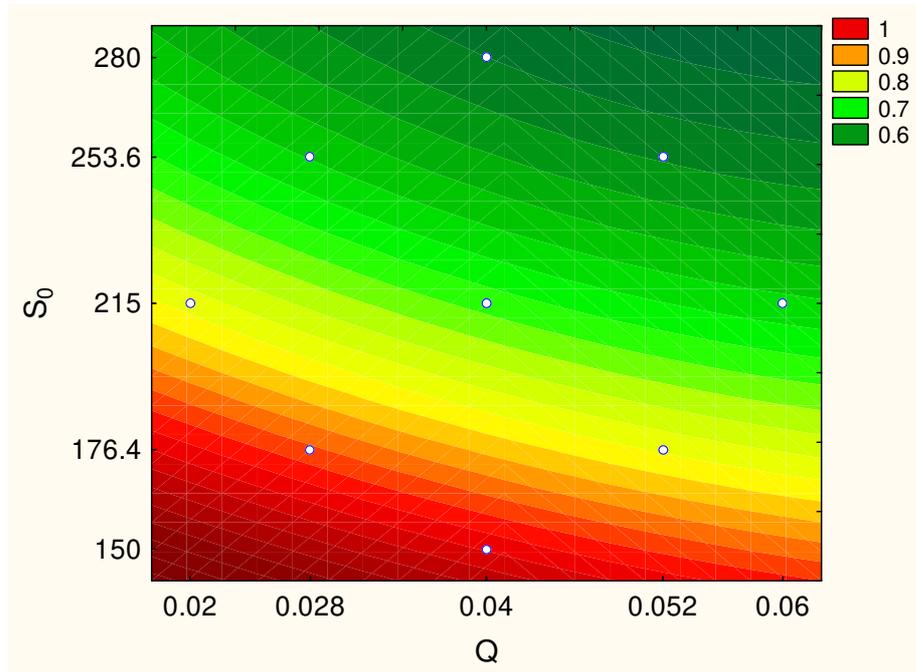


Figura 21. Superfície de resposta e diagrama de contorno da Conversão como função de: Q e S_0

Pela Figura 19 observa-se que quanto menor a vazão e menor o diâmetro de partícula maior a conversão. Na Figura 20 observa-se que para baixas concentrações de substrato e baixos diâmetros de partícula maior a conversão. E na Figura 21, verifica-se que para menores vazões e menores concentrações de substrato obtemos o maior rendimento.

A análise está coerente com aquela feita para o rendimento, onde temos que para menores vazões maior tempo de contato com os pellets, quanto menor o diâmetro dos pellets maior a concentração de células, pois o número de pellets será maior o que proporciona uma maior área superficial total e também maior porosidade, e para o substrato as concentrações menores evitam o efeito de inibição, aumentando assim o rendimento.

7.2) OTIMIZAÇÃO POR PROGRAMAÇÃO QUADRÁTICA SUCESSIVA

O objetivo desta etapa do trabalho é otimizar o processo de obtenção de etanol utilizando a técnica de otimização baseada em programação quadrática sucessiva (SQP)

A otimização foi conduzida quando o modelo determinístico atingiu o estado estacionário. Engloba todas as variáveis definidas no modelo matemático para o processo de fermentação alcoólica estudado (Equações 4.3.1 a 4.3.22).

Para resolver este problema de otimização foi utilizada a técnica de resolução de problemas não lineares por Programação Quadrática Sucessiva (SQP) através da sub-rotina DNCONF disponível na biblioteca eletrônica do IMSL do FORTRAN.

O programa em FORTRAN que simula o reator tipo torre com células imobilizadas para produção de etanol utiliza a sub-rotina DNCONF para resolver o problema de otimização do reator. A sub-rotina DNCONF requer informações sobre o número de variáveis a serem otimizadas (N), bem como os valores das estimativas iniciais das variáveis a serem otimizadas (XGUESS), dos limites inferiores (XLB) e superiores (XUB) destas variáveis. Requer um vetor de entrada (XSCALE) de tamanho igual ao número de variáveis, contendo a matriz de escalonamento diagonal para as variáveis, no qual todos os valores devem ser

maiores do que zero e, na ausência de maiores informações é igual a 1 (IMSL-FORTRAN). O otimizador DNCONF contém uma sub-rotina denominada FCN que resolve as equações do modelo, determina a função objetivo e define as restrições do problema de otimização. O otimizador DNCONF chama a sub-rotina FCN fornecendo os valores das estimativas iniciais das variáveis do reator e calcula os novos valores dessas variáveis através do conceito de programação quadrática sucessiva. Este procedimento é repetido até que os novos valores das variáveis consigam maximizar a função objetivo em estudo, sem violar a restrição imposta. A escolha da sub-rotina DNCONF foi devido a seu desempenho e facilidade de implementação conforme MELO (2003)

O processo de otimização foi feito em duas partes: uma onde se otimiza três variáveis, e outra onde se inclui mais duas variáveis totalizando cinco variáveis a serem otimizadas. Os próximos itens apresentam estes resultados.

7.2.1) Algoritmo SQP para otimização de três variáveis operacionais

O problema de otimização é para maximizar o rendimento. Assim, a função objetivo foi definida da seguinte forma:

$$\text{Maximizar Rendimento} \quad \text{Rendimento} = \frac{\text{etanol final}}{\text{substrato inicial}} \times \frac{100}{0,511}$$

Sujeito às restrições de igualdade descritas pelas equações de balanço de massa no estado estacionário para o reator e as restrições de desigualdade

$$conv > 0.99$$

$$D_{pt} (\text{Limite inferior}) < D_{pt} < D_{pt} (\text{Limite superior})$$

$$Q (\text{Limite inferior}) < Q < Q (\text{Limite superior})$$

$$S_0 (\text{Limite inferior}) < S_0 < S_0 (\text{Limite superior})$$

As variáveis de otimização são: Diâmetro de partícula (D_{pt}), concentração inicial de substrato (S₀) e vazão (Q).

Um dos principais fatores que contribuem para o custo da produção de etanol é o custo da matéria prima. Este custo pode ser reduzido se a eficiência de

Otimização do Processo

conversão for maximizada. Assim foi incluída uma restrição na conversão (conversão > 0,99).

Fez-se a otimização de dois casos, onde a diferença entre eles é o valor inicial (XGUESS) sendo 275 kg/m^3 e 180 kg/m^3 respectivamente.

Os resultados obtidos são apresentados nas tabelas 08 a 11.

Caso 1: Valor inicial para $S_0=275 \text{ kg/m}^3$

Os limites superior e inferior, assim como os valores iniciais utilizados no algoritmo SQP são apresentados na tabela a seguir.

Tabela 12: Valor inicial (XGUESS) e Limites inferior (XLB) e superior (XUB) utilizados na otimização utilizando o algoritmo SQP.

	Q(dm ³ /h)	Dpt (dm)	S ₀ (kg/m ³)
Valor inicial	0.04	0.0366	275
Limite inferior	0.025	0.03	160
Limite superior	0.06	0.05	280

Tabela 13: Valores das variáveis otimizadas (Q, Dpt e S₀), no modelo determinístico do processo de fermentação alcoólica, usando o algoritmo SQP.

Estado estacionário	Rend.	Conv	Q(dm ³ /h)	Dpt (dm)	S ₀ (kg/m ³)
90 horas	94.6049	0.997233	0.0250299	0.030	160.0119
100 horas	94.5939	0.997241	0.0250	0.030	160.9565

Caso 2: Valor inicial para $S_0=180 \text{ kg/m}^3$

Tabela 14: Valor inicial (XGUESS) e limites inferior (XLB) e superior (XUB) utilizados na otimização utilizando o algoritmo SQP.

	Q(dm ³ /h)	Dpt (dm)	S ₀ (kg/m ³)
Valor inicial	0.04	0.0366	180
Limite inferior	0.025	0.03	160
Limite superior	0.06	0.05	280

Tabela 15: Valores das variáveis otimizadas (Q, Dpt e S₀), no modelo determinístico do processo de fermentação alcoólica, usando o algoritmo SQP.

Estado estacionário	Rend.	Conv	Q(dm ³ /h)	Dpt (dm)	S ₀ (kg/m ³)
90 horas	92.5564	0.994168	0.025	0.030	164.9608
100 horas	94.9247	0.997695	0.025	0.030207	160.0

A diferença do Caso 1 e 2 é o valor inicial para o substrato (XGUESS), 275 e 180 (kg/m³), respectivamente. Os resultados para ambos os casos são os mesmos. Todas as variáveis têm que diminuir para se atingir Rendimento e Conversão maiores.

7.2.2) Algoritmo SQP para otimização de cinco variáveis operacionais

O problema de otimização também é para maximizar o rendimento. Assim, a função objetivo foi definida da seguinte forma:

$$\text{Maximizar Rendimento} \quad \text{Rendimento} = \frac{\text{etanol final}}{\text{substrato inicial}} \times \frac{100}{0,511}$$

Sujeito às restrições de igualdade descritas pelas equações de balanço de massa no estado estacionário para o reator e as restrições de desigualdade,

$$\text{conv} > 0.99$$

$$\text{Dpt (Limite inferior)} < \text{Dpt} < \text{Dpt (Limite superior)}$$

$$Q \text{ (Limite inferior)} < Q < Q \text{ (Limite superior)}$$

$$S_0 \text{ (Limite inferior)} < S_0 < S_0 \text{ (Limite superior)}$$

$$DR \text{ (Limite inferior)} < DR < DR \text{ (Limite superior)}$$

$$Z \text{ (Limite inferior)} < Z < Z \text{ (Limite superior)}$$

As variáveis de otimização são: Diâmetro de partícula (Dpt), concentração inicial de substrato (S₀), vazão (Q), diâmetro do reator (DR) e comprimento do reator (Z). Os resultados obtidos são apresentados a seguir.

Otimização do Processo

Caso 1: $S_0(XLB)=170 \text{ kg/m}^3$; $DR (XUB)=0.54 \text{ dm}$ e $Z(XUB)=1.94 \text{ dm}$

Na tabela abaixo (Tabela 16) são apresentados os valores iniciais para as cinco variáveis, assim como os limites inferior e superior utilizados para a busca. Os valores iniciais para diâmetro (DR) e comprimento (Z) de reator foram obtidos de STREMEL (2001).

Tabela 16: Valor inicial (XGUESS) e Limites inferior (XLB) e superior (XUB) utilizados na otimização utilizando o algoritmo SQP.

	Q(dm ³ /h)	Dpt (dm)	S ₀ (kg/m ³)	DR (dm)	Z (dm)
Valor inicial	0.04	0.0366	220	0.5	1.9
Limite inferior	0.025	0.03	170	0.45	1.85
Limite superior	0.06	0.05	280	0.54	1.94

Na tabela a seguir (Tabela 17) são apresentados os resultados das variáveis otimizadas.

Tabela 17: Valores das variáveis otimizadas (Q, Dpt, S₀, DR e Z), no modelo determinístico do processo de fermentação alcoólica, usando o algoritmo SQP.

Estado estacionário	Rend.	Conv	Q (dm ³ /h)	Dpt (dm)	S ₀ (kg/m ³)	DR (dm)	Z (dm)
90 horas	92.9353	0.99564	0.025	0.030	170.0	0.54	1.94
100 horas	93.3246	0.99616	0.025	0.030	170.0	0.54	1.94

Pela tabela acima se observou que para atingir melhores rendimentos e conversões é preciso trabalhar com valores maiores para comprimento e diâmetro de reator.

Caso 2: $S_0(XLB)=170 \text{ kg/m}^3$; $DR (XUB)=0.55 \text{ dm}$ e $Z(XUB)=1.95 \text{ dm}$

A seguir (Tabela 18) são apresentados os valores iniciais para as cinco variáveis, assim como os limites inferior e superior utilizados para a busca.

Tabela 18: Valor inicial (XGUESS) e Limites inferior (XLB) e superior (XUB) utilizados na otimização utilizando o algoritmo SQP.

	Q(dm ³ /h)	Dpt (dm)	S ₀ (kg/m ³)	DR (dm)	Z (dm)
Valor inicial	0.04	0.0366	220	0.5	1.9
Limite inferior	0.025	0.03	170	0.45	1.85
Limite superior	0.06	0.05	280	0.55	1.95

Tabela 19: Valores das variáveis otimizadas (Q, Dpt, S₀, DR e Z), no modelo determinístico do processo de fermentação alcoólica, usando o algoritmo SQP.

Estado estacionário	Rend.	Conv	Q(dm ³ /h)	Dpt (dm)	S ₀ (kg/m ³)	DR (dm)	Z(dm)
90 horas	93.5931	0.996558	0.025	0.030	170.0	0.55	1,95
100 horas	93.9434	0.996911	0.025	0.030	170.0	0.55	1.95

Observou-se pela Tabela 19 que melhores rendimentos e conversões foram alcançados para maiores valores de comprimento e diâmetro de reator.

Caso 3: $S_0(XLB)=170 \text{ kg/m}^3$; $DR (XUB)=0.55 \text{ dm}$ e $Z(XUB)=2.0 \text{ dm}$

Na Tabela 20 são apresentados os valores iniciais para as cinco variáveis, assim como os limites inferior e superior utilizados para a busca.

Tabela 20: Valor inicial (XGUESS) e Limites inferior (XLB) e superior (XUB) utilizados na otimização utilizando o algoritmo SQP.

	Q(dm ³ /h)	Dpt (dm)	S ₀ (kg/m ³)	DR (dm)	Z (dm)
Valor inicial	0.04	0.0366	210	0.5	1.9
Limite inferior	0.025	0.03	170	0.45	1.85
Limite superior	0.06	0.05	280	0.55	2.0

Otimização do Processo

Tabela 21: Valores das variáveis otimizadas (Q, Dpt, S₀, DR e Z), no modelo determinístico do processo de fermentação alcoólica, usando o algoritmo SQP.

Estado estacionário	Rend.	Conv	Q(dm ³ /h)	Dpt (dm)	S ₀ (kg/m ³)	DR (dm)	Z (dm)
90 horas	93.8121	0.996887	0.02533	0.030	170.0	0.55	2.0
100 horas	94.3375	0.997395	0.025	0.030	170.0	0.55	2.0

Como podem se observar pela tabela acima (Tabela 21), melhores rendimentos e conversões foram alcançados para maiores valores de comprimento e diâmetro de reator.

Caso 4: S₀(XLB)=170 kg/m³; DR (XUB)=0.55 dm e Z(XUB)=2.1 dm

Os valores iniciais para as cinco variáveis, assim como os limites inferior e superior utilizados para a busca, são apresentados na Tabela 22

Tabela 22: Valor inicial (XGUESS) e Limites inferior (XLB) e superior (XUB) utilizados na otimização utilizando o algoritmo SQP.

	Q(dm ³ /h)	Dpt (dm)	S ₀ (kg/m ³)	DR (dm)	Z (dm)
Valor inicial	0.04	0.0366	210	0.5	1.9
Limite inferior	0.025	0.03	170	0.45	1.85
Limite superior	0.06	0.05	280	0.55	2.1

Tabela 23: Valores das variáveis otimizadas (Q, Dpt, S₀, DR e Z), no modelo determinístico do processo de fermentação alcoólica, usando o algoritmo SQP.

Estado estacionário	Rend.	Conv	Q (dm ³ /h)	Dpt (dm)	S ₀ (kg/m ³)	DR (dm)	Z (dm)
90 horas	94.7332	0.997865	0.025	0.030	170.0	0.55	2.1
100 horas	94.9812	0.998048	0.025	0.030	170.0	0.55	2.0

Melhores rendimentos e conversões foram alcançados para maiores valores de comprimento e diâmetro de reator, como pode ser observados na Tabela 23.

Como foram vistos pelos resultados anteriores (seção 4.6.1), todas as variáveis têm que diminuir para se atingir Rendimento e Conversão maiores. Assim, fez-se a otimização utilizando valores maiores para o limite inferior da variável S_0 (de 160 kg/m^3 na seção 4.6.1 passou para 170 kg/m^3). Isto foi realizado, com o objetivo de se obter o mesmo rendimento e conversão, já observados, porém agora com substrato em concentração maior. O que se observou é que para se atingir valores de mesma magnitude para as estas duas resposta foi necessário aumentar a dimensão do reator. STREMELE (2001) utilizou dimensões de 0,5 dm para o diâmetro (DR) e 1,9 dm para o comprimento do reator (Z). Assim optou-se por otimizar os quatro casos apresentados acima: SQP para DR=0.54 e Z=1.94 (Caso 1), DR=0.55 e Z=1.95 (Caso 2), em seguida optou-se por fixar DR em 0.55 dm aumentar o valor de Z= 2.0 (Caso3) e Z=2.1 (Caso 4). Verificou-se que quando aumentamos as dimensões do reator obtemos maiores conversões e rendimentos.

8 – CONCLUSÕES

Neste trabalho foram considerados os parâmetros cinéticos como fatores de análise, além das variáveis operacionais mais relevantes.

Com o desenvolvimento deste trabalho foi possível determinar os parâmetros cinéticos que mais influenciam no processo fermentativo estudado, o que possibilita o melhor entendimento do processo, visto que se trata de um processo biotecnológico, onde ocorrem inúmeras reações até se chegar ao produto de interesse, o etanol. Os parâmetros foram otimizados utilizando a metodologia descrita no item 4.4 e através dos resultados obtidos observou-se que desta forma o modelo pode representar melhor os dados experimentais.

Através da otimização por análise de superfície, concluiu-se que as variáveis manipuláveis especificadas neste trabalho apresentam melhores resultados quando estão nos seus limites inferiores, os quais foram estabelecidos através do modelo de Stremel (2001) e os limites (inferior e superior) tirados da literatura que são baseados em valores utilizados em plantas industriais.

A metodologia por Superfície de Resposta mostrou-se uma ferramenta poderosa para otimização preliminar das variáveis operacionais do processo estruturado, de modo que seus resultados podem ser usados como estimativas iniciais para o procedimento formal de otimização, SQP.

A metodologia de Superfície de resposta possibilita visualização do comportamento das variáveis que se quer otimizar, identificando a região do ponto ótimo, o que não é possível pelo método SQP.

Apesar de o modelo estruturado ter uma maior complexidade foi possível otimizar o processo através do modelo determinístico, utilizando o SQP. Melhores resultados (Rendimento aproximadamente de 95% e conversões acima de 99%) foram obtidos quando se trabalha nas condições dos limites inferiores para Concentração inicial de substrato ($S_0=160 \text{ kg/m}^3$), vazão ($Q=0,025 \text{ dm}^3/\text{h}$) e diâmetro de partícula ($D_{pt}=0,03 \text{ dm}$). Para o caso de aumentar a concentração inicial de substrato, observou-se que para se conseguir resultados de mesma

Conclusões

magnitude para rendimento e conversão foi preciso incluir as dimensões do reator no processo de otimização. Assim, com as dimensões do projeto original (Stremel 2001) utilizando 170 kg/m^3 de concentração inicial de substrato, o rendimento fica abaixo daquele obtido anteriormente. Conforme se aumenta as dimensões do reator consegue-se alcançar os mesmos resultados.

Sendo assim, com este trabalho foi possível estudar o comportamento de um processo de fermentação alcoólica utilizando um modelo estruturado. Os resultados obtidos estão dentro do que se esperava e se era previsto, mostrando assim que as ferramentas utilizadas são de grande aplicação para o estudo do comportamento de processos de fermentação onde se aplica uma modelagem mais complexa.

9) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRIETTA, S. R.; MAUGERI, F. Optimum Design of a Continuous Fermentation Unit of an Industrial Plant for Alcohol Production. In: Galindo, E.; Ramires, O.T. (eds). *Advances in Bioprocess Engineering*, p. 47-52, 1994.
- BAILEY, J., & OLLIS, D. F., *Biochemical Engineering Fundamentals*. Segunda Edição, McgrawHill International Editions, ,1986.
- BARROS NETO, B.; SCARMINO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: Editora da Unicamp, 2001, 401p.
- BERG, C., *World ethanol production and trade*. www.agra-food-news.com
- BIEGLER, L. T. On the Simultaneous Solution and Optimization of Large Scale Eng. Systems. *Comput. Chem. Eng.*, vol. 12, p. 357-369, 1988.
- BIEGLER, L. T.; GORSSMANN, I. E.; WESTERBERG, A. W., *Systematic methods of chemical process design*. Prentice Hall, Upper Saddle River (NJ), 1997.
- BIRD, R. B., STEWART, W. E., LIGHTFOOT, E. N., *Transport Phenomena.*, John Wiley & Sons, New York, 1960.
- BOX, G. E. P., DRAPPER, N. R., *Empirical Model - Building and Resp. Surface*, New York: John Wiley & Sons, 1987.
- BOX, G. E. P., WILSON, K. B., On the experimental of optimum condition, *J. Royal Stat*, v. 13, 1951.
- BOX, G. E. P., HUNTER, S. W., HUNTER, J. S., *Stat. for Experimenters*, New York : John Wiley & Sons, 1978.
- BROOKE, A.; KENDRICK, D.; MEERAUS, A., *GAMS- A user's guide*, The Scientific Press, San Francisco (CA), 1992.
- CARVALHO, B.S.; ALVES, J.G.L.I.; MAUGERI FILHO, F., Modelagem de fermentação alcoólica em função da temperatura. In: *11º Simpósio*

- Nacional de Fermentação. Universidade Estadual de São Carlos, São Carlos, Brasil, v. 11, p. 658-663, 1996.*
- CREMASCO, M. A., Fundamentos de Transferências de Massa, Editora da Unicamp, Campinas, 1998.
- DALE, M.C.; CHEN,C.; OKOS, M.R., Cell growth and death rates as factors in the long-term performance, modeling and design of immobilized cell reactors. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 39, p. 498-503, 1992.
- DECHECHI, E. C., **Controle Avançado Preditivo Adaptativo-“DMC Multivariável Adaptativo”**, Tese de Doutorado, FEQ/UNICAMP, Campinas, 1998.
- EDGAR, T. F.; HIMMELBLAU, D. M. *Optimization of Chemical Process*, McGraw-Hill, 1989.
- FLOUDAS, C., *Nonlinear and mixed-integer optimization*. Cambridge University Press, Cambridge, 1995.
- FREDRICKSON, A.,G., Formulation of Structured Growth Models. *Biotechnology and Bioengineering*, v.18, p. 1481-1486, 1976.
- FRIEDLANDER, A. *Elementos de Programação Não-Linear*. Editora da Unicamp, Campinas, SP, 1994.
- GRADO, S. C., CHANDRA,M.J. A factorial design analysys of a biomass to ethanol production system. *Biomass and Bionergy*, v.15, n.2, p. 115-124, august 1998.
- GAL, T. *Grundlagen des Operations Research*, Part 1, Springer-Verlag, Berlin; Heidelberg, 1991.
- GALAZZO, J. L., BAILEY, J. E., Fermentation Pathway Kinetics and Metabolic Flux Control in Suspended and Immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzime Microb. Technol.*, v. 12, p. 162-172, 1990.
- GROSSMANN, I.E.; QUESADA, I.; RAMAN, R.; VOUDOURIS, V.T., Mixed integer optim. tech. for the design and scheduling. of bath process. In: *Adv. Study Inst.- Bacth Process Systems Eng.*, Antalya (Turkey), 1992.

Referências Bibliográficas

- HARDER, A.; ROELS, J. A., Application of Simple Structured Models in Bioengineering. *Advances in Biochemical Engineering*, v.. 21, p. 55-107, 1982.
- KALIL, S. J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M.I., Response Surface Analysis and Simulation as a Tool for Bioprocess Design and Optimization. *Process Biochemistry*, v. 35, p. 539-550, 2000.
- LEE, J. M., POLLARD, J. F., COULMAN, G. ^a Ethanol Fermentation with Cell Recycling: Computer Simulation. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 25, p.497-511,1983.
- LEHNINGER, A. L., *Bioquímica*, vol.2, Edgard Blucher Ltda, 1976.
- LEI, F., JORGENSEN, S. B., Estimation of kinetic parameters in a structured yeast model using regularization, **Journal of Biotechnology**, v.88, p.223-237, 2001
- MELO, D. N. C., *Estratégia de otimização em duas camadas: aplicação para processos de hidrogenação de reatores catalíticos trifásicos*, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2005. Tese (Doutorado).
- MELO, D. N. C.; HASAN, S. D. M.; MACIEL FILHO, R., A two layer approach for large scale process/optimization: Application to hydrogenation reactor. *The Sixth Italian Conference of Ghemical and Process Engineering*, Pisa, Italy, 2003
- MONTESINOS, J. L.; LAFUENTE, J.; GORDILLO, M. A.; VALERO, F.; SOLÀ,C. , Structured Modeling and State Estimation in a Fermentation Process: Lipase Production by *Candida rugosa*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 48, p. 573-584, 1995.
- NEMHAUSER, G.L.; WOLSEY, L.A., *Integer and combinatorial optimization*. John Wiley & Sons. New York (NY), 1988.
- NIELSEN, J.; VILLADSEN, J., Modelling of Microbiol Kinetics - Review. *Chemical Engineering Science*, v. 47. n. 17/18, p. 4225-4270, 1992.

- NISSEN, T. L.; KIELLAND-BRANDT, M. C.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J. Optimization of Ethanol Production in *Saccharomyces cerevisiae* by Metabolic Engineering of the Ammonium Assimilation. *Metabolic Engineering*, v. 2, p. 69-77, 2000 (www.idealibrary.com).
- OURA, E., Reaction products of yeast fermentations. *Process Biochemistry*, v. 12, p. 19-21, 1977.
- PAMMENT, N. B., HALL, R. J., BARFORD, J. P., Mathematical Modeling of Lag Phases in microbial growth. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 20, p. 349-381, 1978.
- PESQUISA FAPESP, *Revolução no Canavial*, n. 122, p.62-70, abril 2006.
- PINTO, J.M., *Planejamento e Programação de Operações de Produção e Distribuição em Refinarias de Petróleo*. São Paulo, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, USP, 2000. Tese (apresentada para obtenção do título de Livre Docente).
- PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. *The Design of Optimum Multifactorial Experiments*. *Biometrika*, vol.33, p. 305-325, 1946.
- PRIEST, F. G., CAMPBELL, I., *Brewing Microbiology*. Aspen Publishers, Segunda edição, 1999.
- RAMKRISHNA, D.; FREDRICKSON, A. G.; TSUCHIYA, H. M., 1967. Apud: HARDER, A.; ROELS, J. A., Application of Simple Structured Models in Bioengineering. *Advances in Biochemical Engineering*, vol. 21, p. 55-107, 1982.
- REHM, H.J. e REED, G., *Microbiol Fundamentals*, v. 1,1981.
- REZENDE, M. C. A. F., *Controle e otimização de um reator de hidrogenação trifásicos*, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2003. Dissertação (Mestrado).
- RIVERA, E. M.; COSTA, A. C.; ATALA, D. I. P.; MAUGERI, F.; WOLF, M. R.; MACIEL FILHO, M. Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: Application to ethanol fermentation considering the

Referências Bibliográficas

- effect of temperature. *Process Biochemistry*, v. 41, p1682-1687, 2006.
- RIVERA, E. M.; COSTA, A. C.; MACIEL FILHO, M. Application of optimization techniques for estimation of kinetic parameters in a structured model for ethanol production. *IV Encontro de Pesquisa da Faculdade de Engenharia Química / UNICAMP*, 2005 (EPFEQ 2005).
- RIZZI, M.; BALTES, M.; THEOBALD, U.; MATTHIAS, R.; In Vivo of Metabolic Dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: II Mathematical Model. *Biotechnology and Bioengineering*, v.55, n.4, 1997.
- RODRIGUES, M. I.; MACIEL FILHO, R.; MAUGERI, F. Optimization of a Process of Continuous Enzyme Purification by Surface Response Analysis. *Food Control*, v. 4, n. 3, p. 144-148, 1993.
- ROTBOLL, M. & JORNGENSEN, S.B., Validation of a Metabolic and Biomass Structured Model for Yeast Fermentation, European Conference on Biotechnology, 12-17/ junho, Florence, Italy, 1993.
- RYU, D. Y., KIM, H. S., TAGUCHI, H., Intrinsic fermentation kinetics parameters of immobilised cells, *Journal Fermentation Technology*, v. 62 (3), p. 225-261, 1984
- SCHRODER, A. Controle Ótimo no Tempo de Colunas de Destilação. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999. Tese (Doutorado).
- SHI, H, SHIMIZU, K., On line Metabolic Pathway Analysis Based on Metabolic Signal Flow Diagram. *Biotechnology and Bioengineering*, v.58, n.2-3, abril-maio, p.139-148, 1998.
- STEINMEYER, D. E. & SHULER, M. L., Structured Model for *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 44, n. 9, p. 2017-2030, 1989.
- STREMEL, D., P., *Simulação dinâmica de um biorreator tipo torre com células imobilizadas para produção de etanol*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, 1994.

- STREMEL, D. P., *Desenvolvimento de Modelos Estruturados Alternativos para o processo de Produção de Etanol*, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2001. Tese (Doutorado).
- TOLEDO, E. C. V., *Modelagem, Simulação, e Controle de Reatores Catalíticos de Leito Fixo*, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 1999. Tese (Doutorado).
- TORRES, N. V.; VOIT, E. O.; GLEZ-ALCÓN, C.; RODRIGUEZ, F. Na Indirect Optimazation Method for Biochemical Systems: Description of Method and Application to the Maximization of the Rate of Ethanol, Glycerol and Carbohydrate Production in *Sachoromyces cerevisiae* . *Biotechnology and Bioengineering*, v.55, n.5, september, 1997.
- TVRZSKÁ DE GOUVÊA, M., *Uso de um algoritmo SQP na otimização de processos químicos em tempo real*. Tese de Doutorado, USP, São Paulo, SP, 1997
- VERHOFF, F. H.; SUNDARESAN, K. R.; TENNEY, Y. W.; *Biotechnology and Bioengineering*, v.14, p.411, 1972.
- VIEGAS, M. C., *Otimização de sistema de fermentação alcoólica continua utilizando reatores tipo torre com leveduras com características floculantes*, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2003. Tese (Doutorado).
- YEDDER, R. B., *Optimisation numérique et contrôle optimal: (applications en chimie moléculaire)*, PhD thesis, Ecole Nationale des Ponts Chaussées (ENPC), Paris, France, 2002.
- WILLIAMS, F. M., 1967. Apud: HARDER, A.; ROELS, J. A., Application of Simple Structured Models in Bioengineering. *Advances in Biochemical Engineering*, v. 21, p. 55-107, 1982.
- WILLIAMS, F. M., 1975. Apud: HARDER, A.; ROELS, J. A., Application of Simple Structured Models in Bioengineering. *Advances in Biochemical Engineering*, v. 21, p. 55-107, 1982.

Referências Bibliográficas

WRIGHT,S., Convergence of SQP – like methods for constrained optimization.

Siam J. on Control and Optimization, v. 27, n. 1, p. 13-26, 1989.