



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
BIOSURFACTANTE UTILIZANDO MELAÇO DE SOJA

ANA CAROLINA BORGES SILVA

Uberlândia – MG

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA

MODELAGEM E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
BIOSURFACTANTE UTILIZANDO MELAÇO DE SOJA

Autor: Ana Carolina Borges Silva

Orientador: Prof^a. Dr^a. Miriam Maria Resende

Coorientador: Prof. Dr. Ruy de Souza Júnior

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Uberlândia - MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S586m Silva, Ana Carolina Borges, 1987-
2018 Modelagem e otimização da produção de biossurfactante utilizando
 melação de soja [recurso eletrônico] / Ana Carolina Borges Silva. - 2018.

Orientadora: Miriam Maria Resende.

Coorientador: Ruy de Souza Júnior.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.53>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

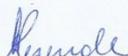
1. Engenharia química. 2. Modelagem de processos. 3. Otimização.
4. Soja. 5. Compostos bioativos. 6. Pseudomonas aeruginosa. I. Resende,
Miriam Maria, 1971-, (Orient.). II. Souza Júnior, Ruy de (Coorient.). III.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química. IV. Título.

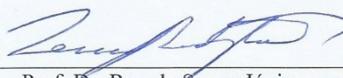
CDU: 66.0

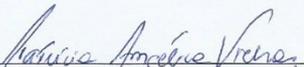
Rejâne Maria da Silva – CRB6/1925

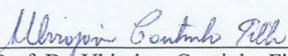
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 29/10/2018.

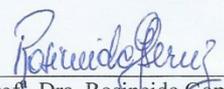
BANCA EXAMINADORA:


Prof.^a. Dra. Miriam Maria de Resende
Orientadora (PPG-EQ/UFU)


Prof. Dr. Ruy de Sousa Júnior
Co-orientador (PPG-EQ/UFSCar)


Prof.^a. Dra. Patrícia Angélica Vieira
PPG-EQ/UFU


Prof. Dr. Ubirajara Coutinho Filho
PPG-EQ/UFU


Prof.^a. Dra. Rosineide Gomes da Silva
Cruz
DEQ/UFSCar

Aos meus pais, Aparecida e Ronas, minha irmã Ana Paula.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus pela dádiva da vida e por ter me beneficiado com grandes oportunidades. Agradeço também aos meu pais, Aparecida Maria Borges Silva e Ronas José da Silva, pelo amor incondicional que sempre priorizou meus sonhos aos deles.

Agradeço a minha irmã Ana Paula Silva Capuci por sempre me auxiliar e não me deixar desistir. Ao meu cunhado, Marcos Roberto Capuci Lima pela ajuda e pela amizade em todos os momentos. Aos meus amiguinhos, Thor, Joey, Dio, Ozzy, Jujuba e em especial, ao melhor amiguinho Theodoro pelos momentos de excesso de amor e ternura gratuitos.

Agradeço a Marília Silva Rodrigues pela contribuição e fornecimento de dados ao trabalho e ao amigo Adam Basílio pelo auxílio sempre que necessário e pela amizade em todos os momentos desta caminhada.

Agradeço aos que contribuíram de uma forma ou outra, que torceram e demonstraram alegria com cada conquista desta jornada.

Agradeço aos meus orientadores Miriam Maria Resende e Ruy de Sousa Júnior pelo aprendizado, amizade e disponibilidade de sempre sanar minhas dúvidas e me auxiliar em todo o mestrado.

“O amor é substância criadora e mantenedora do Universo, constituído por essência divina. É um tesouro que, quanto mais se divide, mais se multiplica, e se enriquece à medida que se reparte. Mais se agiganta, na razão que mais se doa. Fixa-se com mais poder, quanto mais se irradia. Nunca perece, porque não se entibia nem se enfraquece, desde que sua força reside no ato mesmo de doar-se, de tornar-se vida” (Joanna de Ângelis)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
NOMENCLATURA.....	iv
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO II – OBJETIVOS.....	3
CAPÍTULO III - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Biossurfactantes.....	4
3.1.1 Glicolipídios.....	5
3.1.2 Fosfolipídios, Ácidos Graxos e Lipídios Neutros.....	7
3.1.3 Lipopeptídios.....	7
3.1.4 Lipossacarídios.....	8
3.2 Melão de Soja.....	8
3.3 Reatores Bioquímicos.....	9
3.3.1 Processo Contínuo.....	11
3.3.2 Processo Descontínuo – Batelada.....	12
3.3.3 Batelada Alimentada.....	13
3.3.4 Distribuição Tempo de Residência (DTR).....	14
3.4 Cinética de Processos Fermentativos.....	17
3.4.1 Modelagem Cinética.....	18
3.4.1.1 Modelo de <i>Monod</i>	21
3.4.1.2 Modelo de <i>Contois</i>	22
3.4.1.3 Modelo de Saturação pela Célula.....	23
3.4.1.4 Outros Modelos Cinéticos.....	24
3.4.1.5 Sensibilidade Paramétrica.....	25
3.5 Otimização.....	26
CAPÍTULO IV - MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Produção do biossurfactante em reatores batelada.....	28

4.2 Modelagem Matemática do Processo de Produção de Biossurfactante em Operação Batelada: Determinação de Parâmetros Cinéticos.....	29
4.2.1 Balanço de Massa.....	30
4.3 Descrição dos Modelos.....	31
4.3.1 Modelo de <i>Contois</i>	31
4.3.2 Modelo de <i>Monod</i>	32
4.3.3 Modelo de Saturação pela Célula.....	33
4.4 Ajuste Paramétrico.....	33
4.5-Experimento em Coluna para a Validação dos Parâmetros dos Modelos.....	34
4.5.1 – Fixação das <i>Pseudomonas</i> aeruginosas em partícula de alginato de sódio.....	34
4.5.2 Aparato Experimental e Condições Operacionais.....	35
4.5.3 Determinação da distribuição de tempos de residência (DTR) no experimento de coluna.....	37
4.5.3.1- Cálculo do tempo de residência médio.....	37
4.5.3.2 - Cálculo da variância.....	38
4.5.3.3 - Cálculo do coeficiente de dispersão axial.....	38
4.5.4 Modelagem Matemática do Processo Contínuo.....	39
4.6 Otimização.....	42
4.7 Metodologia Analítica.....	42
4.7.1 Tensão Superficial.....	42
4.7.2 Índice de Emulsificação.....	42
4.7.3 Concentração de Células.....	43
4.7.4 Concentração de Biossurfactante.....	43
4.7.4.1 Consumo de Açúcares Totais.....	43
4.7.4.2 Concentração da Raminose.....	44
4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	44
CAPÍTULO V - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1 Produção da Raminose em reator batelada.....	46
5.2 Ajuste Paramétrico.....	47
5.2.1 Modelo de Saturação pela Célula.....	47
5.2.2 Modelo de <i>Monod</i>	49
5.2.3 Modelo de <i>Contois</i>	51

5.3 Experimento em Operação Contínua para a Validação dos Parâmetros dos Modelos Ajustados.....	54
5.3.1 Fixação das <i>Pseudomonas aeruginosas</i> em partícula de alginato de sódio.....	55
5.3.2 Resultados das Análises Qualitativas para o Experimento de Validação.....	57
5.3.3 Determinação da distribuição de tempos de residência (DTR).....	58
5.4 Modelagem Matemática do Processo Contínuo.....	60
5.4.1 Modelo PFR.....	61
5.4.1.1 Modelo de Saturação pela Célula.....	61
5.2.1.2 Modelo de <i>Monod</i>	63
5.2.1.3 Modelo de <i>Contois</i>	65
5.4.2 Modelo de Dispersão.....	66
5.4.2.1 Modelo de <i>Monod</i>	66
5.4.2.2 Modelo de <i>Contois</i>	67
5.5 Otimização da Produção de Raminose.....	69
CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

LISTA DE FIGURAS

3.1	Estrutura Química dos glicolipídios.....	6
3.2	Reator Contínuo com injeção de traçador tipo pulso e degrau com detecção no efluente para medidas de DTR.....	16
4.1	Esquema de Produção de Biossurfactante em Operação Batelada.....	28
4.2	Esquema de Produção de Biossurfactante em Operação Batelada.....	35
4.3	Reator em coluna com <i>Pseudomonas</i> imobilizadas (Reator de Leito Fixo).....	36
4.4	Representação do Experimento em Coluna para Validação dos Parâmetros Cinéticos.....	36
5.1	Perfil de concentrações para as variáveis estudadas para o Modelo de Saturação pela Célula: ■ Concentração de células, ▲ Concentração de Lipídio (g/L), ◆ Concentração de Sacarose e ● Produção de Raminose. Os símbolos representam os resultados experimentais e as linhas os dados resultantes do ajuste do modelo cinético definido pelas equações de 4.2 a 4.5. As linhas pontilhadas representam os desvios de $\pm 5\%$	48
5.2	Perfil de concentrações para as variáveis estudadas para o Modelo de <i>Monod</i> : ■ Concentração de células, ▲ Concentração de Lipídio (g/L), ◆ Concentração de Sacarose e ● Produção de Raminose. Os símbolos representam os resultados experimentais e as linhas os dados resultantes do ajuste do modelo cinético definido pelas equações de 4.2 a 4.5. As linhas pontilhadas representam os desvios de $\pm 5\%$	50
5.3	Perfil de concentrações para as variáveis estudadas para o Modelo de <i>Contois</i> : ■ Concentração de células, ▲ Concentração de Lipídio (g/L), ◆ Concentração de Sacarose e ● Produção de Raminose. Os símbolos representam os resultados experimentais e as linhas os dados resultantes do ajuste do modelo cinético definido pelas equações de 4.2 a 4.5. As linhas pontilhadas representam os desvios de $\pm 5\%$	52
5.4	Fixação da cultura microbiana na matriz porosa da partícula.....	56
5.5	Morfologia da <i>Pseudomonas aeruginosas</i>	56
5.6	Distribuições cumulativas adimensionais.....	58

5.7	Distribuição E(Q) para os três diferentes tempos de residência estudados.....	59
5.8	Perfil das Concentrações validadas pelo método PFR para o modelo de Saturação pela Célula: ■ Concentração de Células, ▲ Concentração de Lipídios, ◆ Concentração de Sacarose e ● Concentração de Raminose. As linhas pontilhadas representam os desvios de $\pm 5\%$	62
5.9	Perfil das Concentrações validadas pelo modelo PFR para o modelo de <i>Monod</i> : ■ Concentração de Células, ▲ Concentração de Lipídios, ◆ Concentração de Sacarose e ● Concentração de Raminose. As linhas pontilhadas representam os desvios de $\pm 5\%$	64
5.10	Perfil das Concentrações validadas pelo método PFR para o modelo de <i>Contois</i> : ■ Concentração de Células, ▲ Concentração de Lipídios, ◆ Concentração de Sacarose e ● Concentração de Raminose. As linhas pontilhadas representam os desvios de $\pm 5\%$	65
5.11	Perfil das Concentrações validadas pelo modelo de Dispersão Axial para o modelo de <i>Monod</i> : ■ Concentração de Células, ▲ Concentração de Lipídios, ◆ Concentração de Sacarose e ● Concentração de Raminose. As linhas pontilhadas representam os desvios de $\pm 5\%$	66
5.12	Perfil das Concentrações validadas pelo de Dispersão Axial para o modelo de <i>Contois</i> : ■ Concentração de Células, ▲ Concentração de Lipídios, ◆ Concentração de Sacarose e ● Concentração de Raminose. As linhas pontilhadas representam os desvios de $\pm 5\%$	68
5.13	Otimização para o Modelo de <i>Contois</i> utilizando as faixas de concentrações de substratos de até 40 g/ L, sendo S1 a concentração de Lipídios e S2 a concentração de Sacarose, com velocidade de 0,288 cm/h.....	70
5.14	Otimização para o Modelo de <i>Contois</i> utilizando a velocidade de 0,13 cm/h, sendo S1 a concentração de Lipídios e S2 a concentração de Sacarose.....	71
5.15	Otimização para o Modelo de <i>Contois</i> utilizando a velocidade de 0,2 cm/h, sendo S1 a concentração de Lipídios e S2 a concentração de Sacarose.....	72
5.16	Otimização para o Modelo de <i>Contois</i> utilizando a velocidade de 0,3 cm/h, sendo S1 a concentração de Lipídios e S2 a concentração de Sacarose.....	73

Otimização para o Modelo de <i>Contois</i> utilizando a velocidade de 0,5 cm/h, 5.17 sendo S1 a concentração de Lipídios e S2 a concentração de Sacarose.....	74
---	----

LISTA DE TABELAS

3.1	Modelos Cinéticos descritos na literatura.....	24
4.1	Equações utilizadas na validação dos modelos de Saturação pela Célula, <i>Monod</i> e <i>Contois</i>	41
5.1	Concentração de células, lipídios, sacarose e raminose.....	46
5.2	Valores dos parâmetros cinéticos ajustados para o Modelo de Saturação pela Célula.....	47
5.3	Valores dos parâmetros cinéticos ajustados para o Modelo de <i>Monod</i>	49
5.4	Valores dos parâmetros cinéticos ajustados para o Modelo de <i>Contois</i>	51
5.5	Rendimentos em célula, substratos e produto para Operação em Batelada.....	53
5.6	Concentrações de célula, substratos e produto para experimento em Operação Contínua.....	55
5.7	Valores determinados para tensão superficial, índice de emulsificação e concentrações de sacarose, de lipídios e de raminose no processo com operação contínua.....	57
5.8	Valores estimados para os parâmetros tempos de residência, velocidade intersticial, variância e coeficiente de dispersão axial.....	60
5.9	Valores recalculados dos parâmetros cinéticos com dados do experimento em operação contínua.....	61

Lista de Nomenclatura

C_S	Concentração do substrato	g/L
C_X	Concentração celular	g/L
C_P	Concentração de produto	g/L
S	Concentração do substrato limitante	g/L
K_S	Constante de <i>Monod</i>	
K_x	Parâmetro do modelo de Contois	g _s /g _x
$X_{máx}$	Concentração celular máxima	g/L
$S_{máx}$	Máxima concentração de substrato onde não existe crescimento celular	g/L
S_{min}	Concentração onde se inicia o efeito de inibição	g/L
$P_{máx}$	Concentração máxima de Produto (Produto limitante)	g/L
X_t	Número total de células	
X_v	Número de células viáveis	
X_d	Número de células inativas	
r_p	Velocidade Global de Produção	mg.L ⁻¹ .h ⁻¹
X	Crescimento de Biomassa	g/L
S_1	Concentrações de Lipídeos	g/L
S_2	Concentração de Sacarose	g/L
P	Biossurfactantes Totais	g/L
dX/dt	Taxa de acumulo da biomassa	
dS_1/dt	Taxa de acumulo do substrato 1	
dS_2/dt	Taxa de acumulo do substrato 2	
dP/dt	Taxa de acumulo do produto	
m_1	Termo associado ao crescimento celular para o substrato 1	
m_2	Termo associado ao crescimento celular para o substrato 2	
b	Termo não associado ao crescimento celular	
$F(t)$	Função da Distribuição Cumulativa da Concentração do Traçador	

V_r	Volume do Reator	L^3
$E(t)$	Função para o cálculo do Erro	
Pe	Número de Peclet	
uL	Taxa de Transporte por Convecção	
D_{ax}	Taxa de Transporte por Difusão ou Dispersão	cm^2/h
U_f	Velocidade Intersticial do Escoamento	cm/s
r_s	Modelo Cinético adotado	
V_m	Velocidade máxima específica de crescimento ou reprodução (adotada para utilização no <i>Scilab</i>)	$1/h$
IE	Porcentagem da Emulsão	
h_e	Altura Emulsionada	Cm
h_t	Altura Total da Mistura	Cm

LETRAS GREGAS

μ	Velocidade específica de crescimento	$1/h$
$\mu_{m\acute{a}x}$	Velocidade máxima específica de crescimento ou reprodução	$1/h$
α	Razão entre a Velocidade de Produção e a Velocidade de Crescimento Celular	$mg_p \cdot g_x^{-1}$
β	Constante de formação pelo produto	$mg_p \cdot g_x^{-1} \cdot h^{-1}$
$Y_{x/S1}$	Fator de conversão de substrato 1 em biomassa	
$Y_{x/S2}$	Fator de conversão de substrato 2 em biomassa	
$Y_{x/P}$	Fator de conversão de biomassa em produto	
\square_t	Condutividade Elétrica na saída do reator em cada instante	
\square_o	Condutividade Elétrica na saída do reator no tempo inicial	
\square_f	Condutividade Elétrica na saída do reator no tempo final	
\square_{teo}	Tempo de Residência	H
ε	Porosidade do Reator	
v	Vazão Utilizada	$L^3 \cdot T^{-1}$
σ^2	Variância	

σ_θ^2 Coeficiente de Dispersão Axial

ω Matriz de Pesos

RESUMO

Os biossurfactantes são uma das classes mais importantes de produtos químicos, sendo denominados como moléculas anfífilas com porções hidrofílicas (polar e solúvel em água) e hidrofóbicas (apolares e insolúveis em água). Têm-se verificado um crescente aumento no interesse de biossurfactantes, pois estes apresentam caráter biodegradável e não tóxico. Dentre as classes dos biossurfactantes, destacam-se os glicolipídios, em especial os raminolipídios, que são produzidos por bactérias do tipo *Pseudomonas aeruginosa* e possuem alta afinidade com moléculas orgânicas hidrofóbicas e menor toxicidade ao ambiente, sendo capazes de reduzir a tensão superficial e emulsionar hidrocarbonetos. O objetivo deste estudo foi encontrar um modelo matemático para a produção de raminose em processo operado em batelada e otimizá-lo empregando processo contínuo de leito fixo. A modelagem da produção de raminose, do crescimento celular e dos consumos de lipídeos e de sacarose foi estabelecida utilizando os dados experimentais obtidos na dissertação de mestrado de Rodrigues (2016). Os experimentos foram realizados em mesa agitadora a $27 \pm 1,0$ °C 2 120 rpm, por 72 horas. Os modelos cinéticos propostos foram o de Saturação por Células, *Monod* e *Contois*. A técnica de identificação de parâmetros foi realizada usando um algoritmo de regressão não linear de múltiplas respostas e a integração do conjunto de equações diferenciais, para o cálculo dos parâmetros foi realizada com o auxílio do algoritmo de Runge-Kutta. Os rendimentos foram calculados em termos de biomassa e produto, tanto para dos dados experimentais quanto para os modelos cinéticos estudados e as análises qualitativas foram realizadas a fim de se caracterizar o biossurfactante produzido. A validação dos parâmetros ajustados foi realizada por meio de experimento em coluna com operação contínua, no qual a altura do reator foi de 10,9 cm e a velocidade de escoamento de 0,288 cm/h, sendo os modelos cinéticos validados utilizando os modelos PFR e Dispersão Axial. Posteriormente foi feita a otimização por visualização gráfica do comportamento da variável resposta, para o modelo de *Contois*, sendo as concentrações de substratos avaliadas para diferentes velocidades e a resposta obtida em termos de produtividade. Os resultados obtidos para o ajuste paramétrico foram satisfatórios e os modelos se ajustaram bem aos dados experimentais, sendo o modelo de Saturação pela Célula o que melhor representou os pontos experimentais, apresentando um valor de 19,61 para o somatório dos quadrados dos resíduos. Os modelos de *Monod* e *Contois* apresentaram um valor de 47,61. Os rendimentos $Y_{x/s}$ demonstraram que há um maior consumo de lipídios, sendo o modelo de *Contois* o que apresentou a melhor conversão de biomassa em raminose. As análises qualitativas demonstraram bons resultados para a tensão superficial e o índice de emulsificação. Para a validação, o modelo que apresentou os melhores resultados para o modelo PFR foi o de Saturação pela Célula, sendo necessário reajustar os termos de manutenção. Para o modelo de Dispersão Axial, o modelo cinético de *Contois* demonstrou os melhores resultados, prevendo as concentrações finais para processo de maneira excelente. Os resultados obtidos pelo modelo de *Contois* para a otimização foram bastante satisfatórios e demonstram melhorias menos significativas para a produtividade com o aumento das concentrações de substratos e velocidade de escoamento.

Palavras – chave: Biossurfactante, Modelagem, Otimização.

ABSTRACT

Biosurfactants are one of the most important classes of chemicals, being called amphiphilic molecules with hydrophilic (polar and water soluble) and hydrophobic (nonpolar and water insoluble) moieties. There has been a growing increase in the interest of biosurfactants, as these are biodegradable and non-toxic. Among the classes of biosurfactants, the glycolipids stands out, especially the raminolipids, that are produced by bacteria of the *Pseudomonas aeruginosa* type and have high affinity with organic hydrophobic molecules and less toxicity to the environment, and are able to reduce the surface tension and to emulsify hydrocarbons . Therefore, the objective of this study was to model the production of raminose in a batch-operated process and to optimize it using a fixed-bed continuous process. The modeling of the production of raminose, cell growth and consumption of lipids and sucrose was established using the data obtained in Rodrigues Master's Dissertation (2016). The proposed kinetic models were Saturation by Cells, Monod and Contois. The technique of parameter identification was performed using a non-linear regression algorithm of multiple responses and the integration of the set of differential equations for the calculation of the parameters was performed with the aid of the Runge-Kutta algorithm. The yields were calculated in terms of biomass and product, both for the experimental data and for the kinetic models studied and the qualitative analyzes were performed in order to characterize the biosurfactant produced. The validation of the adjusted parameters was performed by means of a continuous operation column experiment in which the reactor height was 10.9 cm and the flow velocity was 0.288 cm / h. The kinetic models were validated using the PFR and Axial dispersion models. Afterwards, the optimization was performed by graphical visualization of the behavior of the response variable, for the Contois model, being the concentrations of substrates evaluated for different speeds and the response obtained in terms of productivity. The results obtained for the parametric adjustment were satisfactory and the models fitted well to the experimental data, being the Saturation by Cell model what better represented the best experimental points, presenting a value of 19.61 for the sum of the squares of the residues. The Monod and Contois models presented a value of 47.61. The yields Y_x / s showed that there is a higher consumption of lipids, being the Contois model the one that presented the best conversion of biomass in raminose. The qualitative analyzes showed good results for surface tension and emulsification index. For the validation, the model that presented the best results for the PFR model was the one of Saturation by the Cell, being necessary to readjust the terms of maintenance. For the Axial Dispersion model, Contois kinetic model showed the best results, predicting the final concentrations for process in an excellent way. The results obtained by the Contois model for the optimization were quite satisfactory and demonstrate less significant improvements in productivity with increasing substrate concentrations and flow velocity.

Key words: Biosurfactant, Modeling, Optimization.

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

Uma das classes mais importantes de produtos químicos são os biossurfactantes, denominados como moléculas anfifílicas, ou compostos orgânicos, com porções hidrofílicas (parte polar, solúveis em água) e hidrofóbicas (porções apolares, ou seja, insolúveis em água), produzidos principalmente por microrganismos como bactérias, leveduras e fungos. Eles são capazes de demonstrar diversas atividades de superfície que, dentre outros papéis, auxiliam na solubilização de substâncias hidrofóbicas (Varjani *et al.* 2017; Mouafi *et al.* 2016).

Os surfactantes são comercializados, quase que exclusivamente, de fontes sintéticas, todavia, existe um aumento no interesse em biossurfactantes produzidos por microrganismos. Esse interesse ocorre, principalmente, por serem considerados compatíveis com o meio ambiente, por sua não toxicidade e por seu caráter biodegradável. Além disso, os biossurfactantes possuem propriedades estruturais que permitem diversas aplicações, que vão desde a biotecnologia até a limpeza do ambiente (Varjani *et al.* 2017; Mouafi *et al.* 2016).

As propriedades dispersantes e floculantes destas moléculas contribuem para o crescimento da indústria de surfactantes, sendo sua produção mundial cerca de 13 milhões de toneladas por ano, correspondendo a aproximadamente US\$9,4 bilhões por ano. Além disso, estima-se que a demanda aumente a uma taxa de 35% ao ano (Rust, 2008; Levison, 2009; Colla e Costa, 2003; Lopes, 2014).

O acelerado desenvolvimento industrial associado ao crescimento populacional ocasionam impactos ambientais cada vez mais preocupantes e, devido a isso, a necessidade de se utilizar tecnologias ecologicamente viáveis acarretou a busca por compostos biodegradáveis originados de substratos renováveis (Marchant, 2012; Lopes, 2014).

Diferente dos surfactantes, os biossurfactantes são classificados de acordo com sua origem microbiana e sua composição química, sendo divididos em glicolipídios, lipopeptídios, fosfolipídios, ácidos graxos e lipídeos neutros, biossurfactantes poliméricos e surfactantes particulados (Lang, 2002; Rodrigues, 2016).

No grupo dos glicolipídios destaca-se os raminolipídeos, que são biossurfactantes produzidos por bactérias do tipo *Pseudomonas aeruginosa*, formados pela ligação de uma molécula de raminose a uma ou duas moléculas de ácido β -hidroxidecanóico. Esta classe de biossurfactante possui capacidade de reduzir a tensão superficial, emulsionar hidrocarbonetos, além da possibilidade de ser produzida em meios de cultivo com hidrocarbonetos ou carboidratos como única fonte de carbono, tornando-se bastante atrativa (Rosemberg e Ron, 1999; Holmberg, 2001; Rodrigues, 2016).

Devido às suas aplicações potenciais em diversas indústrias, a produção de biossurfactantes em escala comercial não é totalmente implementada devido ao seu baixo rendimento e alto custo de produção. Uma das alternativas para reduzir esse custo é a utilização de resíduos agroindustriais como substrato para produção dos biossurfactantes. Outra abordagem, para aumentar a produção de biossurfactantes no fermentador, é a otimização do processo por técnicas estatísticas mais eficazes, que possibilitem o melhor ajuste dos parâmetros utilizados (Banat *et al.*, 2000; Mesquita, 2004; Rodrigues, 2016; Sivapathasekaran *et al.*, 2010).

A otimização de processos industriais em termos de concentração de biomassa e substratos e produtividade do produto desejado depende da quantificação do comportamento dos microrganismos em meio fermentativo em condições reais. A formulação de um modelo matemático a partir de um conjunto de resultados experimentais compreende várias etapas, dentre elas destaca-se a obtenção de parâmetros que ajustam o modelo aos dados de maneira mais satisfatória (Augusto *et al.*, 1994; Borges, 2008).

Os parâmetros que descrevem o crescimento microbiano são estimados por experimentos em fermentação em batelada, sendo que a complexidade encontrada para estimar os parâmetros cinéticos inerentes a qualquer modelo, como por exemplo o clássico Modelo de *Monod*, por esse processo não é menor do que aquelas encontradas em processos contínuos ou em batelada alimentada. Um modelo cinético estabelecido a partir de dados experimentais em batelada é utilizado para avaliar os perfis de concentração de biomassa, substratos e produto (Baltes *et al.*, 1994; Borges, 2008).

A importância da otimização de bioprocessos cresce constantemente, pois os produtos obtidos de indústrias bioquímicas são usualmente de elevado custo e, um pequeno aumento na produtividade e no rendimento pode ter um efeito significativo no

processo como um todo, podendo diminuir os custos de operação (Palanki *et al.*, 1993; Costa, 1996; Costa *et al.*, 1998; Borges, 2008).

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho são apresentados a seguir.

CAPÍTULO II – OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Modelar a produção de raminose em processo operado em batelada e otimizá-la em processo contínuo de leito fixo.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar os parâmetros de modelos cinéticos a partir de dados de produção de biossurfactante em processo com operação batelada.
- Validar os modelos cinéticos na predição do processo de produção do biossurfactante em operação contínua.
- Otimizar a produção contínua de biossurfactantes por visualização gráfica do comportamento da variável resposta.

CAPÍTULO III - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biossurfactantes

Os compostos moleculares produzidos por microrganismos e que apresentam propriedades surfactantes, ou seja, que são capazes de diminuir a tensão superficial e com alta capacidade emulsificante, são chamados biossurfactantes e constituem subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras. Os biossurfactantes oriundos de diferentes substratos têm atraído mais atenção industrial em relação aos sintéticos, devido, dentre outros fatores, à sua maior biodegradabilidade, menor toxicidade e eficácia sob condições extremas de salinidade, pH e temperatura, ainda que sua produção a nível comercial tenha um custo altamente elevado e seu processo de fermentação seja longo (Ahmad *et al* 2015; Mouafi *et al* 2016; Heryani e Putra, 2017).

Estes compostos apresentam uma estrutura comum que consiste em uma porção lipofílica, frequentemente descrita por cadeia de hidrocarbonetos de um ou mais ácidos graxos. Estes podem ser saturados, insaturados, hidroxilados ou ramificados, e estão ligados a uma porção hidrofílica, composta por um éster, um grupo hidróxi, fosfato, carboxilato ou carboidrato. Em sua grande maioria, os biossurfactantes são neutros ou aniônicos, variando desde pequenos ácidos graxos até complexos polímeros (Nitschke e Pastore, 2002).

A aplicação dos biossurfactantes possui elevado potencial, baseado em suas propriedades funcionais que, dentre outras, incluem emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, inibição de corrosão, redução de viscosidade de líquidos e redução da tensão superficial. Tais propriedades são aproveitadas em diferentes campos, tais como agricultura, construção, indústrias alimentícias e de bebidas, papel, metal, têxtil, além das indústrias farmacêuticas e de cosméticos (Colla e Costa, 2003; Bognolo, 1999; Fiechter, 1992).

Contudo, sua utilização fundamental está relacionada à indústria petrolífera, pois são capazes de aumentar a solubilidade dos componentes do petróleo. Seu emprego na limpeza de tanques, preparação de misturas óleo-álcool para combustíveis, além da disseminação de óleos despejados em meios aquáticos devem-se ao seu alto potencial de recuperação de derivados do petróleo (Colla e Costa, 2003; Mulligan, 2001; Lima, 1996).

Os biossurfactantes podem ser produzidos por bactérias, leveduras e fungos filamentosos, apresentando como maior distinção em relação aos surfactantes sintéticos, a variabilidade na sua natureza hidrofóbica e hidrofílica. Sua composição e rendimento estão intimamente ligados às características do fermentador, do pH do meio, da composição dos nutrientes, do substrato e da temperatura utilizada. Os principais tipos destes compostos podem ser divididos em glicolipídios, fosfolipídios, lipossacarídios, lipopeptídios, ácidos graxos e lipídios neutros (Colla e Costa, 2003; Mulligan, 2001; Sahfi e Khanna, 1995).

Plociniczak *et al.* (2011) classificaram os biossurfactantes quanto à sua composição química, propriedades físico-químicas, peso molecular, modo de ação e origem microbiana. Em relação ao peso molecular os biossurfactantes são classificados em alto e baixo peso molecular. Os de baixo peso são eficientes na redução das tensões superficiais e interfaciais, como os glicolipídios e lipopeptídios, enquanto os de alto peso são eficazes na estabilização das emulsões óleo/água, como os surfactantes poliméricos (Mukherjee *et al.*, 2006; Plociniczak *et al.*, 2011).

3.1.1 Glicolipídios

A maior parte dos biossurfactantes é representada pela classe dos glicolipídios, podendo ser encontrados nas formas de mono, di, tri ou tetrassacarídeos e, ainda, abranger moléculas de glicose, galactose, raminose, sulfato de galactose e ácido glucurônico. Usualmente auxiliam na absorção de hidrocarbonetos de baixa polaridade por microrganismos. No grupo dos graxos ou ácidos graxos são ligados a uma molécula de açúcar, enquanto a trealose é um alcil-poliol no qual ocorre a ligação de um dissacarídeo com ácidos graxos de cadeia longa (Colla e Costa, 2003; Holmberg, 2001; Sahfi e Khanna, 1995; Karanth *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2007, Rodrigues, 2016).

Dentro da classe dos glicolipídios estão os raminolipídeos. Este grupo, quando produzidos por *Pseudomonas sp.*, possui maior capacidade de produção e variedade de utilização. Além de demonstrarem alta afinidade com moléculas orgânicas hidrofóbicas e menor toxicidade ao ambiente, podem ser produzidos a partir de substratos hidrofóbicos e hidrofílicos. São constituídos por uma ou duas moléculas de raminose (porção hidrofílica) ligadas a uma ou duas cadeias de ácido graxo, possuindo de 8-12 átomos de

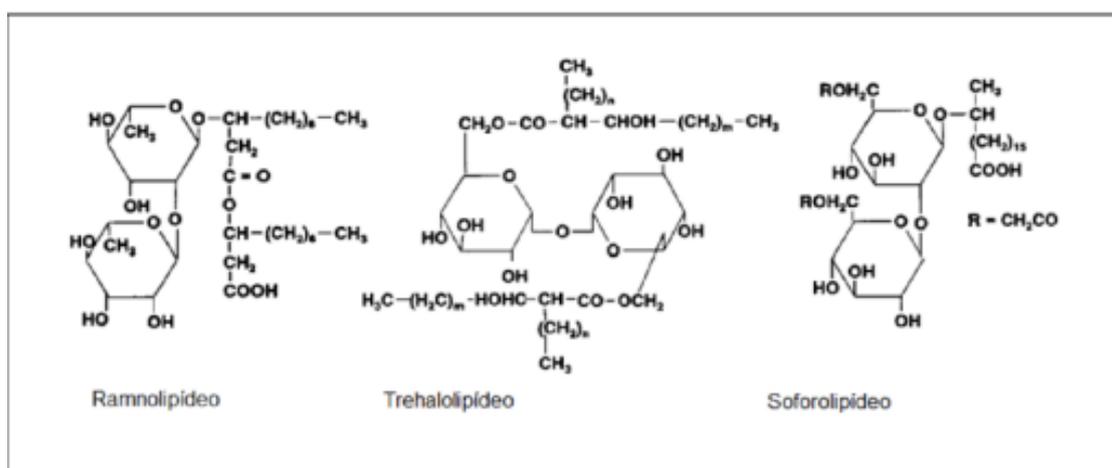
carbono saturados ou insaturados (porção hidrofóbica) (Desai e Banat, 1997; Lang e Wagner, 1987; Sim *et al.*, 1997; Déziel *et al.*, 1999, Rodrigues, 2016).

Outra classe de biossurfactantes do grupo de glicolipídios são os trealolipídeos. Estes biossurfactantes são produzidos por uma variedade ampla de actinomicetos, sendo o *Rhodococcus erythropolis* o mais utilizado para produção (Desai e Banat, 1997, Rodrigues, 2016).

Os soforolipídeos são moléculas de dissacarídeo soforose e são produzidos por leveduras do tipo *Torulopsis sp.* Essas moléculas são ligadas, por uma ligação β -glicosídica, a uma longa cadeia de ácido graxo hidroxilado. Destaca-se duas classes principais de soforolipídeos, as provenientes de ácidos graxos (não lactônicos) e a classe dos lactônicos (macrolídeos) que possuem um anel macrocíclico ligado à lactose por esterificação intramolecular. A segunda classe tem maior aceitação comercial devido à sua atividade biocida, sendo vastamente utilizada na fabricação de desodorantes antibacterianos e produtos anticasca. Os soforolipídeos apresentam propriedades biodegradáveis, não toxicidade e amplo potencial para formulação de produtos de uso em limpeza (Lang *et al.*, 1989; Hu e Ju, 2001; Fleurackers, 2006, Rodrigues, 2016).

A Figura 3.1 apresenta a estrutura dos glicolipídios, classificados de acordo com a fonte de carbono disponível para o crescimento microbiano:

Figura 3.1 – Estrutura Química dos glicolipídios



Fonte: Desai *et al.*, 1997.

3.1.2 Fosfolipídios, Ácidos Graxos e Lipídios Neutros

Os fosfolipídeos são conhecidos por formarem os componentes principais de membranas microbianas. Ao utilizar bactérias ou leveduras, que possuem capacidade de degradar hidrocarbonetos em substratos de alcano, tem-se um aumento da produção de fosfolipídeos e, conseqüentemente, aumento das propriedades surfactantes (Desai e Banat, 1997, Sahfi e Khanna, 1995; Lima, 2007).

Considera-se como biossurfactante os ácidos graxos produzidos pela oxidação microbiana de *Corynebacterium lepus* a partir de alcanos. O comprimento da cadeia de hidrocarbonetos está diretamente ligado à presença de grupos OH e ao equilíbrio hidrofílico dos ácidos graxos, além da redução da tensão superficial e interfacial. Vale ressaltar que, assim como os lipídeos neutros, a produção abrange seu crescimento microbiano em hidrocarbonetos e ambos são proteínas hidrofóbicas (Makula e Finnerty, 1972; Rosenberg e Ron, 1999, Rodrigues, 2016).

Quanto aos ácidos graxos e lipídios neutros, os mais notáveis são ácido ustilágico, ácidos corinomicólicos, ácidos lipoteicóicos e proteínas hidrofóbicas (Colla e Costa, 2003; Sahfi e Khanna, 1995; Lima, 2007).

3.1.3 Lipopeptídios

Os lipopeptídios são produzidos por um microrganismo específico, o *Bacillus subtilis*, sendo a surfactina o biossurfactante mais empregado e mais potente. É um biossurfactante aniônico com alta capacidade de reduzir a tensão superficial em baixas concentrações. A surfactina produzida através de *B. subtilis* LB5a apresentou uma cadeia com sete aminoácidos e quinze carbonos na porção lipídica, o que pode resultar em maior atividade surfactante. Outros lipopeptídios com as mesmas propriedades da surfactina são fengicina, iturina, bacillomicinas e micosubtilinas (Araujo, Nitschke e Freire, 2013).

A surfactina possui maior influência em membranas que contêm fosfolipídios, pois estes possuem cadeias mais curtas e/ou estão em disposição fluída, interferindo em suas funções biológicas pela inserção nas bicamadas lipídicas. Com isso a permeabilidade da membrana é modificada pela formação de canais iônicos ou cátions mono ou divalentes, solubilizando a membrana por seu mecanismo detergente (Araujo, Nitschke e Freire, 2013).

3.1.4 Lipossacarídeos

São biossurfactantes poliméricos e podem ser classificados como emulsificantes extracelulares de alta solubilidade em meio aquoso. Possuem alto peso molecular e são produzidos por bactérias degradadoras de hidrocarbonetos, sendo a principal a *Acinetobacter calcoaceticus* (Colla e Costa, 2003).

Bioemulsificantes derivados desta bactéria são amplamente utilizados para limpezas de tanques com frações pesadas de óleo, que requerem o uso de solventes e a limpeza manual. Os métodos utilizados neste tipo de limpeza são baseados em emulsões concentradas de óleo em água por agentes de superfície, sendo posteriormente realizado o bombeamento da emulsão formada, seguida de sua quebra e recolhimento do óleo. Este bioemulsificante é denominado “emulsan” e sua estrutura possui um ácido graxo e uma cadeia proteica ligada a um polissacarídeo (Colla e Costa, 2003).

3.2 Melaço de Soja

A soja, *Glycine max*, é denominada como uma importante leguminosa utilizada na alimentação mundial, sendo suas sementes constituídas por cerca de 40% de proteínas e 20% de óleos. Além disso, a soja é pobre em gordura saturada, sendo um alimento vegetal que possui todos os aminoácidos essenciais em sua composição, classificando-a como uma boa fonte de fibra, ferro, cálcio, zinco e vitaminas (Xu *et al.*, 2011; Lopes, 2014).

O Brasil é o segundo maior produtor de soja, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, sendo considerado destaque como principal exportador de soja, o que a torna um agronegócio de fundamental importância na economia do país. O processamento da soja acontece em diversas etapas e um dos produtos de interesse é o concentrado proteico de soja, sendo o melaço de soja produzido concomitantemente a esta etapa (EMBRAPA, 2015.)

O melaço de soja é um meio de cultura rico em carboidratos e produzido pela extração alcoólica do farelo desengordurado. Como resultado desta extração, obtêm-se duas porções: a primeira é um concentrado alcoólico insolúvel e rico em proteínas, enquanto a outra porção é líquida e contém principalmente açúcares (KAMALI *et al.*, 2016). A segunda porção é então destilada para recuperação do solvente e obtenção de um concentrado de açúcares (EMBRAPA, 2015; KAMALI *et al.*, 2016).

O melaço de soja é um líquido viscoso, de cor marrom escura, com pH de aproximadamente 5,0 e rico em carboidratos e é produzido em larga escala, apresentando um baixo valor comercial (JOHNSON *et al.* 1992). O melaço possui cerca de 60% de carboidratos, quando considerado o total de sólidos suspensos presentes, sendo que os açúcares presentes podem ser responsáveis por tal porcentagem (QURESHI *et al.*, 2001).

A sacarose, glicose, frutose e galactose estão inseridas no grudo dos açúcares digeríveis, que representam 58% dos açúcares presentes no melaço. Os outros 42% são formados por açúcares não digeríveis por humanos e/ou animais, tais como a rafinose, estaquiase e verbascose (CHAJUSS, 2004). A Tabela 3.1 apresenta a composição, em base seca, do melaço de soja analisado por Siqueira (2007).

Tabela 2.1 - Composição do melaço de soja em base seca (adaptado de SIQUEIRA, 2007)

Componente	% em base seca
Carboidratos Totais	57,3
Glicose	0,243
Frutose	0,127
Galactose	0,254
Sacarose	28,4
Lactose	-
Rafinose	9,68
Estaquiase	18,6
Proteína	9,44
Lipídios	21,2
Fibras	5,7
Cinzas	6,36

3.3 Reatores Bioquímicos

São chamados “biorreatores”, “reatores bioquímicos” ou ainda “reatores biológicos”, os reatores químicos em que ocorre uma série de reações químicas catalisadas por “biocatalisadores”, que podem ser enzimas ou células vivas (microbianas, vegetais ou animais). São equipamentos projetados com o intuito de conter reações químicas maximizando a geração do produto final, com alto rendimento e baixo custo (Schimidell e Facciotti, 2001).

Os reatores promovem o contato entre os reagentes para que ocorra a reação, e fornecem um ambiente propício em termos de pressão, temperatura, agitação, concentração de reagentes e presença de catalisador durante o período necessário para a conversão de reagentes em produtos (Ranade, 2001).

Um biorreator pode ser operado no modo batelada, com um inóculo por tanque ou por sistema de cortes, batelada alimentada ou contínua, todos podendo operar com ou sem recirculação celular (Schimidell e Facciotti, 2001).

Diante da necessidade da manutenção de produções em fluxo contínuo, os quais favorecem a produção em larga escala, destacam-se três principais classes de reatores ideais de escoamento contínuo: o Reator Contínuo de Tanque Agitado (Continuous Stirred-Tank Reactor – CSTR), o Reator com escoamento pistonado (Plug-Flow Reactor – PFR) e o Reator de Leito Fixo (Packed Bed Reactor – PBR). Um reator pode apresentar dois tipos de escoamentos ideais em seu interior, sendo o escoamento pistonado ou o escoamento de mistura perfeita os mais amplamente utilizados, uma vez que são de simples tratamento matemático (Fogler, 2009; Levenspiel, 1972).

Os reatores tubulares consistem em tubos cilíndricos que operam em estado estacionário com circulação do meio reacional em seu interior. Possuem vasta utilização industrial e estão usualmente ligados a processos em fase gasosa, podendo ser utilizados para reações em fase líquida. O reator tubular de escoamento contínuo pode ser dado como uma imagem ideal e simplificada do movimento de um fluido com velocidade uniforme ao longo de linhas paralelas de fluxo (Fogler, 2009; Froment *et. al.*, 1990).

Em condições ideais de operação, um fluido que entra em um PFR se movimenta ao longo do reator como um pistão do material, preenchendo a seção transversal do tubo por completo. Um PFR clássico consiste em um reator de corpo cilíndrico no qual o fluido escoar ao longo do comprimento criando um perfil de velocidade plano. O comportamento de um reator tubular ideal prevê que não existem misturas axiais ou gradientes radiais de temperatura ou concentração (Mushtaq, 2014).

Em reatores tubulares o tempo de contato é o mesmo para todas as moléculas do fluido ao longo do reator, desde que a velocidade ao longo da seção transversal do tubo seja uniforme, satisfazendo o escoamento pistonado. As moléculas possuem a mesma velocidade e com isso a concentração é uniforme na seção transversal do tubo e varia

somente ao longo do reator. Nestes casos, o reator pode ser considerado ideal (Schmal, 2010).

Uma vez que os reagentes são consumidos à medida que escoam ao longo do tubo, para a modelagem considera-se que a variação da concentração se dá somente ao longo do reator. Portanto, a velocidade da reação torna-se uma função do comprimento do reator, para as reações com ordens diferentes de zero (Cengel, 2015, Fogler, 2009).

No comportamento de um reator real existem alguns desvios de idealidade que devem ser considerados. Num reator de retromistura (CSTR) pode existir zonas de reciclo, acarretando a recirculação de parcelas do fluido para o interior do reator. Além disso, deve-se considerar, para este reator, o desenvolvimento de zonas de estagnação nas quais a conversão aproxima-se do limite superior. Entretanto, o fluido contido nas zonas estagnadas não deixa o reator, criando um volume morto e com isso os reagentes alimentados escoam apenas no volume restante, diminuindo sua conversão média. A formação de áreas de by-pass, nas quais a corrente de reagente passa pelo reator percorrendo um caminho mais curto sem se misturar com o restante do fluido ali contido também podem ocasionar diminuição na conversão (Ranade, 2001).

A taxa de reação, além de ser função dos parâmetros cinéticos, pode estar relacionada aos parâmetros do reator, enquanto a taxa de produção e composição dos produtos pode estar correlacionada ao volume do reator, suas configurações e seu modo de operação (Ranade, 2001).

Nos reatores tubulares, o aumento da conversão está fortemente relacionado ao comprimento do reator, interferindo no tempo em que os reagentes irão permanecer no interior do tubo. O volume e o comprimento do reator podem ser modificados para aumentar a conversão, todavia em muitos casos não é possível alterá-los, sendo necessário revisar os fatores relacionados às configurações e à fluidodinâmica do reator, além do seu modo de operação. Dentre estes fatores, pode-se destacar a turbulência, formação de zonas de mistura e a recirculação (Ranade, 2001; Cengel, 2015).

3.3.1 Processo Contínuo

Os processos contínuos tiveram início na indústria em meados de 1940, tornando seu uso relativamente recente, sendo o interesse em sua utilização despertado pela crise

econômica causada pela alta do preço do petróleo na década de 1970, o que acarretou um estímulo à produção de etanol (Lima *et al.*, 2001).

Esse processo possui uma alimentação contínua do meio de cultura a uma vazão específica, sendo o volume de reação mantido constante pela retirada sucessiva de caldo fermentativo (Facciotti, 2001). Este processo é comumente utilizado em indústrias na fabricação de etanol, pois operados corretamente levam a uma maior produtividade, todavia com custos iniciais e de operação bem maiores, demandando sistemas de controle mais sofisticados (Borges, 2008).

Do mesmo modo, a fermentação contínua é um processo que necessita de um maior conhecimento acerca do comportamento do microrganismo frente ao meio ambiente no qual ele atua. Os fatores que afetam este processo são pH, temperatura, concentrações de substratos e biomassa, além da viabilidade celular, influenciando na produtividade do sistema, o que leva a uma maior exigência de controle sobre o processo (Atala *et al.*, 2000).

Têm sido verificadas, em processos de fermentação contínuos, mutações nas células das leveduras, tanto quanto ao comportamento fermentativo como também quanto às suas características genéticas (Finguerut, 2005).

É possível citar algumas vantagens notadas na condução dos processos contínuos em relação aos outros processos fermentativos, tais como (: maior produtividade graças à ausência de parada para carga, descarga e limpeza dos tanques de fermentação, além das células estarem mais ajustadas ao meio de cultura utilizado no processo; menor número de equipamentos, diminuição no consumo de insumos de forma geral, menor necessidade de mão de obra empregada Andrietta, 1994; Alves, 1996; Borges, 2008; Pacheco 2010; Cruz, 2015).

Entretanto, no que tange aos pontos negativos, podem ser citados o maior risco de contaminação, de ocorrências de mutações genéticas naturais e seleção de mutantes menos produtivos. Além de problemas na operação em fase estacionária ocasionando o desenvolvimento de espumas e crescimento microbiano na parede do reator, assim como nos sistemas de entrada e saída do produto, dificuldade de conservação da homogeneidade no reator quando são aplicadas baixas vazões, além da necessidade de maior investimento fixo na planta (Facciotti, 2001; Cruz 2015).

3.3.2 Processo Descontínuo – Batelada

O processo em batelada, ou descontínuo, é bastante usado como base para comparações de eficiências alcançadas com relação aos outros processos, porém sua baixa eficácia estimula o surgimento de formas alternativas. São os mais empregados para a obtenção de produtos por meio de processos fermentativos, sendo o mais seguro em relação a problemas com a manutenção da assepsia, já que ao final de cada batelada o reator deve ser esterilizado junto com o novo meio de cultura, recebendo assim um novo inóculo, o qual passará por todos os controles necessários para garantir somente a presença do microrganismo de interesse para o processo (Borges, 2008).

Este processo proporciona, além de menores riscos de contaminação, uma enorme flexibilidade de operação, pois pode utilizar os fermentadores para fabricar produtos distintos, a possibilidade de realizar fases sucessivas no mesmo recipiente, melhores condições de controle no que tange à estabilidade genética do microrganismo, capacidade de identificar todos os materiais relacionados ao desenvolvimento de um determinado lote de produto (Schimidell e Facciotti, 2001).

A fermentação descontínua pode ocasionar baixa produtividade e rendimento, quando o substrato que é colocado de uma só vez no início da fermentação desencadeando inibição, repressão ou até mesmo o desvio da rota do metabolismo celular, formando produtos que não são de interesse (Carvalho e Sato, 2001).

O biorreator batelada é utilizado como parâmetro para as comparações de eficiências alcançadas com relação aos outros processos, mas a sua baixa eficiência estimula o surgimento de formas alternativas (Schimidell e Facciotti, 2001).

3.3.3 Batelada Alimentada

Estes processos têm se mostrado versáteis e eficientes na maior parte dos processos fermentativos, inclusive na fermentação alcoólica, sendo também conhecidos como *Melle-Boinot* (Borges, 2008). Nestes, sobretudo naqueles que apresentam densidades celulares elevadas, a produtividade é alta, pois existe um grande número de células viáveis no meio em fermentação. Além disso, o processo em batelada alimentada permite o controle da concentração de açúcar, diminuindo os efeitos de inibição pelo substrato e tolerando a adição do mesmo nos momentos mais favoráveis durante a fermentação (Mcneil e Harvey, 1990).

O processo batelada alimentada é um processo no qual o substrato é introduzido sob condições controladas até alcançar o volume do biorreator, sendo desenvolvido com o objetivo principal de aumentar a produtividade quando comparado ao processo de batelada simples, que possui baixa produtividade e lentidão. É possível mencionar algumas vantagens, tais como: economia de açúcar para reprodução celular, maior rendimento em etanol, eliminação de contaminantes através da centrifugação do meio fermentado e reciclo do fermento (Viegas, 2003; Borges, 2008). Embora antigo, este processo é bastante adequado e satisfatório no que tange à operação e eficiência de conversão de açúcares em álcool (Zarpelon e Andrietta, 1991).

Fundamentalmente, o processo descontínuo alimentado é um método em processos microbianos, no qual um ou mais nutrientes são colocados no fermentador durante o cultivo e em que os produtos ali permanecem até o final da fermentação. A adição de mosto pode ser de forma contínua ou intermitente, assim como a vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo (Carvalho e Sato, 2001).

Para chegar a altas concentrações de produto, são necessárias altas concentrações de células viáveis no fermentador durante longos períodos de tempo e isso é impossível no processo batelada a volume constante assim como no contínuo. Nas indústrias de fermentação frequentemente utiliza-se uma técnica na qual primeiro é atingida uma alta concentração de células no fermentador batelada e então se desloca o metabolismo da célula, com o intuito de que ela sintetize o produto bioquímico de interesse. Tal alteração pode ser realizada cessando o crescimento celular e adicionando precursores do produto bioquímico, sendo este processo empregado no reator em batelada alimentada (Mcneil e Harvey, 1990; Cruz, 2015).

Torna-se possível controlar a concentração de substrato no fermentador, graças à flexibilidade de utilização de diferentes vazões de enchimento dos reatores com meio nutriente, a fim de que o metabolismo microbiano seja desviado para uma via metabólica específica, causando o acúmulo de um determinado produto (Carvalho e Sato, 2001; Cruz, 2015). Com isso, é mantida uma baixa concentração de açúcar no fermentador, de forma que não aconteça inibição da fermentação pelo substrato, fenômeno comum numa operação em batelada simples (Ribeiro, 2010).

3.3.4 Distribuição Tempo de Residência (DTR)

O escoamento de fluidos em quaisquer equipamentos, pode passar por modificações condicionadas ao próprio dispositivo. O desempenho destes equipamentos pode ser melhor caracterizado após a verificação da maneira como o fluido escoou pelo mesmo, ou seja, a natureza do escoamento ou a macro mistura. Para tal investigação, faz-se necessário conhecer o tempo que cada amostra de fluido permanece dentro do equipamento (Sasaki, 2005).

A informação sobre a distribuição de tempo das amostras de fluido na corrente de saída do equipamento, ou seja, a distribuição dos tempos de residência (DTR) desse fluido em escoamento pode ser alcançada pelo uso de uma técnica experimental chamada técnica de estímulo-resposta com injeção de traçadores. Os conceitos utilizados na distribuição dos tempos de residência para caracterizar e modelar um reator não ideal são escassos. Suas principais aplicações para reatores não ideais são para diagnosticar problemas de reatores em operação e para prever conversões ou concentrações de efluentes em reatores quando uma nova reação for utilizada neste (Sasaki, 2005; Curie, 2009).

O conhecimento da DTR é uma informação importante na prática industrial quando se é utilizado reatores químicos (ou biológicos). Sua determinação permite diagnosticar problemas de escoamento no reator, sendo os mais comumente encontrados a existência de zonas de estagnação do fluido ou zonas mortas; curto-circuitagem extrema e subpassagem do fluido; existência de canalização, especialmente em operações em contracorrente; dispersão axial em reatores tubulares; segregação, resultante das condições de mistura (Fisher, 2010).

Além da DTR, existem outras técnicas indispensáveis para prever comportamentos em um projeto de um reator real, sendo uma delas a utilização de modelos matemáticos com parâmetros a serem ajustados através de informações experimentais. Tais parâmetros são correlacionados como funções de propriedades do fluido, do escoamento e da configuração do reator (Fogler, 2009).

A distribuição do tempo de residência (DTR) é calculada de forma experimental, por meio da injeção de uma substância química inerte no interior do reator. Tal substância é denominada traçador e é injetada em um tempo $t = 0$, medindo-se a concentração do traçador na corrente efluente em função do tempo. O traçador deve possuir propriedades

químicas semelhantes às da mistura reagente e ser completamente solúvel na mistura, além de adsorver nas paredes ou em quaisquer outras superfícies do reator (Curie, 2009).

As duas técnicas mais utilizadas para a injeção do traçador são as perturbações em pulso e em degrau. Na primeira, uma determinada quantidade de traçador é subitamente injetada em uma única vez na corrente de alimentação do reator no menor tempo possível e, assim, a concentração de saída é avaliada em função do tempo (Curie, 2009).

A principal dificuldade da aplicação da perturbação tipo pulso está na obtenção de um pulso razoável na entrada do reator, já que esta deve ser feita em um período de tempo muito curto comparado com tempos de residência frequentemente aplicados. Além disso, é necessário que a dispersão entre o ponto de injeção e a entrada para o sistema de reatores seja desprezível (Fogler, 2009).

Já na técnica com perturbação em degrau, a alimentação do traçador na corrente de entrada é mantida constante até que a concentração no efluente seja indistinguível daquela na alimentação (Curie, 2009). As perturbações do tipo degrau e pulso são demonstradas na Figura 3.2.

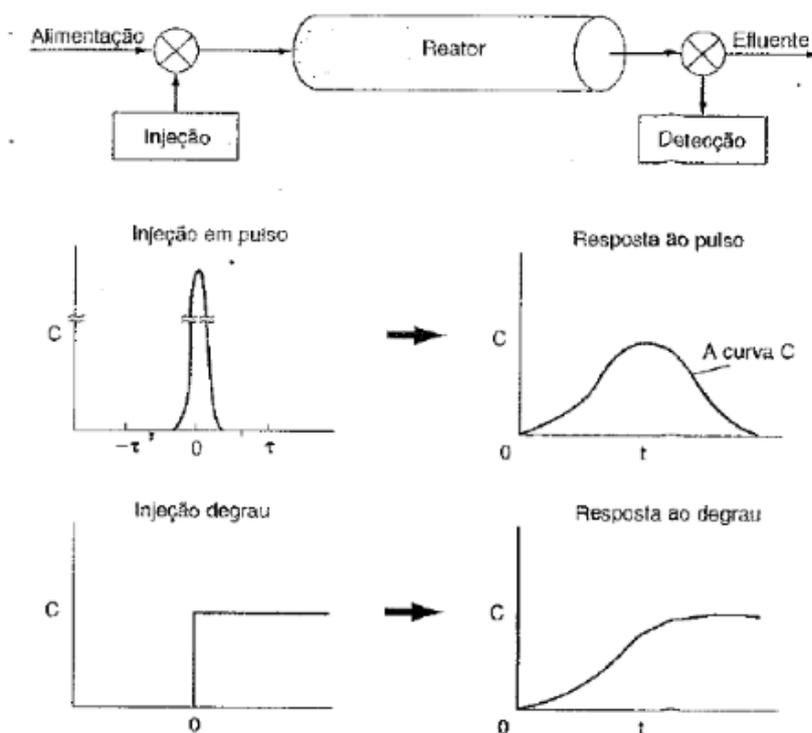


Figura 3.2 – Reator Contínuo com injeção de traçador tipo pulso e degrau com detecção no efluente para medidas de DTR.

Fonte: Adaptado de Fogler, 2009.

Os modelos são por natureza semi-empíricos e, devido a isto, certo modelo é utilizado preferencialmente a outro, para determinado tipo de escoamento. Como exemplo, um dos modelos que representa fisicamente, de maneira mais adequada, o escoamento em um reator com enchimento (leito fixo) é denominado modelo de dispersão axial. Reatores de escoamento em mistura em série são bem representados utilizando-se o modelo de tanques em série (Fogler, 2009).

O modelo de dispersão é também utilizado para descrever reatores tubulares não ideais, pois neste modelo existe uma dispersão axial do material governada por uma analogia com a lei da difusão descrita por Fick. Desta maneira, além do transporte pelo escoamento da massa fluida, cada componente da mistura é transportado ao longo de qualquer seção transversal do reator, sendo sua taxa resultante das difusões molecular e convectiva (Sweetland, 2009).

3.4 Cinética de Processos Fermentativos

Consiste, primeiramente, na análise do progresso dos valores de concentração de um ou mais elementos do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação, sendo neste caso os elementos utilizados o microrganismo (biomassa), os produtos do metabolismo (metabólitos) e os substratos que compõem o meio de cultura (Hiss, 2001).

O objetivo primordial da cinética de processos microbianos é quantificar as taxas de crescimento celular, de gasto de substrato, de formação de produtos e demais parâmetros relacionados (Viegas, 2003). Sendo possível ainda compreender a influência dos fatores externos como pH, temperatura, inibidores, entre outros (Tosetto, 2002).

O estudo da cinética de processos fermentativos possui ainda como finalidades estimar a velocidade de transformação que ocorre durante uma fermentação; analisar a influência dos fatores nesta velocidade, tais como pH e temperatura; correlacionar através de equações empíricas, ou de modelos matemáticos, as velocidades com os fatores que nela influenciam e aplicar as equações na otimização e controle de processos (Tosetto, 2002).

Os modelos cinéticos mais usualmente utilizados em processos fermentativos são divididos em (Bononi e Schmidell, 2001):

- Não estruturados e não segregados, nos quais as células de microrganismos são ajustadas como solutos;
- Estruturados e não segregados, nos quais as células são analisadas como seres individuais de múltiplos componentes, todavia com composição média semelhante;
- Não estruturados e segregados, nos quais as células são analisadas como seres individuais distintos, todavia descritos por um único componente; e
- Estruturados e segregados, nos quais as células de microrganismos são tratadas como indivíduos distintos e formados por múltiplos componentes.

Na literatura, o modelo mais comumente encontrado para descrever processos fermentativos é o tipo não estruturado e não segregado, sendo que a Equação mais simples e popular para descrever o crescimento microbiano é a Equação de Monod, pois considera-se a presença do substrato como limitante para o crescimento. A cinética de Monod é aplicada somente quando não há presença de produtos metabólicos tóxicos (Han e Levenspiel, 1988; Luong, 1985 *apud* Cruz, 2015).

A complexidade da definição cinética que é exigida e apropriada depende das condições físicas e da aplicação desejada, não sendo assim possível a formulação de um modelo que compreenda todos os parâmetros e características celulares (Stremel, 2001).

Em um processo de biotransformação, um dos fatores mais relevantes é o estudo da cinética envolvida, sendo a partir dele a aquisição de conhecimento básico do processo. A cinética de biotransformação está relacionada com alguns aspectos como a velocidade de consumo de substrato e de geração de produto e, em casos mais específicos de processos de fermentação com uso de leveduras, pode-se acrescentar a velocidade de crescimento celular, bem como o resultado que tais velocidades apresentam por influência das condições do meio em processo (Andrietta, 2006).

3.4.1 Modelagem Cinética

A modelagem matemática possibilita organizar informações aparentemente desconectadas a respeito dos fenômenos biológicos num conjunto coerente, raciocinar de forma lógica sobre quais componentes e interações são importantes no sistema, encontrar novas estratégias para ilustrar o comportamento do sistema submetido a condições específicas, ajustar eventuais falhas existentes no entendimento convencional de

determinados fenômenos e, enfim, entender as características qualitativamente essenciais de um certo processo (Bailey, 1998; Ingham et al., 2007; Huallanco, 2010).

A principal finalidade da modelagem e simulação é antecipar o comportamento dinâmico e estacionário do processo, até mesmo em condições não testadas empiricamente, permitindo a determinação de condições operacionais tecnicamente ótimas do sistema, avaliando o projeto e a adequação de algoritmos de controle, no qual o modelo matemático estabelecido passa a ser parte integrante do mesmo (Bonomi e Schmidell, 2001; Ingham et al., 2007; Huallanco, 2010).

Ultimamente, devido ao grande e rápido desenvolvimento da informática e da existência e disponibilidade de simuladores industriais ou da possibilidade de serem desenvolvidos, é inaceitável expandir a escala de reatores sem ao menos algum grau de modelagem (Toledo, 1999; Ferreira, 2003).

O modelo a ser utilizado pode ser fundamental e baseado em informações de vários aspectos do processo, enlaçadas e fundidas num conjunto de equações simulando o reator, ou pode ser semi-empírico, fundamentando-se em experimentos iniciais/ pilotos para ajuste dos chamados "parâmetros efetivos do modelo" (Ferreira, 2003).

A modelagem matemática de processos fermentativos pode ser determinada como a tentativa de representar, por meio de equações matemáticas, os balanços de massa para cada componente no biorreator, associados às complexas alterações bioquímicas que acontecem no processo e às velocidades com que tais alterações se processam (Bonomi e Schmidell, 2001).

Devido à complexidade do processo real, o qual abrange leis físico-químicas, bioquímicas e genéticas, adicionada às restrições matemáticas, os modelos são baseados, basicamente, na idealidade e, em geral, provêm uma reprodução fiel de apenas algumas das propriedades do processo. De acordo com a literatura, para a formulação de um modelo matemático é necessário haver um comprometimento entre grau de complexidade possível e solução, ou esforço computacional, economicamente desejável. Já a simulação do processo diz respeito à sua análise, por exemplo, sua otimização, por meio da utilização do modelo matemático proposto (Bonomi e Schmidell, 2001).

Os modelos matemáticos são indispensáveis para a descrição do comportamento estacionário e dinâmico dos biorreatores. O tipo de modelo e o grau de complexidade na reprodução do sistema depende do uso para o qual o modelo será desenvolvido. O

interesse na modelagem de operações em estado estacionário tem aumentando de forma significativa devido à sua importância no planejamento do reator e no controle de processos (Ferreira, 2003).

O desenvolvimento da modelagem matemática dos processos fermentativos permite alcançar alguns objetivos, como (Bonomi e Schimidell, 2001):

- Organizar informações “desconexas” a respeito dos fenômenos biológicos num conjunto coerente;
- Pensar e calcular de maneira lógica a respeito de quais componentes e interações são importantes num sistema complexo;
- Descobrir novas estratégias para ilustrar o comportamento das células submetidas a determinados ambientes;
- Corrigir possíveis falhas existentes no entendimento convencional de determinados fenômenos;
- Entender as características qualitativamente essenciais de determinados processos

De acordo com os autores supracitados, a principal deficiência na modelagem matemática dos bioprocessos está na cinética microbiana incorreta e imprecisa e por isso é necessário um modelo que proponha o comportamento da maneira mais eficaz possível, sendo capaz de prever até mesmo o comportamento dinâmico. Não obstante, Toletto (1993) alerta sobre o fato de que um modelo dinâmico demanda um grande esforço computacional, aumentando o tempo de processamento.

Algumas características podem dificultar a construção de um modelo matemático para biorreatores, como por exemplo, baixas concentrações e baixas velocidades de reação resultante do uso de um meio diluído, complexidade de misturar reagentes e a capacidade das células microbianas, ou sistema, de sintetizar seu próprio catalisador.

O conhecimento escasso de vários fenômenos que podem limitar a velocidade de produção e falta de sensores para automação on-line, dificuldades quanto à esterilidade, segurança e eventualmente da toxicidade dos processos fermentativos são outros pontos que devem ser considerados (Bonomi e Schimidell, 2001).

O crescimento microbiano pode ser simulado por equações empíricas simples ou por modelos fenomenológicos que delineiam os processos relacionados ao crescimento. Geralmente, a maioria dos modelos fenomenológicos propostos se limitam a expor como o crescimento microbiano pode ser limitado por eventos que acontecem dentro do

biorreator. Um modelo fenomenológico é composto por um conjunto de relações matemáticas entre as variáveis de interesse do sistema em estudo (Bonomi e Schimidell, 2001).

Dentre os modelos empíricos utilizados para simular o crescimento microbiano, pode-se citar os modelos lineares, logísticos, exponenciais ou de duas fases (Viccini *et al.*, 2001; Mitchell *et al.*, 2004; Mazutti, 2009).

A fim de estabelecer um melhor entendimento sobre os modelos, estes são classificados em pseudo-homogêneos e heterogêneos, sendo que estes modelos não consideram de forma específica a presença de células no sistema, ou seja, não diferenciam a fase fluida e a fase sólida, enquanto os modelos heterogêneos, em contraposição, proporcionam equações de conservação para o fluido e célula, propondo ainda equações distintas para ambas as fases. É possível citar ainda, abordagens pseudo-homogêneas alteradas, que compreendem de maneira implícita a presença de células (Toledo, 1993; Ferreira, 2003).

Inúmeros fatores como as perdas no processo e a evaporação, além da adição de soluções e ácidos/bases para a correção do pH, adição de antiespumante, produção de substâncias que alteram o volume do meio, o crescimento celular, entre outros, podem afetar de forma significativa as diversas concentrações e, logo, os valores dos parâmetros calculados. Os valores de rendimento, eficiência, produtividade e taxas de produção e de consumo, podem sofrer alterações devido ao volume de biomassa no meio fermentativo, sendo estes efeitos calculados a partir das concentrações de substrato e de produto, medidas em experimentos (Borges, 2008).

Apesar da existência de vários trabalhos que discutem sobre cinética de fermentação, houve pouca influência destes sobre a disposição das plantas industriais instaladas no país. Entretanto, o projeto de uma planta de fermentação tem que, obrigatoriamente, passar por uma modelagem detalhada do processo, por meio do uso de modelos cinéticos precisos que permitam a obtenção de condições ótimas de operação. Todavia, a manutenção de tais condições irá depender da seleção de uma estratégia de controle apropriada, sendo isso possível somente através do conhecimento do comportamento do processo, podendo tal escolha ser realizada de forma adequada, por meio de um estudo prévio de modelagem da planta e simulação em computador (Andrietta, 1994).

Um modelo é qualquer objeto, seja concreto ou abstrato, utilizado para explicar o fenômeno de interesse. Para isso, é empregado um conjunto de dados e idéias que permitem relacionar as múltiplas variáveis do problema, ou seja, o modelo torna possível estabelecer relações quantitativas precisas entre as variáveis do problema, tornando-se assim um modelo matemático (Pinto e Lage, 1997).

3.4.1.1 Modelo de Monod

O estudo cinético dos processos fermentativos não é recente, sendo o modelo de *Monod* o mais simples para se determinar a velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ). Em 1949, o biólogo francês Jacques Monod relacionou a velocidade específica de crescimento microbiano com a concentração de substrato (Ferreira, 2003). A Equação empírica proposta por ele tem sido frequentemente utilizada para explicar tal relação, sendo expressa na Equação (3.1) da seguinte forma:

$$\mu_x = \mu_{m\acute{a}x} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \quad (3.1)$$

Sendo:

μ_x = velocidade específica de crescimento (h^{-1})

$\mu_{m\acute{a}x}$ = velocidade máxima específica de crescimento ou reprodução (h^{-1})

S = concentração do substrato limitante (g/L)

K_s = constante de *Monod* (depende do microrganismo e das condições de cultura) (g/L)

Para a constante de *Monod*, ou constante de saturação K_s , é possível deduzir seu significado fazendo-se $S = K_s$ na Equação (1), resultando em $\mu_x = \frac{\mu_{m\acute{a}x}}{2}$, ou seja, a constante mencionada representa a concentração de substrato na qual a velocidade específica de crescimento é a metade de seu valor máximo (Hiss, 2001).

Tal modelo é válido somente para sistemas onde não ocorra interferências significativas de inibidores, tais como, baixas concentrações de etanol no meio de fermentação (Ferreira, 2003).

Na prática, a ausência de inibição é pouco comum, especialmente durante um cultivo descontínuo, no qual há um acúmulo crescente de metabólitos que interferem de

forma bastante desfavorável sobre o metabolismo e crescimento do microrganismo. Isso poderia ser abrandado caso fosse utilizado um valor inicial relativamente baixo da concentração do substrato, resultando em baixas concentrações de produtos inibidores (Hiss, 2001).

Todavia, do ponto de vista industrial, tal alternativa não seria viável, pois baixas concentrações de produtos ocasionariam custos elevados na fase posterior de separação e purificação da substância de interesse (Hiss, 2001).

3.4.1.2 Modelo de Contois

O modelo de Monod descreve satisfatoriamente cultivos que possuem baixa densidade celular e baixa concentração de substrato. Nos modelos que possuem elevados valores destas características é necessário realizar algumas modificações (Neto, 2004).

Em meio a inúmeros modelos propostos para atender a tais alterações, destaca-se o modelo de Contois. Este modelo apresenta-se como o mais apropriado para culturas com alta densidade celular, quando a velocidade específica de crescimento celular decresce com a concentração celular (Blanch e Clarck, 1997). O modelo de Contois é descrito pela Equação (3.2).

$$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x} C_S}{K_X C_X + C_S} \quad (3.2)$$

Sendo:

K_X = parâmetro do modelo de Contois ($g_s \cdot g_x^{-1}$).

C_X = concentração de células (g/L)

C_S = concentração de substrato (g/L)

$\mu_{m\acute{a}x}$ = velocidade máxima específica de crescimento ou reprodução (h^{-1})

3.4.1.3 Modelo de Saturação pela Célula

É possível encontrar na literatura diversas formas de relacionar a velocidade específica com os fatores de inibição. O modelo utilizado pressupõe que a inibição é feita pela concentração celular, sendo proposto por Chattaway, Goma e Renaud (1988).

Chattaway *et al.* (1988) propuseram um modelo para o termo de inibição pela concentração celular, observado na Equação (3.3). A velocidade específica de crescimento celular (μ) foi expressa em função somente da biomassa por meio da Equação logística descrita por Verhulst (1844) e Pearl e Reed (1920) citados em Bailey and Ollis, conforme Equação (3.3):

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \left(1 - \frac{X}{X_{\text{máx}}} \right) \quad (3.3)$$

Sendo:

$\mu_{\text{máx}}$ = velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1})

$X_{\text{máx}}$ = concentração celular máxima (g/L)

3.4.1.4 Outros Modelos Cinéticos

Na literatura estão disponíveis diversos modelos capazes de descrever o comportamento dos processos fermentativos. A multiplicidade de modelos cinéticos que descrevem o crescimento dos microrganismos é devida, principalmente, pelo fato de que os modelos são construídos para uma levedura específica, em condições experimentais pré-definidas (Dourado *et al.*, 1987).

Tabela 3.2 – Modelos Cinéticos descritos na literatura

Autor	Modelo Cinético	
Wang e Sheu (2000)	$\mu = \mu_{\text{máx}} \left(\frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}} \right) \left(\frac{K_P}{K_P + P + \frac{P^2}{K_1}} \right)$	3.4
Tosetto e Andrietta (2002)	$\mu = \mu_{\text{máx}} \left(\frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{\text{máx}}} \right)^n$	3.5
Andrietta <i>et al.</i> , 2003	$\mu = \mu_{\text{máx}} \left(\frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}} \right) \left(1 - \frac{P}{P_{\text{máx}}} \right)^n \left(1 - \frac{X}{X_{\text{máx}}} \right)^m$	3.6

Fonte – Adaptado da Literatura.

Os modelos descritos na Tabela 3.2 consideram os efeitos inibitórios pelos substratos, produto e célula. Quando há altas concentrações de produto acontece a inibição da velocidade específica de crescimento pelo substrato, o que acarreta a anulação do crescimento celular a partir de uma determinada concentração (Borges, 2008; Ferreira, 2003).

Levenspiel (1980) explicou que para uma concentração P significativamente menor que o valor de $P_{máx}$ a Equação (3.7) se reduz à Equação (3.1), que traduz o modelo cinético de Monod:

$$\mu = \mu_{máx} \left(1 - \frac{P}{P_{máx}}\right)^n \left(\frac{S}{K_S + S}\right) \quad (3.7)$$

Sendo:

$\mu_{máx}$ = velocidade específica de crescimento máxima (h^{-1})

S = concentração do substrato limitante (g/L)

K_S = constante de *Monod* (depende do microrganismo e das condições de cultura) (g/L)

P = concentração do produto (g/L)

$P_{máx}$ = concentração máxima de produto

3.4.1.5 Sensibilidade Paramétrica

A análise da sensibilidade paramétrica em conjunto com a avaliação da correlação entre os parâmetros, fornece um procedimento sistemático para avaliar a precisão e robustez de um modelo matemático. As matrizes de sensibilidade, que são as derivadas parciais das variáveis do processo em relação aos parâmetros do modelo, são de ampla importância nas análises de incerteza, estimação de parâmetros e otimização e também nas análises de dados experimentais e discriminação de modelos (Wang e Sheu, 2000; Sanz e Voss, 2006).

A análise de covariância e correlação para um conjunto de parâmetros a serem estimados é recomendada, independente do processo de estimação, utilizando para isso os melhores valores dos parâmetros avaliados. A análise sugere quais parâmetros são independentes e quais são co-dependentes no processo, sendo que parâmetros co-

dependentes não podem ser calculados simultaneamente (Sanz e Voss, 2006)., Borges, 2008)

O processo de redução desses parâmetros pode ser utilizado, aplicando-se um processo passo a passo, no qual elimina-se vários parâmetros e realiza uma nova análise de covariância e correlação, havendo a possibilidade de que o conjunto de parâmetros seja reduzido novamente. Ainda que a convergência do modelo ocorra, a estimativa dos parâmetros pode estar incorreta, sendo que correlações muito altas (próximas de ± 1) podem indicar que os parâmetros estão incorretos (Sanz e Voss, 2006).

A correlação entre parâmetros é denominada como uma medida que indica o quanto um parâmetro afeta o valor de uma variável observada, da mesma maneira, ou de forma oposta, que outro. Parâmetros que apresentam certa independência em um modelo podem mudar as variáveis observadas de maneira análoga, e com isso, demonstrar alguma correlação, sendo que esta nunca pode ser menor do que -1 e maior do que +1 (Sanz e Voss, 2006; Borges, 2008)

A correlação entre dois parâmetros b_i e b_j , pode ser determinada como:

$$cor(b_i, b_j) = \frac{cov(b)_{i,j}}{[cov(b)_{ii} cov(b)_{jj}]^{1/2}} \quad (3.8)$$

Sendo:

$cov(b)$ = matriz de covariância $N \times N$ originada da matriz de sensibilidade (se), e N é o número total de parâmetros estimados.

$$cov(b) = \sigma^2 (se^T \omega se)^{-1} \dots\dots\dots (3.9)$$

Sendo:

b = o vetor que contém os valores dos parâmetros cujas sensibilidades são avaliadas;

σ^2 = variância dos erros;

ω = matriz de pesos.

A covariância pode ser avaliada pela Equação 3.8, quando fornecidas as sensibilidades. A variância dos parâmetros considerados é dada como termos descritos ao longo da diagonal $cov(b)_{ii}$ (Borges, 2008).

3.5 Otimização

A otimização matemática é um campo da ciência computacional que busca a melhor resposta possível para problemas nos quais a qualidade de uma resposta pode ser avaliada por um número. Esses problemas surgem em praticamente todas as áreas do conhecimento tais como as ciências físicas, químicas e a engenharia, sendo a quantidade de ferramentas disponíveis para auxiliar nesta tarefa quase tão vasta quanto o número de aplicações (Junior, 2013).

Os métodos de otimização podem ser divididos em determinístico, estocástico ou aleatório. Um método de otimização é chamado de *Determinístico* quando é possível prever todos os seus passos conhecendo seu ponto de partida, ou seja, leva sempre à mesma resposta se partir do mesmo ponto inicial.

Em contrapartida, os métodos *Estocásticos* ou *Aleatórios*, são métodos nos quais o caráter aleatório de vários processos é simulado. Neles, várias escolhas são feitas com base em eventuais números, sorteados no momento de execução do código (Junior, 2013; Saramago *et al*, 2008). A cada execução do código os números sorteados são distintos e, com isso, um método aleatório não irá executar a mesma sequência de operações em duas implementações sucessivas. Ainda que partam do mesmo ponto inicial, cada execução do código irá adotar um caminho diferente e, provavelmente, levará a uma resposta final diversa.

Dentre os métodos utilizados para otimizar processos, o método mais frequentemente utilizado na Engenharia Química é o método tipo gradiente. Este método emprega a derivada de uma função para encontrar seu ótimo, sendo um método determinístico. Seu uso não é aconselhável quando existir descontinuidades na função objetivo ou houver mais de um mínimo, não for possível escrever uma função objetivo diferenciável ou quando o cálculo das derivadas for inviável (Junior, 2013; Saramago *et al*, 2008).

Em casos como este, será necessário a utilização de métodos heurísticos de otimização (Junior, 2013; Saramago *et al*, 2008). Um método heurístico de otimização será normalmente estocástico, e irá auxiliar na determinação de boas soluções, mas não necessariamente ótimas. Este método envolve a análise de diversos fatores para escolha do melhor caminho a seguir (Junior, 2013)

A visualização gráfica do comportamento da variável resposta, como método de otimização, é possível quando temos a influência de poucas variáveis. Para um problema com mais fatores essa visualização é difícil e é necessário utilizar técnicas baseadas no gradiente ou heurísticas.

A análise de superfícies de resposta permite a investigação de efeitos individuais, interações entre as variáveis e avaliação de erros experimentais e de regressão, além do equacionamento empírico dos resultados em função das variáveis escolhidas, diminuindo o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (Box *et al.*, 1978). Trabalhos realizados por Rodrigues (2005) e Lima (2007) utilizaram esta técnica de otimização para a produção de biossurfactantes para se chegar as condições ótimas do processo, avaliando os efeitos /impactos que os fatores avaliados tiveram nas respostas desejadas.

CAPÍTULO IV - MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais e a metodologia utilizada para a produção do biossurfactante, os modelos utilizados e os procedimentos utilizados nas modelagens e na otimização.

O ajuste dos parâmetros dos modelos cinéticos foi realizado com base nos perfis de concentração de substrato (S), produto (P) e células (X). Tais modelos foram desenvolvidos para a determinação da velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ) em função destas variáveis estudadas.

4.1 Produção do Biossurfactante em Reatores Batelada

A cultura empregada nos experimentos de produção de biossurfactantes foi *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, proveniente da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello em Campinas-SP, foi utilizada nos experimentos de produção de biossurfactante, segundo descrito no esquema abaixo.

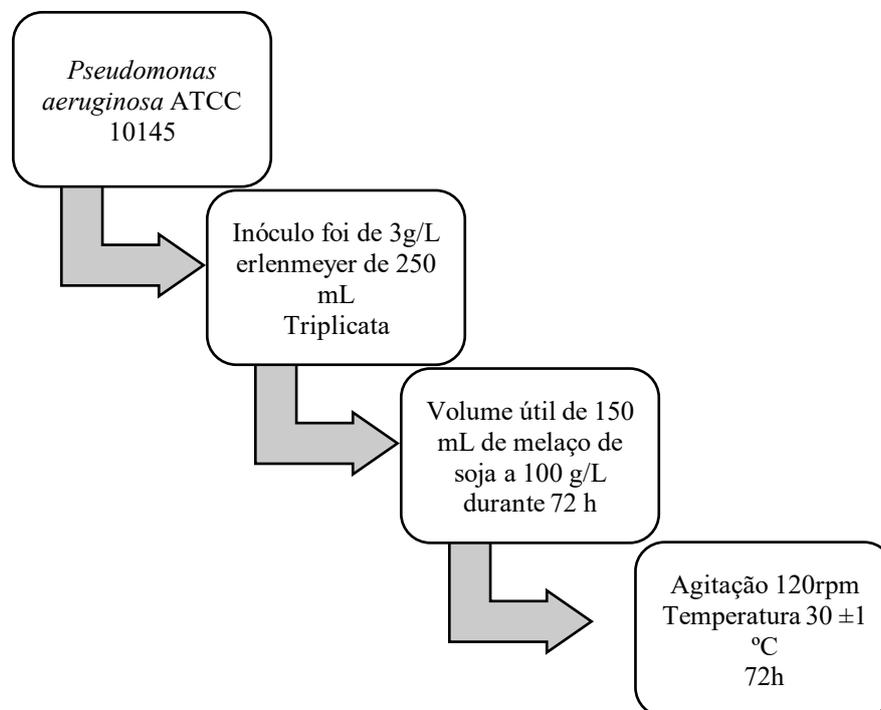


Figura 4.1 – Esquema de Produção de Biossurfactante em Operação Batelada

Fonte: Autor, 2018.

Os experimentais foram realizados nas condições otimizadas experimentalmente da produção do biossurfactante (concentração de melação de soja 100 g/L e concentração de inoculo 3 g/L), as mesmas obtidas no estudo de Rodrigues (2016). O estudo cinético da produção de raminolípídeo, do consumo de melação e do crescimento da biomassa foi realizado em fermentador de bancada com controle de temperatura durante 72 horas.

A quantidade inicial de inoculo foi de 3g/L e os experimentos foram realizados em triplicata em erlenmeyer de 250 mL, com volume útil de 150 mL de melação de soja a 100 g/L, durante 72 horas. Os erlenmeyers foram agitados a 120 rpm em temperatura de 30 ± 1 °C por um período total de 72 horas em uma mesa agitadora com controle de temperatura. Amostras de 30 mL foram retiradas a cada 12 horas e centrifugadas a 12.096 g. A concentração de raminose, índice de emulsificação, tensão superficial e concentração de biossurfactante foram analisados no sobrenadante.

4.2 Experimento em Coluna para a Validação dos Parâmetros dos Modelos

As informações descritas no trabalho de Rodrigues (2016) para a produção de biossurfactantes em operação batelada foram utilizadas como modelo para o experimento de validação dos parâmetros ajustados na presente pesquisa.

Após o experimento em reator com operação batelada com posterior ajuste paramétrico, foi realizado o experimento em coluna com operação contínua para que os parâmetros fossem validados. Inicialmente foi realizada a fixação dos microrganismos em partículas de alginato de sódio para alimentação no reator e posterior realização de análises quantitativas da tensão superficial, índice de emulsificação, concentrações de raminose.

A determinação da distribuição dos tempos de residência foi iniciada com a injeção de um traçador no reator e foram realizadas as análises da variância, coeficiente de dispersão axial e do tempo de residência médio.

4.2.1 – Fixação das *Pseudomonas aeruginosas* em Partícula de Alginato de Sódio

As bactérias foram crescidas em melação de soja 120 g/L em erlenmeyers de 150 mL, com concentração inicial de 3,704 g/L, por 24 horas, com agitação de 120 rpm e temperatura ambiente em uma mesa agitadora. Utilizou-se 30 mL desse inóculo pré-

preparado em erlenmeyers contendo outros 120 mL do mesmo meio para que então fosse realizada a fermentação, conforme demonstrado no fluxograma a seguir:

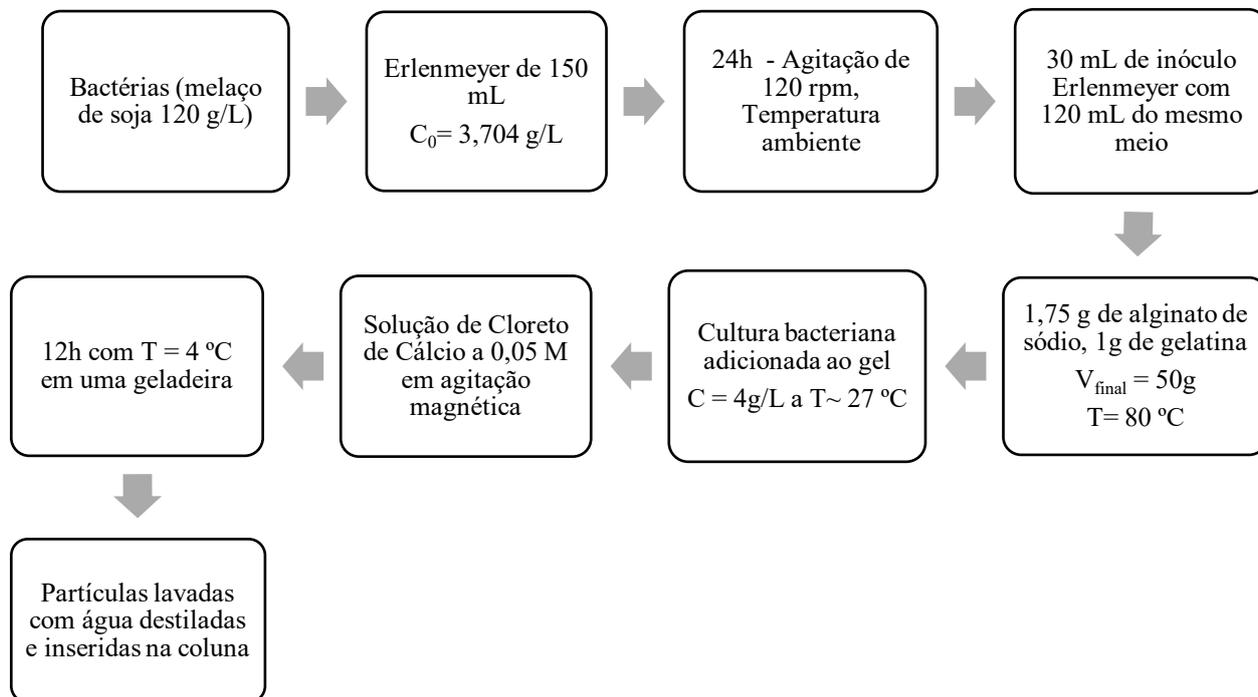


Figura 4.2 – Fluxograma do experimento realizado para fixar os microrganismos na Partícula de Alginato de Sódio

Fonte: Autor, 2018

Para a fixação das *P. aeruginosas* foi utilizado 1,75 g de alginato de sódio, 1 g de gelatina dissolvida em água para um volume final de 50 g, a uma temperatura de 80 °C. Posteriormente, adicionou-se a cultura microbiana ao gel para obter uma concentração final de 4 g/L na temperatura ambiente (~ 27 °C). A suspensão resultante foi gotejada em solução de cloreto de cálcio a 0,05 M em agitação magnética, utilizando para isso uma bomba peristáltica.

As partículas foram mantidas nesta solução durante 12 horas a uma temperatura de 4 °C em uma geladeira. Em seguida foram lavadas com água destilada e colocadas na coluna.

4.2.2 Aparato Experimental e Condições Operacionais

Para a validação foi utilizado um reator em coluna de 38 mL com altura de 10,9 cm, 2,18 cm de diâmetro e vazão de 0,02 mL/min, sendo o diâmetro médio das partículas, que continham as bactérias imobilizadas, de 0,287 cm, conforme Figura 4.3.

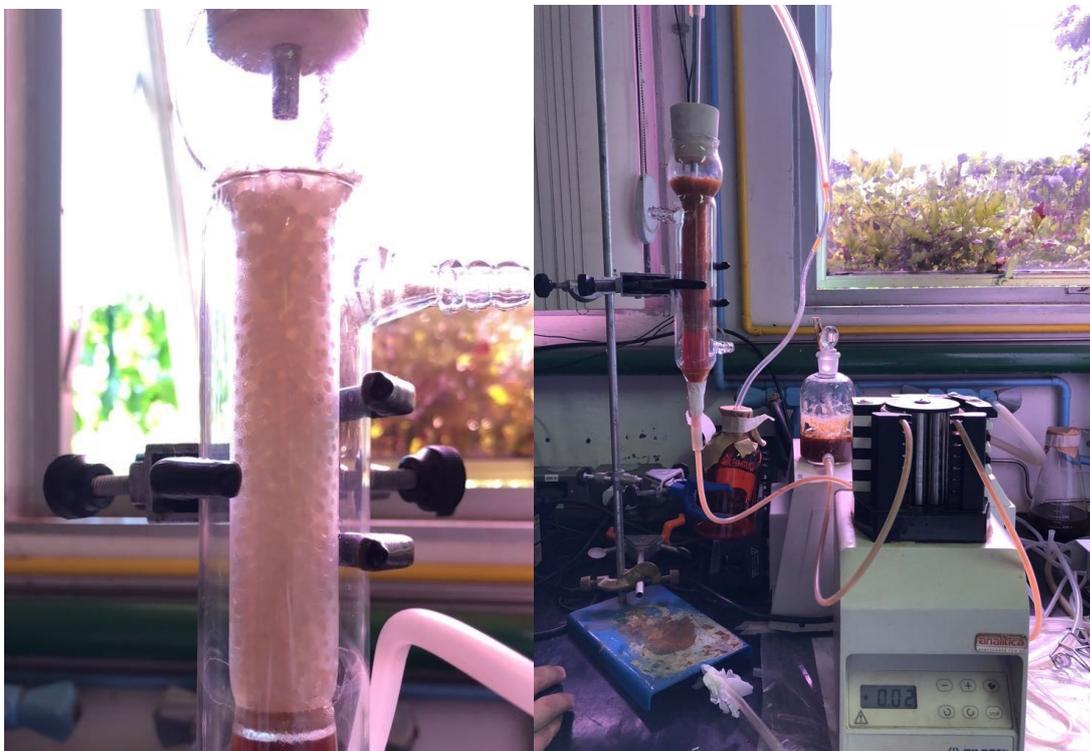


Figura 4.3: Reator em coluna com *Pseudomonas* imobilizadas (Reator de Leito Fixo)

Fonte: Acervo do autor

A quantidade inicial de microrganismo empregada foi de 3,704 g/L e os experimentos foram realizados em triplicata no reator com um volume vazio do reator de 21% com volume fixo de melação de soja, a 120 g/L, de 8 mL. As quantidades iniciais de lipídeo e sacarose (substratos 1 e 2) foram de 35,9 g/L e 25,39 g/L respectivamente. O fluxograma do aparato experimental e das condições operacionais é exposto pelo esquema descrito na Figura 4.4:

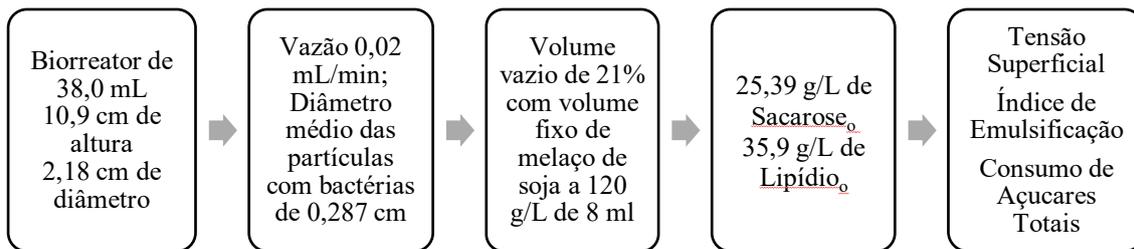


Figura 4.4 – Representação do Experimento em Coluna para Validação dos Parâmetros Cinéticos

Fonte: Autor, 2018.

Foram avaliadas as respostas tensão superficial, índice de emulsificação e concentração de biossurfactante. As análises quantitativas foram realizadas pela coleta de amostras na saída da coluna e centrifugadas a 12.096 g durante 20 minutos para remover as células.

4.2.3 Determinação da distribuição de tempos de residência (DTR) no experimento de coluna

A DTR no reator em coluna foi realizada pela injeção de traçador com perturbação do tipo degrau. O traçador empregado foi uma solução de cloreto de sódio P.A. (0,1 M). A perturbação do tipo degrau foi realizada trocando água pela solução do traçador cloreto de sódio na vazão de 0,02 ml/min.

4.2.3.1- Cálculo do tempo de residência médio

O tempo de residência médio foi determinado por meio da função F , adimensionalizada pela determinação da área que a curva $F(t)$ delimita com o eixo das ordenadas (área acima da curva definida por $F(t)$ em função do tempo). A expressão da função F (distribuição cumulativa da concentração do traçador) foi escrita conforme Equação (4.23).

$$F(t) = \frac{\lambda_t - \lambda_0}{\lambda_\infty - \lambda_0} \quad (4.23)$$

Sendo:

λ_t = Condutividade elétrica na saída do reator em cada instante;

λ_o = Condutividade elétrica na saída do reator no tempo inicial;

λ_∞ = Condutividade elétrica na saída do reator no tempo final.

A área acima da curva foi calculada pela diferença entre a área total e a área abaixo da curva, calculada pelo *software Origin 7.0*[®].

O tempo de residência teórico (τ_{teo}) foi calculado por meio da Equação (4.24) (tempo de residência ideal).

$$\tau_{teo} = \frac{\varepsilon V_R}{v} \quad (4.24)$$

Sendo:

ε = porosidade do reator;

V_R = volume do reator (L^3)

v = vazão utilizada ($L^3 \cdot T^{-1}$).

4.2.3.2 - Cálculo da Variância

A variância σ^2 , que representa o efeito de dispersão da distribuição, trata-se de um parâmetro estatístico que foi estimado pela Equação (4.25).

$$\sigma^2 = \int_0^{\infty} (t - \tau)^2 E(t) dt \quad (4.25)$$

As curvas de $E(t)$ foram obtidas pela Equação (4.26):

$$E(t) = \frac{dF(t)}{dt} \quad (4.26)$$

A derivada da função $F(t)$ foi calculada pelo *software Origin*[®], após o ajuste aos dados de $F(t)$ por uma função sigmóide com coeficiente de determinação superior 0,998 para evitar o aparecimento de erros. O tempo médio de residência foi calculado utilizando a função $E(t)$ para checar a existência ou não de erros, devido à realização da derivação da função $F(t)$.

4.2.3.3 - Cálculo do Coeficiente de Dispersão Axial

O coeficiente de dispersão axial foi calculado utilizando a DTR e considerando a Equação apresentada por Levenspiel (1974), para tanques fechados com grande dispersão (caso utilizado neste trabalho) e dado pela Equação (4.27):

$$\sigma_{\theta}^2 = \frac{\sigma^2}{\tau^2} = 2 \frac{1}{Pe} - 2 \left(\frac{1}{Pe} \right)^2 (1 - e^{-Pe}) \quad (4.27)$$

Sendo:

σ_{θ}^2 = Variância

τ = Tempo de residência (h)

Pe = Número de Peclet

O número de Peclet é considerado a razão entre a taxa de transporte por convecção e a taxa de transporte por difusão, ou dispersão, e é dado pela Equação (4.28):

$$Pe = \frac{uL}{D_{ax}} \quad (4.28)$$

Desta forma, conhecendo o Peclet, calcula-se posteriormente o coeficiente de dispersão axial pela Equação (4.27).

4.3 Metodologia Analítica

4.3.1 Tensão Superficial

A análise da tensão superficial foi feita segundo procedimento utilizado por Rodrigues (2016) com o intuito de determinar, de maneira indireta, a produção microbiana de biossurfactantes. Para tal, foi realizada empregando através do uso de 10 mL de meio sobrenadante em uma placa de Petri no tensiômetro previamente calibrado. A fim de garantir uma leitura mais precisa, foi feita a calibração do tensiômetro utilizando álcool etílico e água destilada, antes de todas as análises realizadas.

4.3.2 Índice de Emulsificação

Para a avaliação do índice de emulsificação, foi utilizado o método descrito por Cooper e GoldenBerg (1987), no qual é feita a adição de 6 mL de substrato hidrofóbico e 4 mL da amostra sobrenadante em um tubo de ensaio de vidro com tampa de rosca, sendo realizada a agitação dos tubos durante 2 minutos em um agitador de tubos Vortex. Após a agitação, durante 24 horas, o tubo permaneceu em repouso e, posteriormente, foi realizada a medição da emulsão formada, dada em porcentagem (Rodrigues, 2016). O valor do índice de emulsificação é dado pela relação entre a altura da camada emulsionada e a altura total, demonstrada pela Equação (4.34):

$$IE = \frac{h_e}{h_t} \times 100 \quad (4.34)$$

Sendo:

IE = porcentagem da emulsão

h_e = altura emulsionada e

h_t = altura total da mistura.

4.3.3 Concentração de Células

A determinação da biomassa foi feita através do valor da massa seca, sendo a amostra sólida presente no fundo do recipiente (retirada do sobrenadante pela centrifugação da amostra fermentada) suspensa novamente em água destilada, lavada e centrifugada por três vezes. Em seguida, depois da última centrifugação, a amostra foi suspensa em água destilada e levada a estufa a 80 °C por 24 horas em uma placa de Petri previamente pesada. A quantificação da massa seca foi feita por meio da diferença do peso final e inicial da placa, expressa em gramas por litro (Borges, 2011).

4.3.4 Concentração de Biossurfactante

A concentração de biossurfactante presente foi medida através da adição de 2 mL da amostra e 2 mL de acetato de etila P.A. em um tubo de ensaio de vidro rosqueado e agitado em vortex por 2 minutos. Em seguida, depois de acontecer a separação de fases, foi retirado 1 mL do sobrenadante e feita a medição da massa seca a 40 °C por 24 horas.

A quantificação da concentração de biossurfactante foi realizada pela diferença do peso final e inicial, expressa em gramas por litro. (Rodrigues, 2016)

4.3.4.1 Consumo de Açúcares Totais

Para identificar e quantificar os açúcares presentes no meio fermentativo realizou-se uma cromatografia líquida de alto desempenho HPLC (High Performance Liquid Chromatography), sendo empregado como fase móvel o ácido fosfórico (0,1%), com fluxo de 0,5 mL/min, temperatura do forno 32 °C e volume de injeção de 20 µL (Rodrigues, 2016).

4.3.4.2 Concentração da Raminose

Para a análise da raminose foram realizadas duas etapas para medir sua concentração no meio fermentativo. Inicialmente, adicionou-se 2 mL da amostra e 2 mL de acetato de etila P.A. em um tubo de ensaio de vidro com rosca, sendo agitado em Vortex por 2 minutos. Após a separação de fases, foi retirado 1 mL do sobrenadante para que a próxima etapa pudesse ser realizada. Através do método descrito por Rahman *et al.* (2002), em um tubo de ensaio de vidro com rosca foram adicionados 4,5 mL de ácido sulfúrico 70% ao 1 mL retirado na primeira etapa, e agitou-se o tubo em vortex por 2 minutos. Posteriormente, o tubo foi aquecido a 100 °C por 20 minutos e, depois de resfriada, foi adicionada a solução 0,1 mL de ácido tioglicólico 3%, deixando-a em repouso, na ausência de luz, por 3 horas. Após, foi feita a leitura da absorbância das soluções em comprimento de onda de 420 nm, em espectrofotômetro, modelo 10 UV.

4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada para avaliar afixação da cultura bacteriana e a morfologia das *Pseudomonas aeruginosas*. O microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca ZEISS foi utilizado para a captura das imagens dos microrganismos, sendo empregado o procedimento padrão.

As amostras analisadas corresponderam aos microrganismos após a fixação na matriz de alginato. Para a análise as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 min em centrífuga (marca Hitachi, modelo CF15RXII) de modo a separar a biomassa

do sobrenadante. As amostras com a biomassa foram preparadas segundo o método Karnovsky modificado (Karnovsky, 1965). O fixador Karnovsky modificado foi preparado com glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,5%, tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,2, e CaCl₂ 0,001 M. A amostra e o fixador foram colocados em tubo Eppendorff de 1,5 mL e a fixação ocorreu na geladeira por no mínimo 1 h. Após a fixação ocorreu a etapa de desidratação. A desidratação das amostras consistiu no preparo de soluções de concentração crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) permanecendo a amostra 10 min em cada uma. Na solução a 100% foi passada 3 vezes. Em seguida as amostras passaram pela secagem ao ponto crítico e, por fim, foram metalizadas com ouro, possibilitando a análise no MEV.

4.5 Modelagem Matemática do Processo de Produção de Biossurfactante em Operação Batelada: Determinação de Parâmetros Cinéticos

Para a avaliação foi utilizado um modelo clássico de produção de metabólitos por microrganismos. Tal modelo foi descrito por Luedeking e Piret e é demonstrado na Equação (4.1).

Neste, os autores entendem que quando o valor do parâmetro β da Equação é igual a zero é obtido um modelo de produção associado ao crescimento celular e, para esta mesma Equação, quando o valor de α é igual a zero, obtém-se um modelo não associado ao crescimento celular. A velocidade de produção está associada, de forma parcial, ao crescimento quando β (constante de formação de produto) e a razão entre a velocidade de produção e a velocidade de crescimento de células (α) são diferentes de zero (Neto, 2004).

$$r_p = \alpha r_x + \beta C_x \quad (4.1)$$

Sendo:

r_p = velocidade global de produção (mg.L⁻¹.h⁻¹)

α = razão entre as velocidade de produção e de crescimento celular (mg_p.g_x⁻¹)

β = constante de formação do produto (mg_p.g_x⁻¹.h⁻¹).

4.5.1 Balanço de Massa

Para o cálculo dos balanços de massa admitiu-se as variáveis de estado identificadas e obtidas pelos experimentos realizados nos laboratórios do núcleo de Engenharia Bioquímica da Faculdade de Engenharia Química, sendo quatro: crescimento de biomassa (X), as concentrações de lipídeos (S₁) e de sacarose (S₂) e raminose (P), a partir das quais foram formulados os modelos de reações metabólicas.

Nesta avaliação assumiu-se que o substrato S₁ foi consumido, juntamente ao substrato S₂, pela população microbiana para crescer e formar o produto metabólico P. A seguir são descritos os balanços de massa para as variáveis de estado, correlacionando-as com os termos associado e não associado ao crescimento dados pelo modelo de Luedeking e Piret.

- Biomassa

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - k_d X \quad (4.2)$$

- Substratos

$$\frac{dS_1}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S_1}} \frac{dX}{dt} - m_1 X \quad (4.3)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S_2}} \frac{dX}{dt} - m_2 X \quad (4.4)$$

- Produto

$$\frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_{X/P}} \frac{dX}{dt} + bX \quad (4.5)$$

Sendo:

μ = Velocidade específica de crescimento celular;

$\frac{dX}{dt}$ = Taxa de acumulo da biomassa;

$\frac{dS_1}{dt}$ = Taxa de acumulo do substrato 1;

$\frac{dS_2}{dt}$ = Taxa de acumulo do substrato 2;

$\frac{dP}{dt}$ = Taxa de acumulo do produto;

γ_{x/S_1} = Fator de conversão de substrato 1 em biomassa;

γ_{x/S_2} = Fator de conversão de substrato 2 em biomassa;

$\gamma_{x/P}$ = Fator de conversão de biomassa em produto;

m_2 , m_2 e b = termos associados e não associados ao crescimento.

Três modelos cinéticos foram utilizados, sendo eles os modelos de *Monod*, *Contois* e de Saturação pela Célula. A demonstração dos modelos foi realizada separadamente, descrevendo cada Equação correspondente. As equações de estado serão mantidas para os modelos alterando somente o termo μ , que satisfaz o modelo cinético utilizado.

Os parâmetros cinéticos são relacionados com a taxa de crescimento específico, e devido a isso qualquer mudança nestes parâmetros ocasiona alterações no comportamento dinâmico da velocidade de crescimento, sendo que isto ocorre graças à influência da cinética no processo fermentativo ser bastante significativa. A determinação de tais parâmetros deve ser o mais precisa possível, já que este é um fator importante para uma boa representação da cinética (Gomez, 2011). A variedade de modelos cinéticos que descrevem o crescimento microbiano é devida ao fato de que os modelos são estabelecidos para uma levedura específica em condições experimentais pré-definidas (Dourado et al., 1987).

4.6 Descrição dos Modelos

4.6.1 Modelo de Monod

Devido ao fato deste presente estudo trabalhar com dois substratos a Equação de Monod pode ser reescrita da seguinte forma, conforme Equação (4.9):

$$\mu_x = \mu_{m\acute{a}x} \left(\frac{S_1}{K_1 + S_1} \right) \left(\frac{S_2}{K_2 + S_2} \right) \quad (4.9)$$

Para o modelo de Monod, foram utilizadas as expressões de 4.10 a 4.13, adequando o modelo cinético às equações de balanço de massa.

- Biomassa

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left(\frac{S_1}{K_1 + S_1} \right) \left(\frac{S_2}{K_2 + S_2} \right) X - kdX \quad (4.10)$$

- Substratos

$$\frac{dS_1}{dt} = -\frac{1}{Yx/S_1} \left[\mu_{\max} \left(\frac{S_1}{K_1 + S_1} \right) \left(\frac{S_2}{K_2 + S_2} \right) X - kdX \right] - m_1 X \quad (4.11)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = -\frac{1}{Yx/S_2} \left[\mu_{\max} \left(\frac{S_1}{K_1 + S_1} \right) \left(\frac{S_2}{K_2 + S_2} \right) X - kdX \right] - m_2 X \quad (4.12)$$

- Produto

$$\frac{dP}{dt} = \frac{1}{Yx/P} \left[\mu_{\max} \left(\frac{S_1}{K_1 + S_1} \right) \left(\frac{S_2}{K_2 + S_2} \right) X - kdX \right] + bX \quad (4.13)$$

4.6.2 Modelo de Contois

Para este modelo foram adotados os parâmetros abaixo, reajustando as equações de balanço de massa para a implementação, conforme demonstrado nas equações (4.14) a (4.17).

- Biomassa

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left(\frac{C_{S1}}{K_1 C_X + C_{S1}} \right) \left(\frac{C_{S2}}{K_2 C_X + C_{S2}} \right) X - kdX \quad (4.14)$$

- Substratos

$$\frac{dS_1}{dt} = -\frac{1}{Yx/S_1} \left[\mu_{\max} \left(\frac{C_{S1}}{K_1 C_X + C_{S1}} \right) \left(\frac{C_{S2}}{K_2 C_X + C_{S2}} \right) X - kdX \right] - m_1 X \quad (4.15)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = -\frac{1}{Yx/S_2} \left[\mu_{\max} \left(\frac{C_{S1}}{K_1 C_X + C_{S1}} \right) \left(\frac{C_{S2}}{K_2 C_X + C_{S2}} \right) X - kdX \right] - m_2 X \quad (4.16)$$

- Produto

$$\frac{dP}{dt} = \frac{1}{Yx/P} \left[\mu_{\max} \left(\frac{C_{S1}}{K_1 C_X + C_{S1}} \right) \left(\frac{C_{S2}}{K_2 C_X + C_{S2}} \right) X - kdX \right] + bX \quad (4.17)$$

4.6.3 Modelo de Saturação pela Célula

O modelo de Saturação pela Célula possui como base o balanço de massa descrito pelas equações 4.2 a 4.5, sendo reajustadas ao modelo proposto, descrito no item 3.3.1.3 pela Equação 3.3 as equações obtidas são descritas de 4.15 a 4.18

- Biomassa

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\text{máx}} \left(1 - \frac{x}{x_{\text{máx}}} \right) X - KdX \quad (4.15)$$

- Substratos

$$\frac{dS_1}{dt} = -\frac{1}{Y_x/S_1} \left[\mu_{\text{máx}} \left(1 - \frac{x}{x_{\text{máx}}} \right) X - KdX \right] - m_1 X \quad (4.16)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = -\frac{1}{Y_x/S_2} \left[\mu_{\text{máx}} \left(1 - \frac{x}{x_{\text{máx}}} \right) X - KdX \right] - m_2 X \quad (4.17)$$

- Produto

$$\frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_x/P} \left[\mu_{\text{máx}} \left(1 - \frac{x}{x_{\text{máx}}} \right) X - KdX \right] + bX \quad (4.18)$$

Os rendimentos em biomassa e produto para os três modelos estudados foram calculados de acordo com as equações 4.19 a 4.21

$$Y_{X/S_i} = \left| \frac{X_T - X_0}{S_{iT} - S_{i0}} \right| \quad (4.19)$$

$$Y_{X/P} = \left| \frac{X_T - X_0}{P_T - P_0} \right| \quad (4.20)$$

$$Y_{P/S_i} = \left| \frac{P_T - P_0}{S_{iT} - S_{i0}} \right| \quad (4.21)$$

4.7 Ajuste Paramétrico

Uma vez obtidos os modelos matemáticos, foi realizado o ajuste paramétrico utilizando software “in-house” em Fortran no qual tem-se implementado o método

clássico de Levenberg-Marquardt (Nelles, 2001), implementando as equações 4.2 a 4.5 associadas às cinéticas de *Monod*, *Contois* e de Saturação pela Célula.

A integração do conjunto de equações diferenciais, para o cálculo dos parâmetros ajustados aos dados experimentais, foi realizada com o auxílio do algoritmo de quarta ordem de Runge-Kutta (Gill, 1951).

A correlação entre os parâmetros para avaliar a sensibilidade paramétrica foi realizada por meio da Equação 4.22:

$$cor(1, 2) = \frac{\sigma_{1,2}}{\sigma_1 \sigma_2} \quad (4.22)$$

Na qual os termos σ_1 e σ_2 são as variâncias dos parâmetros 1 e 2 e o termo $\sigma_{1,2}$ é a covariância entre os parâmetros 1 e 2.

4.8 Modelagem Matemática do Processo Contínuo

Olafadehan (1989) desenvolveu a Equação da continuidade para uma reação isotérmica ocorrendo sobre condições difusivas em um reator de leito fixo contendo enzima imobilizada como mostra a Equação (4.29).

$$\frac{\partial C_s}{\partial t} = -U_f \frac{\partial C_s}{\partial z} + D_{ax} \frac{\partial^2 C_s}{\partial z^2} + D_r \left(\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} - \frac{1}{r} \frac{\partial C_s}{\partial r} \right) - (-rs) \quad (4.29)$$

Sendo:

C_s = Concentração de substrato (g/L);

U_f = Velocidade intersticial de escoamento (cm/h);

D_{ax} = Coeficiente de Dispersão Axial (cm²/h);

D_r = Coeficiente de Dispersão Radial (cm²/h).

A Equação de balanço proposta para a descrição do modelo matemático seguiu as seguintes considerações:

- As difusões longitudinal e radial são expressas pela lei de Fick.
- O reator em coluna tem partículas suficientes por unidade de volume para uma adequada representação contínua.

- Reator atingiu o estado estacionário, isto é, a variável analisada não foi dependente do tempo;
- Temperatura constante;
- Enchimento com partículas esféricas;
- Fluxo e concentração de substrato e afluentes constantes;
- A dispersão radial foi desprezada, pois a razão do diâmetro por comprimento da coluna é pequena.

Adotando-se estas hipóteses e considerando escoamento em fluxo pistonado com dispersão axial, modelo considerado pseudo-homogêneo, a Equação (4.29) se resume na Equação (4.30) com suas respectivas condições de contorno.

$$-U_f \frac{\partial C_s}{\partial z} + D_{ax} \frac{\partial^2 C_s}{\partial z^2} - (-r_s) = 0 \quad (4.30)$$

$$z = 0, \quad C_s = C_{s_0} \quad (4.31)$$

$$z = L, \quad \frac{\partial C_s}{\partial z} = 0 \quad (4.32)$$

Sendo:

C_s = concentração de substrato no reator;

D_{ax} = coeficiente de dispersão axial;

U_f = velocidade intersticial do escoamento.

As equações (4.31) e (4.32) representam as condições de contorno para o problema difusivo - convectivo, que afirma que para uma linha imaginária na entrada do reator, a taxa na qual o material cruza as linhas é dada em duas partes: uma convectiva, representada por $U_f S$, e uma parte difusiva, $D_{ax} \frac{\partial^2 S}{\partial z^2}$, e que as duas partes se somam ao material que está sendo alimentado no reator. A equação (4.32) representa a condição na qual não há mudança na concentração de substrato na saída do reator.

Neste estudo foram considerados os modelos cinéticos de Monod, Contois e de Saturação pela Célula, utilizando os parâmetros cinéticos ajustados anteriormente a partir dos dados experimentais.

As Equações 4.27 e 4.28 em conjunto com as equações pertinentes aos modelos cinéticos foram resolvidas empregando um programa implementado em *Scilab 6.0.0* utilizando diferenças finitas com discretização na posição. Os coeficientes de dispersão axial utilizados foram calculados de acordo com o item 4.5.3.3.

O modelo descrito pela Equação 4.30 para um reator de leito empacotado operando em estado estacionário e condições de escoamento de fluxo pistonado em que não são considerados os efeitos de dispersão axial e radial se reduz à eq. (4.33).

$$U_f \frac{dC_s}{dz} + (-r_s) = 0 \quad (4.33)$$

Sujeita à condição inicial: $C_s = C_{s_0}$ a $z = 0$

Sendo:

C_s = concentração de substrato no reator;

U_f = velocidade intersticial do escoamento

Os modelos cinéticos estudados para as condições de escoamento pistonado são equações diferenciais ordinárias de primeira ordem e foram integradas numericamente sem menores dificuldades pelo método de Runge-Kutta-Gill, sendo as equações demonstradas na Tabela 4.1

Tabela 4.1 – Equações utilizadas na validação dos modelos de Saturação pela Célula, *Monod* e *Contois*.

	Modelo de Saturação pela Célula	Modelo de Monod	Modelo de Contois
$\frac{dx}{dz}$	$\frac{\mu_{m\acute{a}x} \left(1 - \frac{C_X}{C_{X\max}} \right)}{u_f}$		
$\frac{dS_i}{dz} =$	$-\frac{1}{Y_{XS_i}} \frac{\mu_{m\acute{a}x} \left(1 - \frac{C_X}{C_{X\max}} \right)}{u_f} - \frac{m_i C_X}{u_f}$	$-X \frac{1}{Y_{XS_i}} \frac{\mu_{m\acute{a}x} \left(\frac{C_{S_1}}{k_1 + C_{S_1}} \right) \left(\frac{C_{S_2}}{k_2 + C_{S_2}} \right)}{u_f}$	$-X \frac{1}{Y_{XS_i}} \frac{\mu_{m\acute{a}x} \left(\frac{C_{S_1}}{C_X k_1 + C_{S_1}} \right) \left(\frac{C_{S_2}}{C_X k_2 + C_{S_2}} \right)}{u_f}$
$\frac{dP}{dz} =$	$\frac{1}{Y_{XP}} \frac{\mu_{m\acute{a}x} \left(1 - \frac{C_X}{C_{X\max}} \right)}{u_f} + \frac{b C_X}{u_f}$	$X \frac{1}{Y_{XP}} \frac{\mu_{m\acute{a}x} \left(\frac{C_{S_1}}{k_1 + C_{S_1}} \right) \left(\frac{C_{S_2}}{k_2 + C_{S_2}} \right)}{u_f}$	$X \frac{1}{Y_{XP}} \frac{\mu_{m\acute{a}x} \left(\frac{C_{S_1}}{C_X k_1 + C_{S_1}} \right) \left(\frac{C_{S_2}}{C_X k_2 + C_{S_2}} \right)}{u_f}$

Fonte: Adaptado da Literatura, 2018.

4.9 Otimização

MatlabR2016a® foi utilizado para realizar uma otimização por visualização gráfica do comportamento da variável resposta, para os modelos de *Monod* e *Contois*, e cujo objetivo é maximizar a produção de biossurfactantes. Para isso, foi utilizado um sistema de equações diferenciais ordinárias (EDO) o qual abrange as equações da célula, dos substratos e produto, descritas pelas equações 4.2 a 4.5 e os parâmetros obtidos após o ajuste dos modelos. A influência das concentrações de substratos foi avaliada para diferentes valores de velocidade de escoamento.

A resposta alcançada foi expressa em termos da produtividade. A condição ótima de concentrações de substratos e velocidade de escoamento foi avaliada pela análise da influência dessas concentrações para cada velocidade, sendo o melhor resultado aquele que fornecer a maior produtividade de produto.

CAPÍTULO V - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção da Raminose em Reator Batelada

A Tabela 5.1 apresenta os resultados obtidos para a concentração de biomassa, lipídios, sacarose e raminose descritas na pesquisa de Rodrigues (2016). Os experimentos foram realizados em triplicata em mesa agitadora com controle de temperatura, sendo o inóculo de bactérias utilizado de 3 g/L e o volume útil de 150 mL de melação de soja a 100 g/L. Estes dados foram utilizados no ajuste dos parâmetros dos modelos estudados.

Tabela 5.1- Concentração de células, lipídios, sacarose e raminose.

Tempo (h)	Células (g/L)	Lipídios (g/L)	Sacarose (g/L)	Raminose (g/L)
0	2,80467	31,00	19,769	0,14356
12	7,28667	29,36	18,960	2,50622
24	8,89933	24,45	16,215	4,80915
36	9,56767	16,04	16,528	6,53641
48	10,16767	11,02	14,549	7,23000
60	10,56767	8,06	13,594	7,48000
72	10,68000	5,08	12,36	7,86000

Fonte: Rodrigues, 2016.

Os resultados apresentados na Tabela 5.1 mostram que, com o decorrer da fermentação foi verificado o maior consumo de lipídios em relação a sacarose, o que pode ocorrer devido à maior conversão em energia celular da sacarose durante a fermentação, sendo suas concentrações finais de 5,08 g/L e 12,36 g/L, respectivamente. A Figura 5.1 apresenta os dados obtidos na Tabela 5.1

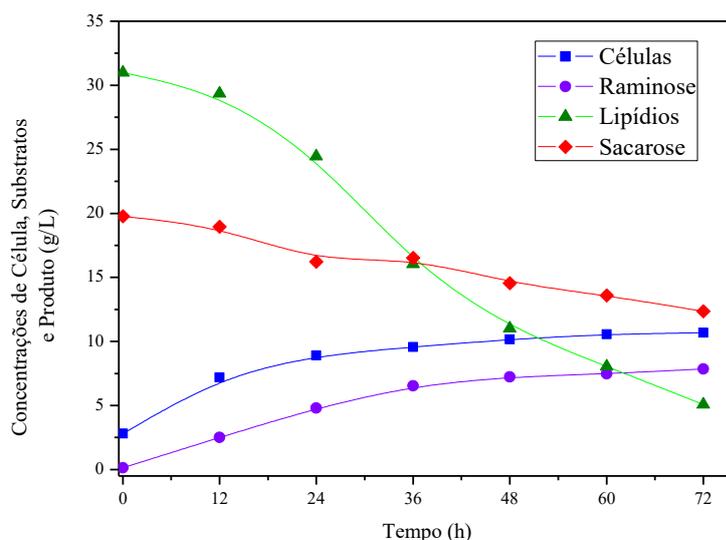


Figura 5.1 – Perfil de concentrações para as variáveis estudadas: ■ Concentração de células, ▲ Concentração de Lipídio (g/L), ◆ Concentração de Sacarose e ● Produção de Raminose.
Fonte - Autor, 2018.

O gráfico descrito pela Figura 5.1 com os pontos experimentais demonstra a tendência de produção de raminose obtida pela fermentação com operação em batelada, assim como o consumo dos substratos (lipídios e sacarose) e o crescimento celular. A concentração final de raminose para este processo foi de 7,86 g/L, demonstrando-se bastante significativa assim como o crescimento celular, que apresentou um valor final de concentração igual a 10,68 g/L.

Para comprovar a eficiência do biossurfactante produzido por processo com operação em batelada, foi avaliada a tensão superficial. O resultado para a análise da tensão superficial foi obtido após 48 horas de fermentação, sendo alcançado um valor de 31,9 mN/m. O resultado obtido foi semelhante ao descrito no estudo de Oliveira *et al* (2008), no qual o menor valor encontrado para a tensão superficial foi de 31 mN/m para a produção de raminolipídios por uma linhagem de *Pseudomonas alcaligenes* a partir do óleo de palma.

5.2 Ajuste Paramétrico

Para a realização do ajuste dos parâmetros foram utilizados os dados experimentais citados na Tabela 5.1, sendo os substratos 1 e 2, o lipídio e a sacarose,

respectivamente, e o produto a raminose.

Para cada modelo cinético foi ajustado um número específico de parâmetros, dentre eles: a velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), a concentração celular máxima ($X_{\text{máx}}$), o fator de conversão de biomassa em produto ($Y_{X/P}$) e o fator de conversão de substratos 1 e 2 em biomassa (Y_{X/S_i}). Os números de variáveis dependentes foram estipulados como X, S₁, S₂ e P, sendo realizado um ensaio experimental com seis pontos experimentais mais a condição inicial.

O tempo inicial igual a zero foi estipulado como condição inicial e os tempos de 12 a 72 horas como os pontos experimentais para o ajuste. Já o número de equações diferenciais foi igual a quatro e são descritas pelas expressões matemáticas 4.2 a 4.5, demonstradas no balanço de massa com as respectivas cinéticas estudadas. Os resultados para cada modelo proposto são demonstrados a seguir.

5.2.1 Modelo de Monod

Para este modelo, foram ajustados cinco parâmetros, sendo o valor da velocidade de crescimento específico calculada e fixada em $\mu_{\text{máx}} = 0,13 \text{ h}^{-1}$. Os valores dos termos de manutenção (m_1 , m_2 e b) foram considerados como zero, pois apresentam valores muito baixos, próximos de zero. A Tabela 5.2 demonstra os valores dos parâmetros ajustados bem como os valores dos desvios padrão dos valores dos parâmetros encontrados.

Tabela 5.2 – Valores dos parâmetros cinéticos ajustados para o Modelo de Monod.

Parâmetros	Valor	Desvio Padrão
K ₁ (g/L)	61,419	13744,0
K ₂ (g/L)	5,606	3773,1
1/Y _{X/P}	0,96186	0,14114
1/Y _{X/S1}	2,8286	0,30437
1/Y _{X/S2}	0,77644	0,12879
Somatório dos quadrados dos resíduos: 47,61		

Os resultados encontrados pelo ajuste paramétrico deste modelo demonstram um valor de somatório dos quadrados dos resíduos, igual a 47,61, demonstrando que os pontos ajustados representam bem os pontos experimentais obtidos para a biomassa, substratos e produto, ou seja, os desvios entre o modelo cinético e o experimento foram bons. Os coeficientes de rendimentos expressos na tabela demonstram houve maior consumo de lipídios. Para a conversão de biomassa em raminose, observa-se que o valor obtido para este modelo é bom e houve equilíbrio entre o consumo e a formação de produto.

É possível perceber ainda que, para os parâmetros K_1 e K_2 (constantes de saturação do lipídeo e sacarose, respectivamente), o valor do desvio padrão é maior que o valor dos coeficientes obtidos. Esses parâmetros apresentaram uma correlação de 1,01 indicando que são altamente correlacionados. Eles também apresentaram baixa sensibilidade paramétrica. Para os demais parâmetros o desvio padrão apresentou valores menores que os valores atingidos.

A Figura 5.2 apresenta o perfil das concentrações de substrato, biomassa e biossurfactante para os dados experimentais e para o ajuste do modelo.

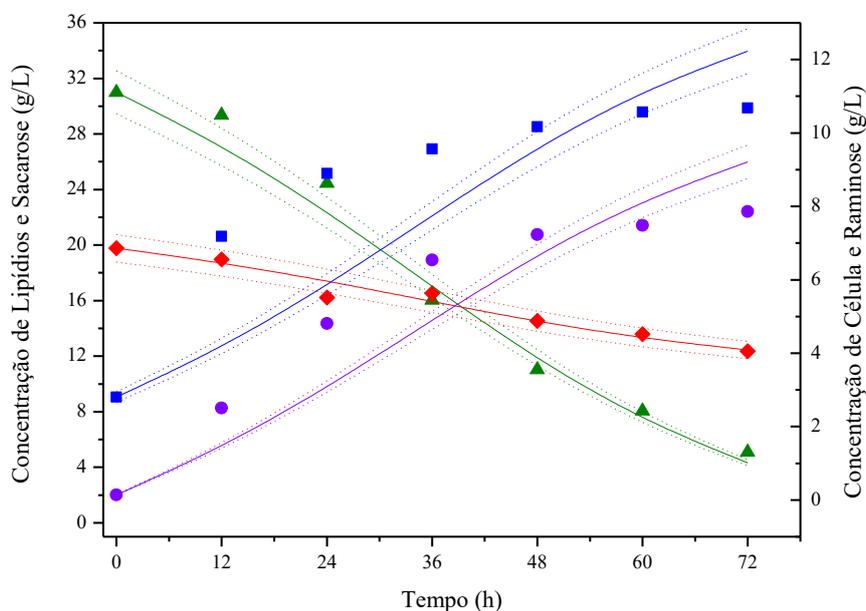


Figura 5.2 – Perfil de concentrações para as variáveis estudadas para o Modelo de *Monod*: ■ Concentração de células, ▲ Concentração de Lipídio (g/L), ◆ Concentração de Sacarose e ● Produção de Raminose. Os símbolos representam os resultados experimentais e as linhas os dados resultantes do ajuste do modelo cinético definido pelas equações de 4.2 a 4.5. As linhas pontilhadas representam os desvios de $\pm 5\%$.

Fonte - Autor, 2018.

Os valores encontrados para o modelo de *Monod* após o ajuste dos parâmetros consistem em 12,23 g/L para a concentração celular, 4,33 g/L para a concentração de lipídio e 12,45 g/L para de sacarose, enquanto que a concentração de raminose apresentou um valor de 9,21 g/L.

O modelo cinético proposto apresenta desvios no ajuste em relação ao perfil de crescimento celular para os pontos experimentais. Quanto aos substratos, o modelo consegue descrever bem o consumo destes. Para a sacarose, observa-se que há um ajuste melhor para as concentrações finais, enquanto que para o consumo de lipídios o ajuste é satisfatório ao longo do perfil de concentrações demonstrado no gráfico.

Quanto a produção de raminose o modelo não descreve muito bem o perfil de concentração. Pelo gráfico é possível ver que o ajuste não ocorre de maneira eficiente ao longo da curva, sendo os valores dos pontos experimentais maiores que os valores da curva de desvio de +5%, todavia o modelo demonstra uma leve melhora nas concentrações finais.

5.2.2 Modelo de Contois

Para este modelo, foram ajustados cinco parâmetros, sendo o valor da velocidade específica de crescimento calculada e o valor encontrado de $0,13 \text{ h}^{-1}$, utilizado para o ajuste dos parâmetros A Tabela 5.3 apresenta os valores dos parâmetros ajustados assim como os valores dos desvios padrões encontrados.

Tabela 5.3 – Valores dos parâmetros cinéticos ajustados para o Modelo de Contois.

Parâmetros	Valor	Desvio Padrão
$K_{X1} (\text{g}_s \cdot \text{g}_x^{-1})$	0,31223	0,03944
$K_{X2} (\text{g}_s \cdot \text{g}_x^{-1})$	10,441	2,3322
$1/Y_{X/P}$	0,92384	0,13234
$1/Y_{X/S1}$	0,26417	0,27457
$1/Y_{X/S2}$	0,72947	0,12028

Somatório dos quadrados dos resíduos: 47,61.

Para todos os parâmetros, o valor do desvio padrão é menor que o valor dos coeficientes ajustados e o valor do somatório dos quadrados dos resíduos encontrado para o modelo de *Contois* foi de 47,61, caracterizando que os desvios entre o experimental e o modelo foram bons, e com isso o modelo cinético conseguiu representar os pontos experimentais para o processo com operação em batelada. Os rendimentos apresentados demonstram que, assim como no modelo de *Monod*, existe um consumo menor de sacarose em relação ao de lipídio.

A Figura 5.3 apresenta o perfil das concentrações de substrato, biomassa e raminose para os dados experimentais e para o ajuste do modelo.

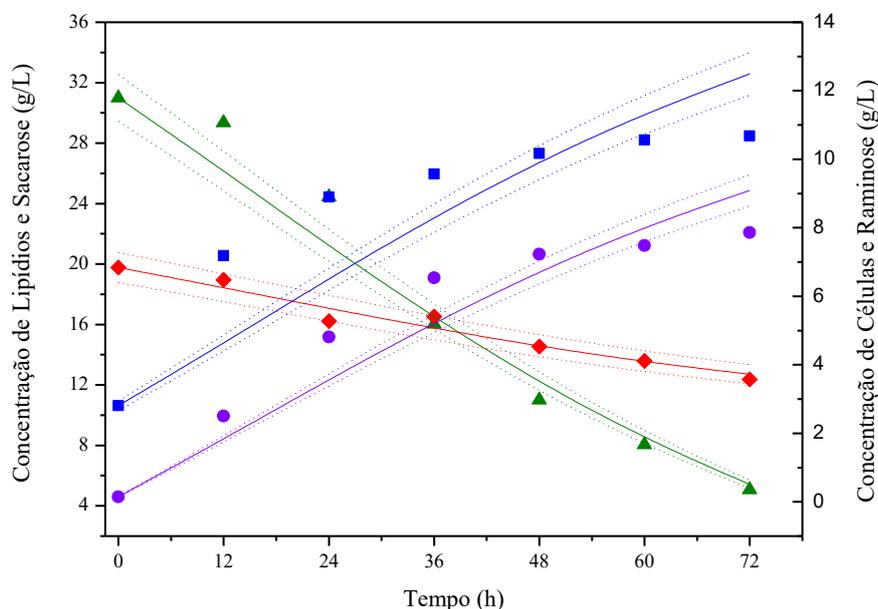


Figura 5.3 – Perfil de concentrações para as variáveis estudadas para o Modelo de *Contois*: ■ Concentração de células, ▲ Concentração de Lipídio (g/L), ◆ Concentração de Sacarose e ● Produção de Raminose. Os símbolos representam os resultados experimentais e as linhas os dados resultantes do ajuste do modelo cinético definido pelas equações de 4.2 a 4.5. As linhas pontilhadas representam os desvios de $\pm 5\%$.

Fonte - Autor, 2018.

As concentrações finais alcançadas após o ajuste paramétrico deste modelo foram de 12,49 g/L para a biomassa, 5,42 g/L para o lipídio, 12,71 g/L para a sacarose e 9,1 g/L para a raminose.

Para este modelo, o ajuste para a concentração celular apresenta um desvio na região inicial do perfil descrito no gráfico. O consumo de sacarose foi ajustado com sucesso pelo modelo, enquanto que o perfil de concentração do lipídio demonstra uma

diferença para as concentrações iniciais teórica e experimental, sendo seu ajuste melhor descrito para as concentrações finais.

A concentração de raminose apresenta leves desvios do modelo, sendo que os pontos experimentais atingem a curva de desvio de +5. O valor encontrado para a concentração final teórica (9,1 g/L) apresenta uma divergência significativa do valor do ponto experimental (7,86 g/L), o que demonstra que o modelo não possui um bom ajuste quanto aos dados de concentração para a formação de produto.

5.2.3 Modelo de Saturação pela Célula

A Tabela 5.4 apresenta os valores dos coeficientes ajustados assim como os desvios padrões dos parâmetros encontrados para o modelo cinético de Saturação pela Célula.

Tabela 5.4– Valores dos parâmetros cinéticos ajustados para o Modelo de Saturação pela Célula.

Parâmetros	Valor	Desvio Padrão
$\mu_{\text{máx}}$ (1/h)	0,11627	0,022639
$X_{\text{máx}}$ (g/L)	10,512	0,44286
$1/Y_{X/P}$	0,70047	0,19415
$1/Y_{X/S1}$	0,4903	0,13860
$1/Y_{X/S2}$	0,22683	0,071536
B	0,0038912	0,0032438
Somatório dos quadrados dos resíduos: 19,61		

Foram ajustados 6 parâmetros cinéticos para este modelo, sendo os valores de m_1 e m_2 foram calculados e fixados em 0,098 e 0,062, respectivamente. Os resultados obtidos apresentaram um valor para o somatório dos quadros dos resíduos igual a 19,61, demonstrando que o melhor resultado para os desvios entre o experimental e o modelo. Desta forma, o modelo de Saturação representa bem os pontos experimentais devido a utilização dos termos de manutenção (m_1 , m_2 e b), conforme descrito nas equações 4.15 a 4.16 no item descrição dos modelos.

Nota-se que para todos os parâmetros o valor do desvio padrão é menor que o valor dos coeficientes obtidos, o que demonstra que o resultado alcançado por este modelo é satisfatório. O valor encontrado para o coeficiente não associado ao crescimento (b) é baixo, o que indica que existe maior influência dos coeficientes associados ao crescimento para este modelo cinético.

A Figura 5.4 apresenta um comparativo entre os perfis das concentrações de substrato, biomassa e raminose para os dados experimentais e para o ajuste do modelo, sendo feito um desvio de $\pm 5\%$ para as concentrações teóricas encontradas.

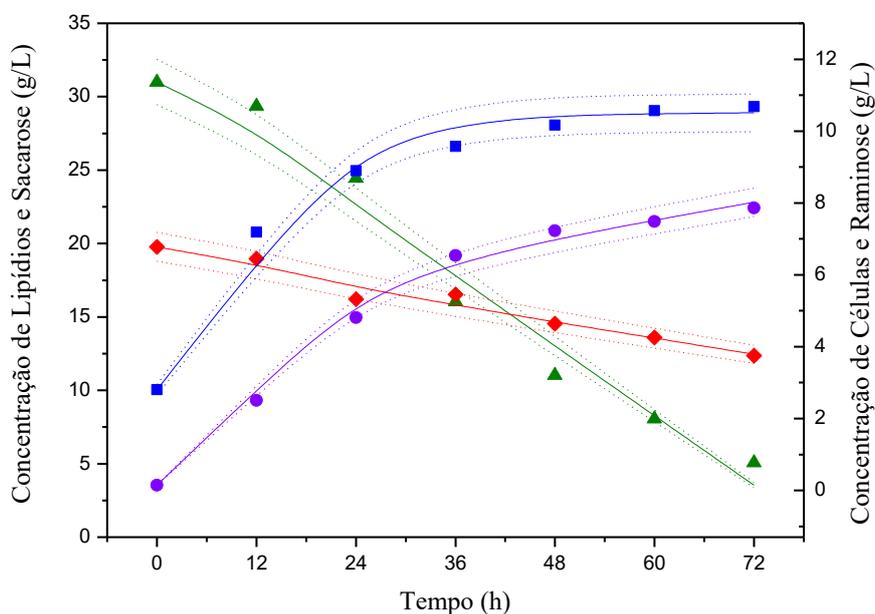


Figura 5.4 – Perfil de concentrações para as variáveis estudadas para o Modelo de Saturação pela Célula: ■ Concentração de células, ▲ Concentração de Lipídio (g/L), ◆ Concentração de Sacarose e ● Produção de Raminose. Os símbolos representam os resultados experimentais e as linhas os dados resultantes do ajuste do modelo cinético definido pelas equações de 4.2 a 4.5. As linhas pontilhadas representam os desvios de $\pm 5\%$.

Fonte - Autor, 2018

Os valores encontrados experimentalmente foram de 10,68 g/L para a biomassa, 12,36 g/L para o lipídio, 5,08 g/L para a sacarose e 7,86 g/L para a raminose. Após o ajuste dos parâmetros a concentração celular encontrada foi de 10,51 g/L, enquanto que para os substratos os valores foram de 3,54 g/L para o lipídio e 12,45 g/L para a sacarose, e para a raminose 8,02g/L. Para o modelo de Saturação pela Célula observa-se que os valores teóricos e experimentais possuem uma grande proximidade, traduzindo um bom ajuste.

Para o consumo de substratos, em especial para a concentração de lipídios, nota-se que o ajuste ao longo do perfil de concentração em relação aos pontos de $\pm 5\%$ não apresenta desvios do modelo. Para a biomassa, o melhor ajuste está para os valores das concentrações finais, observando que em alguns pontos os dados experimentais apresentam desvios da curva teórica, se aproximando da curva do desvio de 5%. Já para a produção de raminose, observa-se que o modelo descreve bem o perfil de concentração do produto.

Tabela 5.5 – Rendimentos em célula, substratos e produto para Operação em Batelada

	Dados Experimentais	Modelo de Saturação pela Célula	Modelo de <i>Monod</i>	Modelo de <i>Contois</i>
$\gamma_{X/P}$	1,02	1,42	1,04	1,08
γ_{X/S_1}	0,30	2,18	0,35	0,37
γ_{X/S_2}	1,06	4,43	1,29	1,37
γ_{P/S_1}	0,30	0,287	0,34	0,35
γ_{P/S_2}	1,41	1,076	1,26	1,27

Tanto para os dados experimentais quanto para os modelos cinéticos estudados, é possível observar que a conversão de lipídios (S_1) em biomassa e em produto possui valores mais baixos, o que implica em um alto consumo do substrato e baixo crescimento de células. Para a sacarose (S_2) os valores apresentados sugerem o inverso, ou seja, um baixo consumo com alto crescimento celular. O alto valor de rendimento para a sacarose caracteriza que este substrato possui maior atuação no fornecimento de energia. A conversão de biomassa (X) em produto (P) apresenta um valor bom, indicando que houve um bom índice de consumo pela biomassa e de formação de raminose.

Quanto aos rendimentos em produto, observa-se que houve maior formação de raminose em relação ao consumo de sacarose. A formação da raminose em relação ao consumo do lipídio indicou um menor gasto deste substrato em comparação à sacarose. O modelo de *Contois* apresenta o melhor rendimento em produto (P) pela biomassa (X), sendo o menor valor observado para o modelo de Saturação pela Célula, o que pode ocorrer devido à ausência da limitação pelo substrato.

O estudo de Daré (2008) do processo fermentativo de produção de etanol, aplicando pequenas variações na concentração inicial de inóculo e utilizando vazões constantes para os cultivos analisados, traz que os coeficientes de rendimento de substratos em célula (Y_{X/S_i}) variam em faixas maiores devido à elevada sensibilidade desses parâmetros em relação à concentração celular e à vazão empregada.

Os resultados de rendimento, do presente estudo, obtidos pelo experimento de fermentação em batelada e pelo ajuste paramétrico dos modelos, demonstram que os microrganismos possuem maior afinidade pelos lipídios, pois apresentam um maior consumo deste substrato. Já para a sacarose observa-se que ocorre um menor consumo, o que pode indicar que a mesma atua como fonte de energia.

Borges (2008) relata em seu trabalho que ocorre uma pequena diminuição no rendimento do produto com o aumento da concentração inicial de sacarose no fermentador. Esta concentração influencia também o rendimento de células, sendo que para uma maior concentração inicial da sacarose, observa-se um rendimento menor.

5.3 Experimento em Operação Contínua para a Validação dos Parâmetros dos Modelos Ajustados

As condições otimizadas em batelada obtidas no estudo de Rodrigues (2016) foram empregadas no experimento contínuo. As concentrações iniciais utilizadas para o experimento de validação foram de 0,987 g/L para a célula 35,9 g/L para lipídios e 25,39 g/L para sacarose e estão descritas na Tabela 5.6. Foi utilizado um reator em coluna de 10,9 cm e 38 mL com vazão de 0,02 mL/min, sendo os experimentos realizados em triplicata em mesa agitadora com controle de temperatura.

Após a fixação das *P. aeruginosas* nas partículas de alginato e a conservação destas na suspensão, foi realizada a microscopia eletrônica (MEV) de varredura pela qual foram analisadas amostras de microrganismos anteriormente fixados na matriz de alginato. Inicialmente as amostras foram centrifugadas para separar a biomassa do sobrenadante e em seguida preparadas segundo o método de Karnovsky modificado (Karnovsky, 1965), sendo metalizadas com ouro ao final, para a realização da análise. Por meio da análise MEV foi possível notar um grande número de microrganismos fixados nesta matriz, conforme Figuras 5.5 e 5.6.

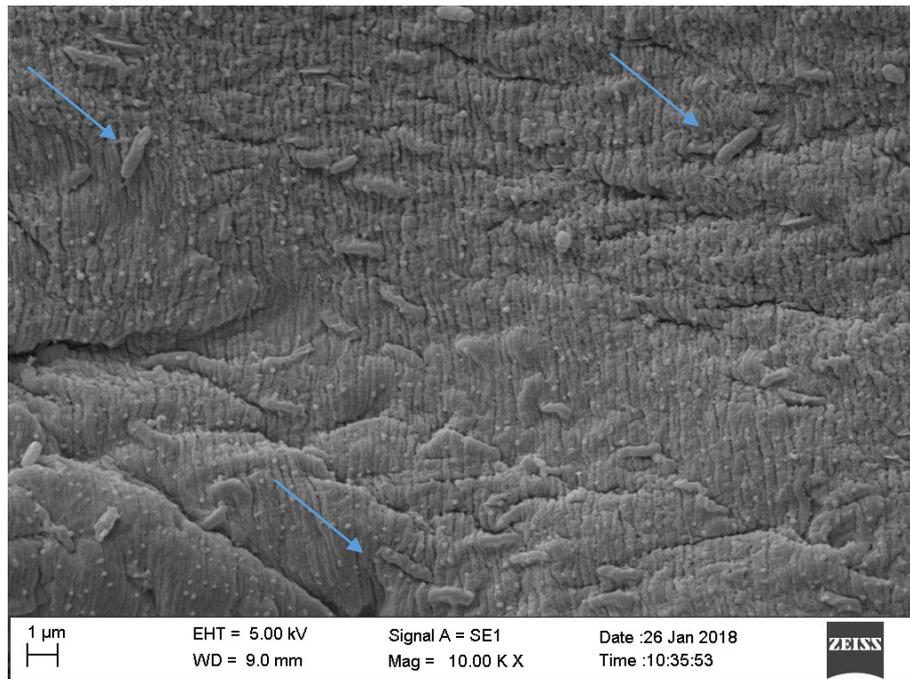


Figura 5.5 – Fixação da cultura microbiana na matriz porosa da partícula
Fonte: Autor, 2018.

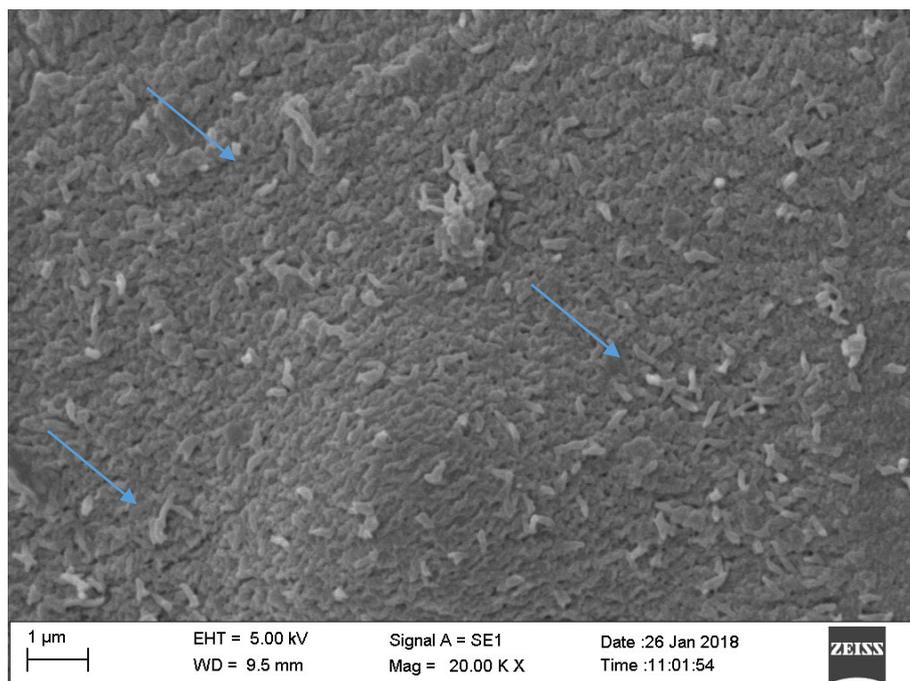


Figura 5.6 – Morfologia da *Pseudomonas aeruginosa*
Fonte: Autor, 2018.

Verifica-se por meio destas Figuras que as *Pseudomonas aeruginosa* possuem forma de bastonetes e que a cultura apresenta bactérias isoladas, em pares e também algumas em cadeias curtas. Após, as partículas com as bactérias imobilizadas foram

inseridas no reator em coluna utilizado no experimento de validação, possibilitando a realização das análises quantitativas, que serão descritas posteriormente.

5.3.1 Resultados das Análises Qualitativas para o Experimento de Validação

A Tabela 5.6 apresenta os resultados de tensão superficial, índice de emulsificação e concentrações de sacarose, de lipídios e de raminose no tempo inicial e os valores médios realizados em triplicata para uma amostra coletada na saída da coluna após o sistema atingir o estado estacionário.

Tabela 5.6 – Valores determinados para tensão superficial, índice de emulsificação e concentrações de sacarose, de lipídios e de raminose no processo com operação contínua.

	Tensão Superficial (mN/m)	Índice de Emulsificação (%)	Concentração de Sacarose (g/L)	Concentração de Lipídeos (g/L)	Concentração de Raminose (g/L)
Início	44,23 ± 6,05	47,22 ± 24,89	25,39 ± 9,11	35,9 ± 15,26	0
Amostra Final	33,88 ± 1,33	90,28 ± 1,96	8,57 ± 0,51	8,04 ± 0,63	4,32 ± 0,245

Fonte: Autor, 2018.

Os resultados obtidos pela fermentação em operação contínua foram utilizados para a validação dos parâmetros dos modelos. Assim como no processo em batelada, observa-se que ao final da fermentação houve um maior consumo de lipídios em relação a sacarose. A concentração final de produto para a operação contínua foi de 4,32 g/L.

Observou-se ainda que, para o processo com operação contínua, houve um crescimento celular significativo, o que pode caracterizar a biomassa como fonte de energia durante a fermentação.

Yin *et al* (2008) descrevem como resultado da produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* S6 em águas residuais contendo óleo uma redução da tensão superficial de 72 para 33,9 mN/m. Ao analisar a Tabela 5.6 verifica-se que a tensão

superficial inicial do meio de cultura foi de 44,23 mN/m e sua diminuição no final do processo pode ser associada ao aumento da produção de raminose, sendo seu valor mínimo de 33,88 mN/m.

A produção de biossurfactante por efluente gorduroso de abatedouro e frigorífico estudada por Borges (2011) apresentou um valor final de 27,5 mN/m para a tensão superficial, enquanto Jamal *et al* (2010) obteve um valor de 30,1 mN/m no final do processo de produção de biossurfactante por óleo de palma.

O valor encontrado neste estudo está dentro da faixa descrita por Cooper e Zajic (1980). Na qual, segundo estes autores os compostos tensoativos devem apresentar valores de tensão superficial abaixo de 40 mN/cm, sendo possível a comprovação da eficiência de um biossurfactante caso os valores da tensão superficial estejam abaixo de 35 mN/m. Para Reiser *et al* (1993) os valores mínimos para a tensão superficial estão entre 25 e 28 mN/m.

Em relação ao índice de emulsificação obtido no presente estudo, o valor obtido foi de 90,28%, semelhante ao relatado por Wu *et al* (2007) que obtiveram valores acima de 70% para este índice na produção de biossurfactante empregando glicose e glicerol com o uso de *Pseudomonas aeruginosa* EM1. Oliveira et al (2008) apresentaram índice de emulsificação acima de 70% empregando querosene para raminolípídios produzidos pela linhagem de *Pseudomonas alcaligenes* utilizando óleo de palma.

5.3.2 Determinação da Distribuição de Tempos de Residência (DTR)

A determinação dos tempos de residência permite que a caracterização do desempenho do reator por meio da verificação da maneira como o fluido escoar. Seu cálculo permite o diagnóstico de possíveis problemas de escoamento, além da caracterização dos elementos de macromistura deste reator.

As curvas de distribuição cumulativa para a vazão estudada na forma adimensional podem ser visualizadas na Figura 5.7. Estas distribuições cumulativas forneceram as curvas $E(\Theta)$ (derivada primeira da função $F(\Theta)$) necessárias ao cálculo da variância e consequentemente do coeficiente de dispersão axial. As curvas $E(\Theta)$ para as três condições estudadas estão representadas na Figura 5.8.

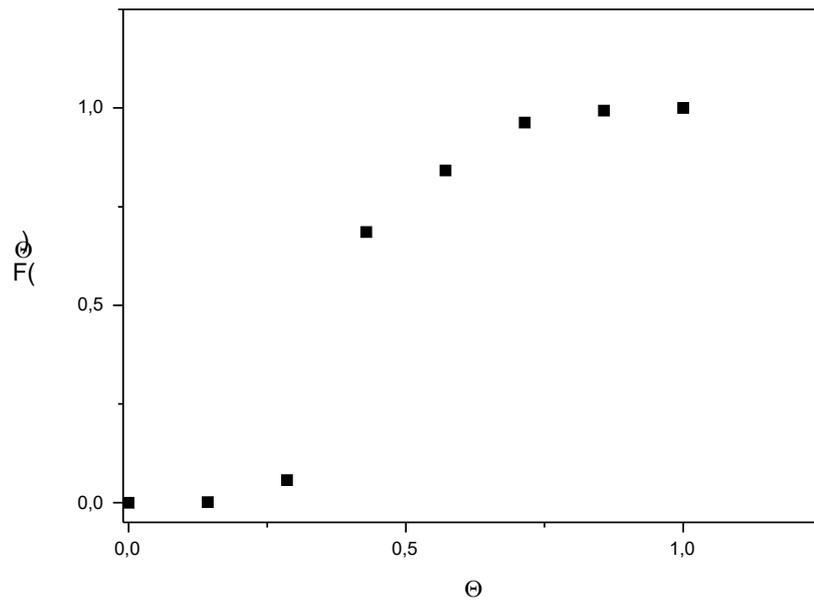


Figura 5.7- Distribuições cumulativas adimensionais.
Fonte – Autor, 2018.

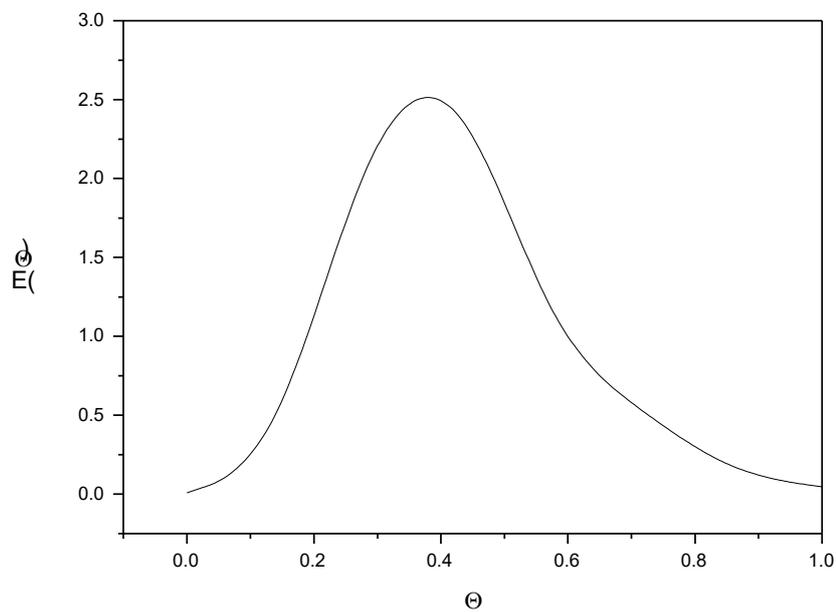


Figura 5.8- Distribuição $E(\Theta)$ para os três diferentes tempos de residência estudados.
Fonte – Autor, 2018.

A partir das curvas de distribuições cumulativas, calculou-se o tempo médio de residência considerando a área acima da curva definida por $F(\Theta)$ em função de Θ , por meio da Equação 4.23. Os valores obtidos para estes parâmetros foram comparados com

os tempos de residência teóricos definidos pela razão entre o volume e vazão, conforme Equação 4.24, demonstrada no item 4.5.3.1.

Os experimentos foram realizados em triplicada e a variância para cada experimento foi calculada utilizando a Equação 4.23 e o coeficiente de dispersão axial pela Equação 4.27, descritas nos itens 4.5.3.2 e 4.5.3.3, respectivamente. Na Tabela 5.8 encontram-se os valores estimados para os tempos de residência (τ), velocidade intersticial (U_f), variância (σ^2), e coeficiente de dispersão axial (D_{ax}).

Os gráficos apresentados nas Figuras 5.6 e 5.7, demonstram que o reator utilizado não é ideal, pois há efeitos que indicam dispersão e um comportamento de mistura, sendo estes efeitos relacionados ao baixo número de Peclet encontrado (Tabela 5.8).

O número de Peclet é uma grandeza adimensional empregada em estudos de fenômenos de transporte de fluidos. Para reatores de leito fixo, nos quais o número de Peclet utiliza o comprimento do reator como sendo o comprimento característico, o valor deste número é de 10^3 (Sweetland, 2009).

O valor encontrado no presente estudo foi de 11,73, sendo que o baixo índice para o número de Peclet está associado a predominância do transporte condutivo, o que pode caracterizar o desvio da idealidade.

Tabela 5.7 – Valores estimados para os parâmetros tempos de residência, velocidade intersticial, variância e coeficiente de dispersão axial.

$\tau_{teo}(h)$	$\tau(h)$	Desvio (%)	$U_f(cm/s)$	σ^2	$D_{ax}(cm^2/h)$	Pe
8,00	11,83	32,37	0.288	0.128	0,216	11,73

Fonte: Autor, 2018.

De acordo com a Tabela 5.7 observa-se, que os desvios entre os tempos de residência ideal e o calculado pela DTR indicam um comportamento não ideal para a coluna utilizada e são característicos de formação de curtos-circuitos “by-pass” no reator. Este escoamento não ideal com formação de curtos-circuitos também pode ser visualizado no comportamento das distribuições cumulativas (Figura 5.6).

5.4 Modelagem Matemática do Processo Contínuo

A modelagem matemática do processo contínuo foi realizada empregando os modelos PFR e de Dispersão Axial. Os rendimentos foram recalculados com os dados obtidos no experimento em operação contínua, pois os valores obtidos por meio da fermentação em operação batelada não apresentaram ajuste. Os parâmetros ajustados dos modelos cinéticos obtidos pelo experimento com operação batelada, foram mantidos para a validação dos modelos.

Os dados utilizados para os cálculos são descritos na Tabela 5.8, sendo fixados para os modelos cinéticos os dados da altura do reator $L = 10,9$ cm e da velocidade de reação $Uf = 0,288$ cm/h, para o modelo de Dispersão Axial o valor do coeficiente de dispersão utilizado foi de $0,216$ cm²/h.

Tabela 5.8 – Valores recalculados dos parâmetros cinéticos com dados do experimento em operação contínua

Rendimentos	Valores para o experimento em operação contínua
$1/Y_{X/P}$	0,92
$1/Y_{X/S1}$	6,064
$1/Y_{X/S2}$	3,729

Fonte: Autor, 2018.

5.4.1 Modelo PFR

Para este modelo foram consideradas as três cinéticas estudadas, sendo feita a adequação das cinéticas à Equação 4.33, descrita no item 4.5.4, na qual considera-se a velocidade da reação. As equações referentes às cinéticas de *Monod*, *Contois* e de Saturação pela Célula foram utilizadas e ajustadas às equações de balanço de massa (equações 4.6 a 4.9).

5.4.1.1 Modelo de Monod

Para o modelo de Monod, foram utilizadas as três equações que descrevem o consumo de substratos e a formação de produto levando-se em conta a velocidade de reação, demonstradas na Tabela 4.1, item 4.5.4.

Após a implementação das expressões em programa no *Scilab 6.0.0*, foi gerado o gráfico com um comparativo entre as concentrações teóricas e experimentais de ambos os substratos e do produto, resultantes da validação do modelo de Monod, demonstrado na Figura (5.9).

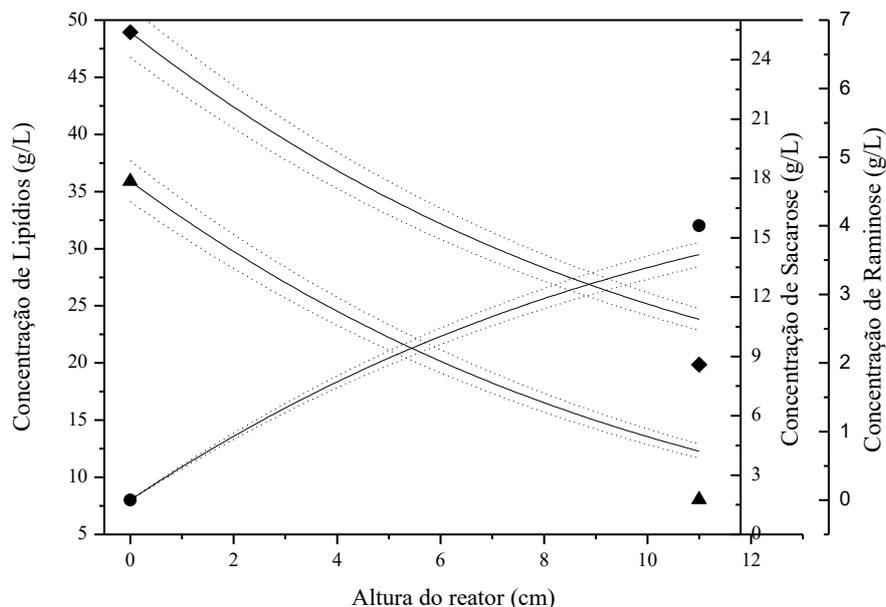


Figura 5.9 – Perfil das Concentrações validadas pelo método PFR para o modelo de *Monod*: ■ Concentração de Células, ▲ Concentração de Lipídios, ◆ Concentração de Sacarose e ● Concentração de Raminose. As linhas pontilhadas representam os desvios de $\pm 5\%$
Fonte – Autor, 2018.

Ao analisar o gráfico da Figura 5.9, observa-se que as concentrações teóricas finais destoam daquelas encontradas experimentalmente. Para as concentrações finais de substratos, os índices alcançados foram de 12,29 g/L para o lipídio e 10,87 g/L para a sacarose, sendo os valores experimentais de 8,04 g/L e 8,57 g/L, respectivamente. Já para o produto, temos como concentração final 4,32 g/L, sendo o valor encontrado na validação de 3,58 g/L.

Para o modelo de *Monod* as concentrações de substratos atingiram índices finais maiores em relação as concentrações encontradas pelo modelo de Saturação pela Célula, que apresentou concentrações de 8,84 g/L e 8,16 g/L para o lipídio e sacarose, respectivamente. Enquanto que, para o produto a concentração final alcançada foi inferior ao valor apresentado pelo modelo de saturação (4,29 g/L).

Tal análise demonstra que o modelo não descreveu de maneira satisfatória o comportamento da reação avaliada.

5.4.1.2 Modelo de Contois

Para a validação do modelo de *Contois*, foram utilizadas as três equações que relacionam as concentrações de substratos e produto com a velocidade e a altura do reator utilizado, estando descritas na Tabela 4.1, item 4.5.4:

As equações foram implementadas e, como resultado foi obtido o gráfico ilustrado pela Figura 5.10, que apresenta as concentrações teóricas e experimentais para o modelo avaliado.

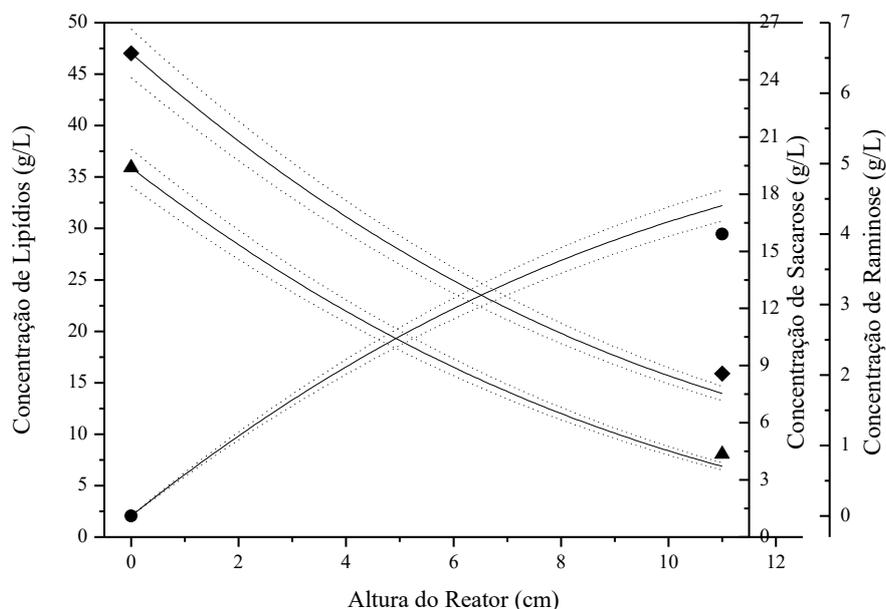


Figura 5.10 – Perfil das Concentrações validadas pelo método PFR para o modelo de *Contois*:

- Concentração de Células, ▲ Concentração de Lipídios, ◆ Concentração de Sacarose e ● Concentração de Raminose. As linhas pontilhadas representam os desvios de $\pm 5\%$

Fonte – Autor, 2018.

Verifica-se pela Figura 5.10 que, assim como no modelo de saturação pela célula, as concentrações finais de lipídio e sacarose atingem índices inferiores a 10, indicando proximidade aos valores experimentais.

As concentrações finais teóricas para os substratos foram de 6,87 g/L para o lipídio e 7,54 g/L para a sacarose, e experimentais de 8,04 g/L 8,57 g/L, respectivamente. Para a

raminose a concentração final encontrada foi de 4,40 g/L, sendo a experimental de 4,32 g/L.

Pode-se observar que, o modelo de *Contois* descreve satisfatoriamente a produção de biossurfactantes, estando sua maior eficácia na descrição da concentração da raminose. Pois, o modelo apresentou maior proximidade entre os valores teórico e experimental para o produto.

5.4.1.3 Modelo de Saturação pela Célula

As equações descritas na Tabela 4.1 foram empregadas para este modelo, sendo m_1 , m_2 e b os termos de manutenção. Com os resultados obtidos no gráfico demonstrado pela Figura (5.8), no qual é possível observar o comportamento teórico e experimental das concentrações celulares, de ambos os substratos e do produto final.

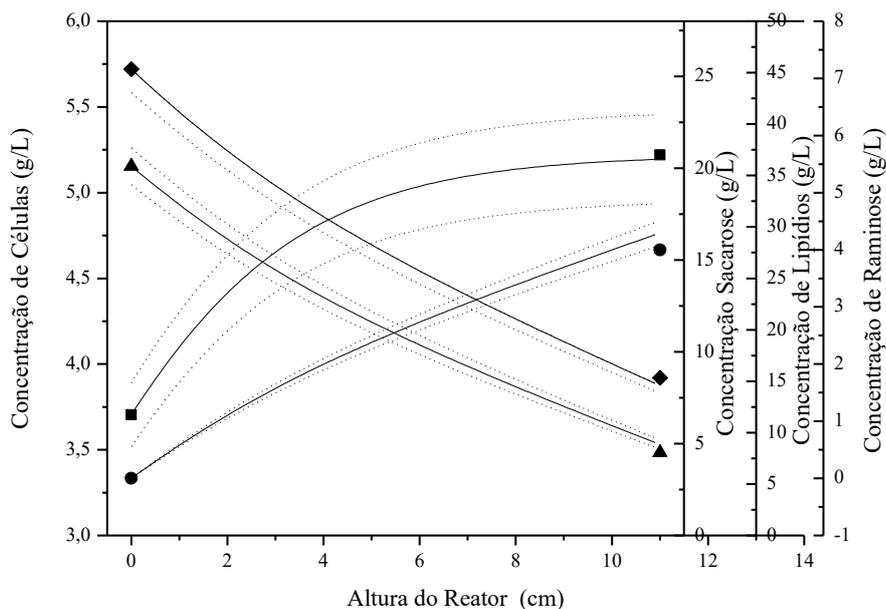


Figura 5.8 – Perfil das Concentrações validadas pelo método PFR para o modelo de Saturação pela Célula: ■ Concentração de Células, ▲ Concentração de Lipídios, ◆ Concentração de Sacarose e ● Concentração de Raminose. As linhas pontilhadas representam os desvios de $\pm 5\%$.

Fonte – Autor, 2018.

Para os valores obtidos teoricamente pela validação do modelo, as concentrações finais foram de 5,19 g/L para biomassa, 8,81 g/L para o lipídio, 8,41 g/L para a sacarose e 4,65 g/L para a raminose. O valor apresentado pela sacarose valida o estudo referente

ao rendimento dos substratos. Nota-se que houve menor consumo de sacarose em relação ao lipídio, o que foi observado na análise dos rendimentos descrita na Tabela 5.9.

Para o modelo de saturação pela célula foram mantidos os parâmetros cinéticos utilizados para a validação dos outros modelos, sendo necessário reajustar os parâmetros de manutenção associados e não associados ao crescimento (m_1 , m_2 e b), pois o modelo não se ajustou, o que leva a uma menor produção pelo reator e, conseqüentemente, a necessidade de se trabalhar com valores maiores para os parâmetros de manutenção.

Para a concentração de células o valor encontrado experimentalmente foi de 5,19 g/L, enquanto o valor experimental para a concentração máxima celular foi de 5,22 g/L, o que demonstra que o modelo conseguiu descrever satisfatoriamente o perfil celular pelo modelo PFR.

O perfil da concentração de lipídios (substrato 1) para o modelo de saturação celular demonstra que os resultados obtidos experimental e teoricamente são muito próximos, sendo 8,04g/L e 8,84 g/L, respectivamente. Desta forma, o modelo se ajustou adequadamente para este caso.

Para a sacarose os valores experimental e teórico encontrados foram de 8,57 g/L e 8,16 g/L, respectivamente. Nota-se, que o modelo descreveu o comportamento da concentração deste substrato, sendo que a curva com as concentrações teóricas se aproxima dos valores dos desvios de +5%.

A concentração final de raminose encontrada teoricamente foi de 4,29 g/L, sendo a experimental 4,32 g/L. Para este caso, o modelo descreveu de forma eficaz o perfil da concentração, estando a curva com os valores teóricos de concentração dentro da faixa dos desvios de $\pm 5\%$.

De forma geral, observa-se que a validação através do modelo PFR foi bastante satisfatória, sendo os valores finais alcançados muito próximos daqueles encontrados experimentalmente, o que demonstra que o modelo de saturação pela célula, após reajustado, descreveu satisfatoriamente as concentrações de células, substratos e produto.

5.4.2 Modelo de Dispersão

Para a implementação do modelo de dispersão, foram utilizadas as equações descritas na Tabela 4.1, item 4.5.4, usando um programa implementado em *Scilab 6.0.0* empregando diferenças finitas como discretização na posição.

5.4.2.1 Modelo de Monod

Para o modelo de *Monod*, foram utilizados os dados encontrados no ajuste paramétrico aplicados às equações apresentadas na Tabela 4.1. Ao final da validação por diferenças finitas foi encontrado o gráfico apresentado na Figura 5.11 que demonstra os perfis teóricos e experimentais de ambas concentrações de substratos e do produto para o modelo estudado. Houve uma diferença significativa dos perfis de concentrações em relação à aplicação dos métodos estudados.

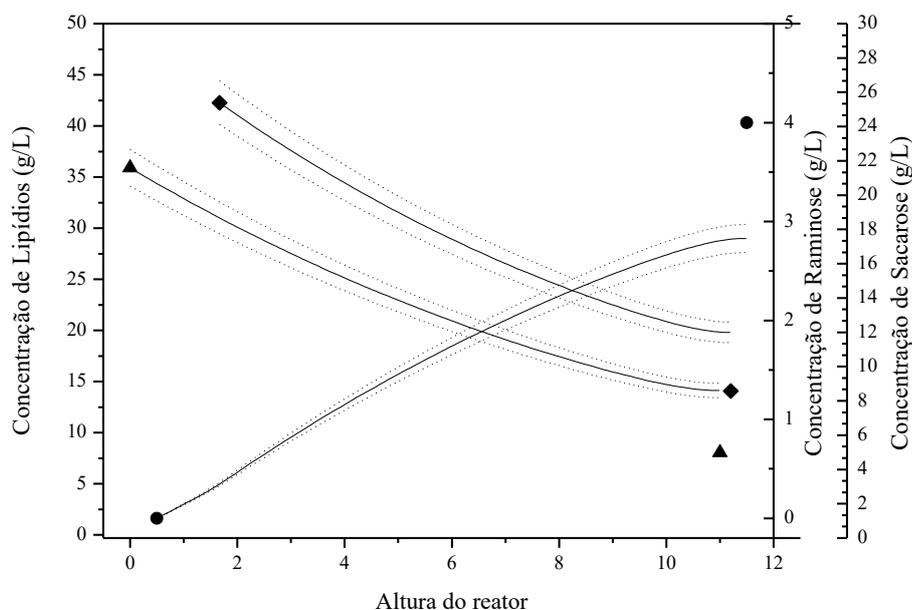


Figura 5.11 – Perfil das Concentrações validadas pelo modelo de Dispersão Axial para o modelo de *Monod*: ■ Concentração de Células, ▲ Concentração de Lipídios, ◆ Concentração de Sacarose e ● Concentração de Raminose.

Fonte – Autor, 2018.

Verifica-se por meio da Figura 5.11 que, para o modelo de Dispersão Axial, empregando o método de diferenças finitas, as concentrações de substratos teóricas encontradas (14,12 g/L para o lipídio e 11,99 g/L para a sacarose) são mais elevadas que as experimentais (8,04 g/L para o lipídio e 8,57 g/L para a sacarose) e também que aquelas

descritas pelo modelo PFR, no qual as concentrações encontradas foram de 12, 29 g/L para o lipídio e 10,87 g/L para a sacarose.

Em relação ao produto a concentração teórica encontrada foi de 2,83 g/L, sendo este valor inferior ao teórico encontrado pelo modelo PFR (3,58 g/L) e pelo experimento realizado em coluna para a validação (4,32 g/L).

Desta forma, a validação pelo modelo proposto demonstra que, para a produção estudada, o modelo cinético de *Monod* não descreve de maneira satisfatória o perfil das concentrações de substratos e produto, pois existe desvio do modelo em relação aos pontos teóricos e experimentais encontrados.

5.4.2.2 Modelo de Contois

Foram utilizadas para a implementação do modelo as equações descritas na Tabela 4.1, item 4.5.4 associadas aos parâmetros previamente encontrados para os resultados teóricos, experimentais para os substratos (lipídio e sacarose) e para o produto (raminose) de acordo com a Figura 5.12.

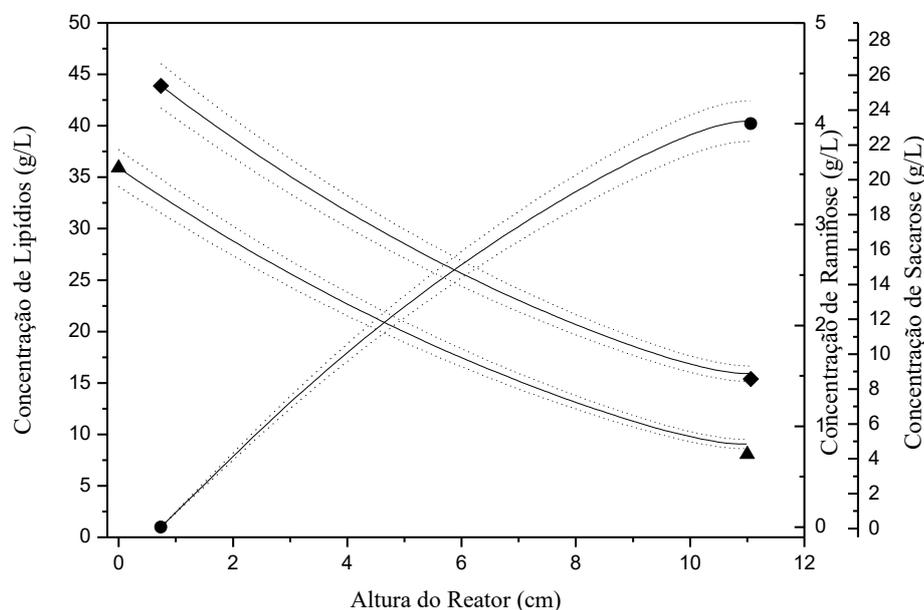


Figura 5.12 – Perfil das Concentrações validadas pelo modelo de Dispersão Axial para o modelo de *Contois*: ■ Concentração de Células, ▲ Concentração de Lipídios, ◆ Concentração de Sacarose e ● Concentração de Raminose.

Fonte – Autor, 2018.

Para o consumo de lipídios a validação por dispersão axial resultou em uma concentração final de 9,06 g/L, sendo este resultado mais satisfatório em relação a validação por PFR, no qual a concentração final foi de 6,87 g/L. Para a sacarose, o resultado obtido por meio desta validação também foi mais eficiente, apresentando uma concentração final de 8,88 g/L.

Em relação à concentração de raminose, os modelos de validação por PFR e diferenças finitas trouxeram resultados próximos, 4,40 g/L e 4,02 g/L, respectivamente. Com isso, a maior eficiência na descrição dos perfis de concentração é observada para o produto.

Desta forma, o modelo cinético de *Contois*, apresenta valores teóricos e experimentais próximos, sendo que a curva teórica não apresenta desvios do modelo, representados pelas curvas pontilhadas para $\pm 5\%$. O que demonstra que o modelo cinético prevê as condições finais do processo, tanto para os substratos quanto produto, de maneira excelente para o modelo de dispersão axial.

De maneira geral, observa-se que os valores encontrados na validação dos modelos cinéticos para as concentrações de substratos e produto são próximos, em especial para o Modelo de *Monod*.

Para o cálculo da dispersão axial foi acrescentado um termo a mais, o coeficiente de dispersão axial (D_{ax}) cujo valor empregado foi de 0,216 cm²/h. Embora o valor encontrado para este coeficiente seja alto, não houve diferenças significativas entre os modelos PFR e de dispersão. A utilização do coeficiente de dispersão (D_{ax}) deveria distanciar os valores encontrados nos modelos de validação, no entanto os valores utilizados para a velocidade de escoamento ($U_f = 0,288$ cm/h) e para este coeficiente são muito próximos numericamente.

A dispersão indica um baixo número de Peclet, conforme exposto na Tabela 5. 8, sugerindo um comportamento de dispersão elevada, porém observou-se pela validação que não houve influência significativa deste comportamento para as concentrações encontradas na validação dos modelos cinéticos.

5.5 Otimização da Produção de Raminose

A otimização do processo contínuo com a sacarose e o lipídio como substratos foi realizada utilizando o modelo de *Contois*. Foi realizada uma varredura na qual foi

avaliada a produtividade por meio de uma análise gráfica do comportamento do modelo cinético proposto, observando a tendência da produtividade. Inicialmente foi utilizada uma de concentração inicial de substrato (alimentada no reator em coluna) de até 40 g/L com velocidade de escoamento (Uf) de 0,288 cm /h. Em seguida, foi realizada uma otimização considerando uma faixa de concentração inicial de substratos de até 80 g/L e variando Uf de 0,13 cm/h a 0,5 cm/h.

A otimização fazendo uma varredura nas concentrações iniciais de substratos e com a velocidade de escoamento igual à utilizada experimentalmente (0,288 cm /h) é descrita na Figura 5.13.

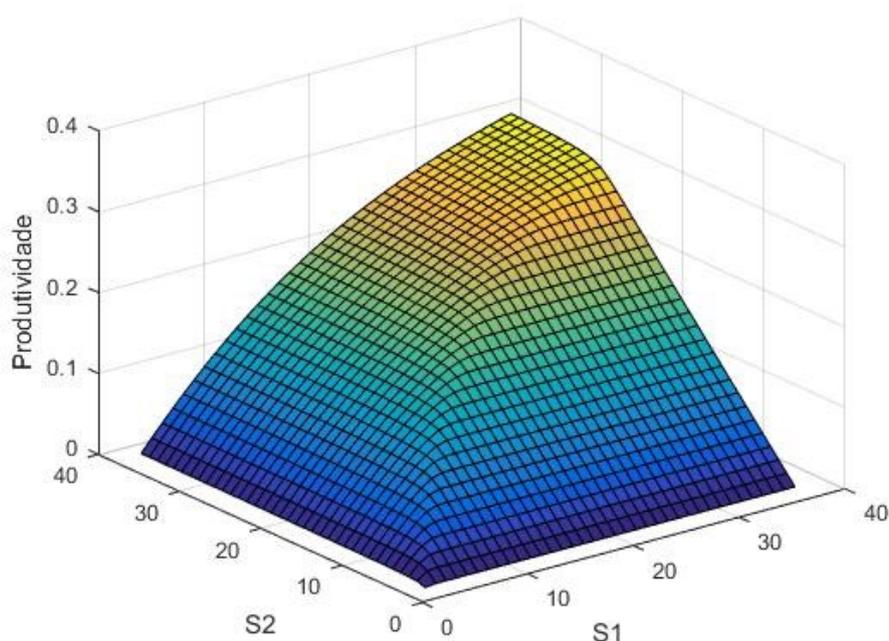


Figura 5.13– Otimização para o Modelo de *Contois* utilizando as faixas de concentrações de substratos de até 40 g/ L, sendo S1 a concentração de Lipídios e S2 a concentração de Sacarose, com velocidade de 0,288 cm/h.

Fonte – Autor, 2018.

O ponto ótimo de produção tenderia a 0,27 g/(L.h) para o valor de velocidade de 0,288 cm/h, e faixas de concentrações iniciais de substratos alimentados no reator até 80 g/L, para ambos os substratos (que já é uma ampla faixa, com altas concentrações). Observou-se que houve maior comportamento de saturação da sacarose (S2), enquanto o lipídeo apresentou tendência à estabilidade. As concentrações iniciais ideais alcançadas nessa otimização são de cerca de 60 g/L para sacarose e 80 g/L para lipídios.

Os gráficos apresentados nas Figuras 5.14 a 5.17 descrevem a otimização realizada para velocidades inferiores a velocidade de escoamento aplicada experimentalmente. Além disso, a faixa de concentração inicial de substratos de até 80 g/L também foi utilizada para avaliar o efeito das concentrações iniciais de sacarose e lipídios em velocidades diferentes da velocidade do fluxo experimental. Para o valor da velocidade igual a 0,13 cm/h, foi encontrado o gráfico demonstrado pela Figura 5.14.

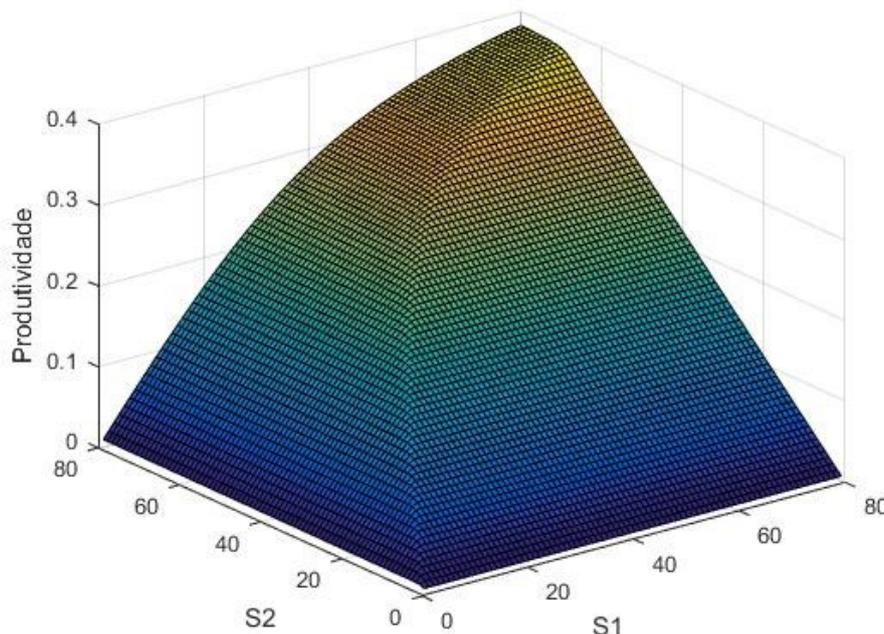


Figura 5.14– Otimização para o Modelo de *Contois* utilizando a velocidade de 0,13 cm/h, sendo S1 a concentração de Lipídios e S2 a concentração de Sacarose.

Fonte – Autor, 2018.

Para o valor da velocidade de 0,13 cm/h, foi encontrado o gráfico mostrado na Figura 5.14, e pode ser visto pelos resultados apresentados nesta figura, que a concentração inicial ótima de lipídios estimada para a otimização a essa velocidade foi de aproximadamente 50 g/L e para a sacarose 80 g/L (no limite da faixa de "varredura"), ou seja, houve saturação do lipídio. Pode ser observado no gráfico que a produtividade na velocidade de 0,13 cm/h tende a 0,15 g/(L.h), demonstrando que em velocidades inferiores às utilizadas experimentalmente, há uma diminuição na produtividade (dentro da faixa de "varredura" até 80 g/L).

A segunda velocidade avaliada foi de 0,2 cm/h e o gráfico que representa a otimização para este valor é descrito na Figura 5.15.

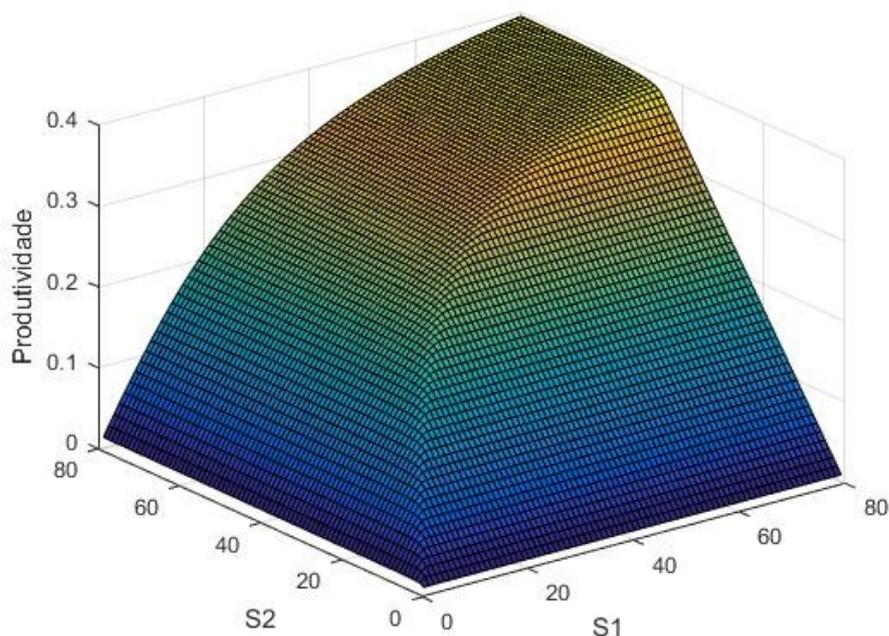


Figura 5.15 – Otimização para o Modelo de *Contois* utilizando a velocidade de 0,2 cm/h, sendo S1 a concentração de Lipídios e S2 a concentração de Sacarose.

Fonte – Autor, 2018.

Verifica-se por meio dos resultados apresentados pela Figura 5.15 que para a velocidade empregada nesta simulação, a produtividade encontrada foi de aproximadamente 0,23 g/(L.h), e os valores ótimos encontrados para as concentrações iniciais de substratos foram em torno de 65 g/L para o lipídio e 80 g/L para a sacarose. Além disso, observa-se que a produtividade apresentou um valor próximo ao encontrado para a velocidade do fluxo experimental, mas agora o gráfico mostrou uma tendência maior de saturação do lipídeo, diferentemente da figura 5.13.

Foram utilizadas duas faixas de velocidades maiores que a velocidade utilizada na reação, sendo elas 0,3 g/L e 0,5 g/L. os gráficos que demonstram os resultados são descritos pelas Figuras 5.16 e 5.17, respectivamente.

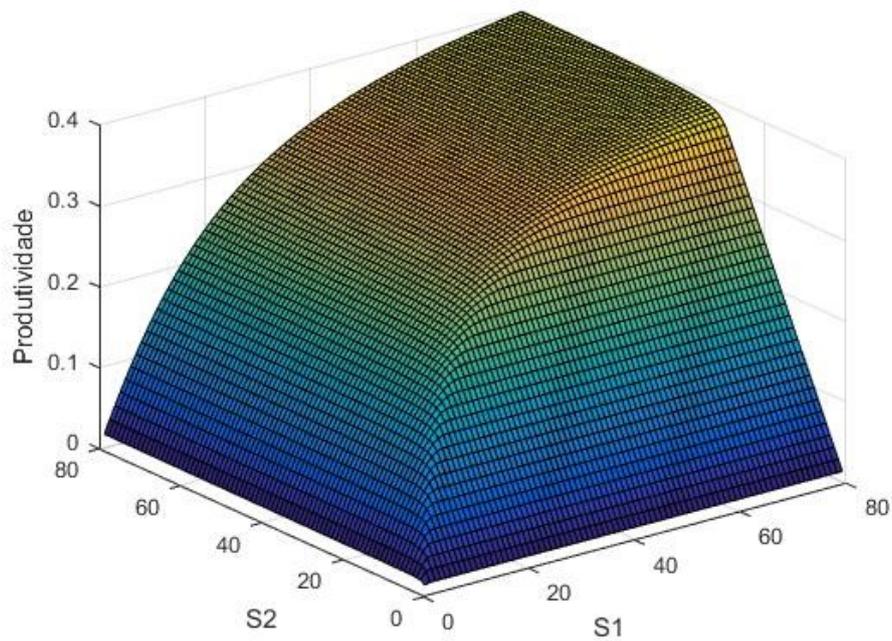


Figura 5. 16 – Otimização para o Modelo de *Contois* utilizando a velocidade de 0,3 cm/h, sendo S1 a concentração de Lipídios e S2 a concentração de Sacarose.

Fonte – Autor, 2018.

A Figura 5.16 mostra os resultados obtidos para a velocidade de 0,3 cm/h o ponto ótimo de produção está para a produtividade de 0,27 g/(L.h) e os valores iniciais das concentrações de substratos são de aproximadamente 80 g/L para o lipídio e 60 g/L para a sacarose, situação muito próxima à do caso base (velocidade de 0,288 cm/h).

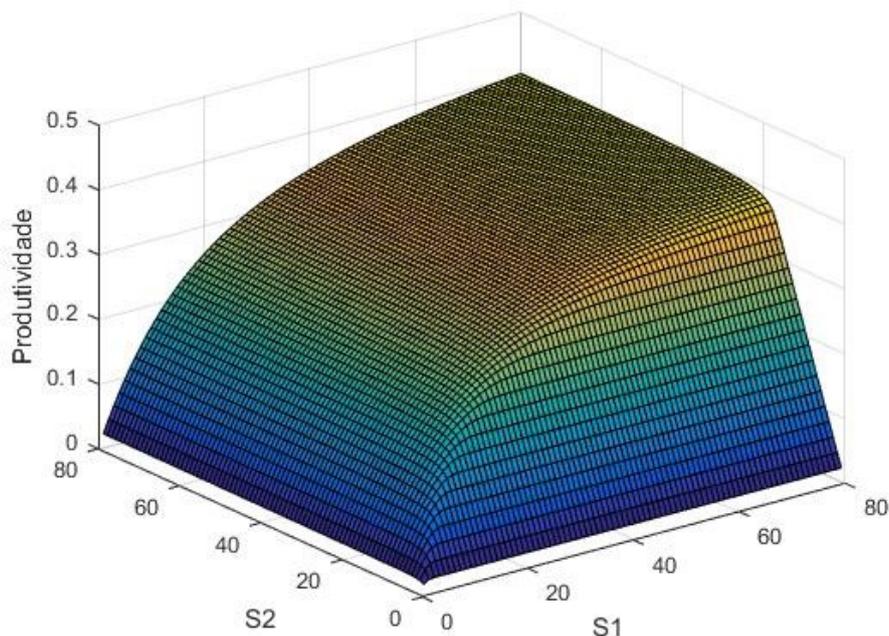


Figura 5.17 – Otimização para o Modelo de *Contois* utilizando a velocidade de 0,5 cm/h, sendo S1 a concentração de Lipídios e S2 a concentração de Sacarose.

Fonte – Autor, 2018.

A Figura 5.17 demonstra a maior velocidade estudada, 0,5 cm/h, e para este caso, as concentrações iniciais ótimas obtidas para lipídios e sacarose foram de aproximadamente 80 g/L e 40 g/L, respectivamente. A simulação resultante dessa velocidade mostra um comportamento de saturação mais alto no processo, revelando que a velocidades em torno de 0,5 cm/h, a melhoria da produtividade já é menos significativa com o aumento das concentrações de substratos.

Para os valores de velocidade de fluxo aplicados às simulações do modelo de *Contois*, com limites de concentração de substratos de até 80 g/L, pode-se observar que, para os valores mais baixos (de velocidade) que os aplicados experimentalmente, a produtividade mostra uma tendência a valores mais baixos, enquanto para os valores de velocidade mais altos testados, a produtividade mantém uma tendência para 0,3 g/(Lh), sendo que os valores das concentrações ótimas iniciais variaram para as velocidades estudadas.

CAPÍTULO VI - CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho foi possível concluir que:

- O melhor resultado para o ajuste paramétrico foi observado para o modelo de Saturação pela Célula, que demonstrou valores finais de concentração próximos aos encontrados experimentalmente;
- O modelo de *Monod* apresentou uma baixa sensibilidade paramétrica e uma alta correlação para as constantes de saturação dos substratos, representadas por k_1 e k_2 , porém se ajustou de maneira adequada aos dados experimentais;
- Os dados obtidos no experimento de validação em coluna pela DTR apresentaram um desvio entre o tempo teórico e o calculado, além de um baixo número de Peclet, indicando um comportamento não ideal para o reator utilizado, sendo observado efeitos de dispersão e de mistura;
- A validação pelo modelo PFR dos parâmetros ajustados exibiu um melhor resultado para o modelo de Saturação pela Célula, sendo que os modelos de *Monod* e *Contois* apresentaram desvios entre os perfis de concentrações teórico e experimental;
- Para o modelo de Dispersão Axial, o modelo de *Contois* conseguiu prever as condições finais do processo, sendo que na validação por ambos os modelos, foi observada uma proximidade entre os valores obtidos de concentrações finais, indicando que não houve influência significativa da dispersão, ainda que seu valor tenha sido alto ($0,216 \text{ cm}^2/\text{h}$);
- Na otimização, o melhor resultado foi obtido pela velocidade de $0,3 \text{ cm/h}$ na qual a produtividade é de $0,4 \text{ g}/(\text{L.h})$, sendo a melhoria na produtividade menos significativa com o aumento da velocidade e das concentrações de sacarose e lipídio, observando-se um comportamento de saturação para processo.

Desta maneira, conclui-se que investigações nessa área possibilitam reduções de custos do processo e aumento na produção de biossurfactante, pois auxiliam na validação de modelos cinéticos, permitindo um melhor ajuste dos parâmetros e, com isso melhorando a otimização do processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, Z.; CROWLEY, D.; NINOSLAV, M.; JHA, S. K. Estimation of biosurfactant yield produced by *Klebsiella sp.* FKOD36 bacteria using artificial neural network approach. *Measurement*, 81, 163-173, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2015.12.019>

AIBA, S., SHODA, M., NAGATANI, M. Kinetics of Product Inhibition in Alcohol Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 10, 845-864, 1968. <https://doi.org/10.1002/bit.260100610>

ALVES, J. G. L. F. Estudo da influência da temperatura na cinética de crescimento anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação (Mestrado em engenharia de alimentos). Faculdade de engenharia de alimentos Universidade de Campinas. Campinas, 83 p., 1996.

ANDRIETTA, S. R. Modelagem, Simulação e Controle de Fermentação alcoólica contínua em escala industrial. 178 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, M. G. S. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. Multiciência, Universidade de Campinas, 2006.

ANDRIETTA, S.R. Otimização de processo de fermentação alcoólica em múltiplos estágios. *Stab. Açúcar, Álcool, Álcool e Subprodutos*, v. 10, n.2, p. 32-37, 1991.

ARAUJO, L. V.; NITSCHKE, M.; FREIRE, D. M. G. Biosurfactants: anticorrosive, antibiofilm and antimicrobial properties. *Química Nova*, vol. 36, nº 6, 848-858, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013000600019>

ATALA, D.I.P.; COSTA, A. C.; MACIEL FILHO, R. e MAUGERI FILHO, F.; Fermentação Alcoólica com alta densidade celular: Modelagem cinética e convalidação de parâmetros. Livro de Resumos do XIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2000.

AUGUSTO, E. F. P., BONOMI, A., GIUDICI, R. Estratégias para ajuste de parâmetros em modelos de processos fermentativos inibidos pelo substrato e produto. Estudo de casos, Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A. Congresso Brasileiro de Engenharia Química COBEQ, 1994. Anais. São Paulo, SP, Brasil, 2, 1252-1257.

BANAT, I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil pollution remediation: A review. *Bioresource Technology*, Essex, v. 51, p. 1-12, 1995. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)00101-6](https://doi.org/10.1016/0960-8524(94)00101-6)

BANAT, I. M. Biosurfactants, more in demand than ever. *Biofutur.*, v. 198, n. 20, p. 44-47, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0294-3506\(00\)88791-8](https://doi.org/10.1016/S0294-3506(00)88791-8)

BANAT, I. M., FRANZETTI, A., GANDOLFI, I., BESTETTI, G., MARINOTTI, M. G.; FRACCHIA, L., SMYTH, T. J., MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potencial. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 87, p. 427-444, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2589-0>

BAILEY, J. E., OLLIS, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. New York: McGraw-Hill Book Company, 984p. (Second Edition), 1986.

BAILEY, David G. et al. Grapefruit juice–drug interactions. *British journal of clinical pharmacology*, v. 46, n. 2, p. 101-110, 1998. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1998.00764.x>

BALTES, M., SCHNEIDER, R., STURM, C., REUSS, M. Optimal experimental design for parameter estimation in unstructured growth models. *Biotechnology Progress*, 10, 480-488, 1994. <https://doi.org/10.1021/bp00029a005>

BLANCH, H. W.; CLARCK, D. S. Principles of Catalysis. In *Biochemical Engineering*. New York: Editora Marcel Dekker, 716p, 1997.

BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces*, v. 152, p. 41-52, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(98\)00684-0](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(98)00684-0)

BONONI, Antônio; SCHMIDELL, Willibaldo. Modelagem Matemática e Simulação de Processos Fermentativos. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). *Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. p. 123-178. (Biotechnologia Industrial; v.2)

BORGES, P. C. S. Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo em batelada alimentada. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG, 2008.

BORGES, W. S. Produção de biossurfactante de efluentes gordurosos gerados por abatedouros e frigoríficos. Dissertação de mestrado, UFU, 2011, 106p.

BOX, G. E. P., WILSON, K. B. (1951), "On the Experimental Attainment of Optimum Conditions", *Journal of the Royal Statistical Society*, XIII, v 1, Série B, pp. 1-45. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1951.tb00067.x>

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontínua Alimentada. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgar Blücher, p. 205-222. (*Biotecnologia Industrial*; v.2), 2001b.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontínua. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgar Blücher, 2001a. p. 193-204. (*Biotecnologia Industrial*; v.2), 2001a.

CENGEL, Y. A.; CIMBALA, J. M. *Mecânica dos fluidos: Fundamentos e aplicações*. McGraw Hill Brasil, 2015.

CHAJUSS, D. Soy protein concentrate: technology, properties, and applications. In: LIU, K. *Soybeans as Functional Foods and Ingredients*, Illinois: AOCS Press, cap. 6, 2004. <https://doi.org/10.1201/9781439822203.ch6>

CHATTAWAY, T; GOMA, G.; RENAUD, P. Y. Modeling ethanol and secondary inhibitions of ethanol fermentation in a multistage reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v.32, n.3, p. 271-276, 1988. <https://doi.org/10.1002/bit.260320303>

CHEN, S. Y., WEI, Y. H., CHANG, J. S. Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, v. 1, p. 67-74, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0980-2>

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 42, p. 224-229, 1987.

COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E. Surface-active compounds from microorganism. *Advances in Applied Microbiology*, v.26, p. 229-252, 1980. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70335-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70335-6)

COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. *Obtenção e aplicação de Biossurfactantes*. Vetor, Rio Grande, 13:85 – 103, 2003.

COSTA, A. C. *Controle Singular em Biorreatores*. Tese MSc., COPPE/ UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1996.

COSTA, A.C., ALVES T. L., HENRIQUES, A. W. S., MACIEL FILHO, R., LIMA, E. L. An adaptive optimal control scheme based on hybrid neural modeling, *Computers them. Engng*, 22, Suppl., S859 – S862, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0098-1354\(98\)00166-5](https://doi.org/10.1016/S0098-1354(98)00166-5)

CRUZ, M. L. Avaliação das Condições de Processo na Resistência da Levedura ao Teor Final de Etanol na Fermentação Alcoólica. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG, 2015.

CURIE, M. Distribuições de Tempos de Residência para Reatores Químicos. In: H. Scoot Fogler. *Elementos de Engenharia das Reações Químicas*, 4ª edição. Rio de Janeiro: LTC, 2009. Cap. 13, p. 703-762.

DARÉ, R. M. Avaliação de Coeficientes de Rendimento e modelagem do processo fermentativo de produção de etanol. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, SP, 2008.

DAUGULIS, A. J; SWAINE, D. E. Examination of substrate and product inhibition kinetics on the production of ethanol by suspended and immobilized cell reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, v.29, p.639-45, 1987. <https://doi.org/10.1002/bit.260290513>

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production os surfactant and their comercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. R.*, v. 61, p.47-64, 1997.

DÉZIEL, E.; LEPINE, F.; DEMRIE, D.; BOISMEN, D.; MAMER, O. A.; VILLEMUR, R. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on manitol or naphthalene. *Biochemical et Biophysical Acta*, v. 1440, p. 244-252, 1999. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(99\)00129-8](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(99)00129-8)

DOMIANO, D.; CHIN, C.S.; m, N.; WANG, S.S. Performance, kinetics and substrate utilization in a continuous yeast fermentation with cell recycle by ultrafiltration membranes. *Apppl MicrobioL BiotechhnoL*, v.21, p.69-77, 1985. <https://doi.org/10.1007/BF00252365>

DOURADO, A., GOMA, G., ALBUQUERQUE, U., SEVELY, Y. Modeling and Statistic Optimization of Ethanol Production in a Cascade Reactor I. Modeling. *Biotechnology and Bioengineering*, 29, n. 2, p. 187-194, 1987. <https://doi.org/10.1002/bit.260290208>

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/historia>> acesso em 12 de outubro de 2018.

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação contínua. In: Schmidell *et al.* (Coord). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher, p. 223-236, 2001.

FERREIRA, R. M. Modelagem e Simulação de Biorreatores tipo Torre Operando com Leveduras Auto Imobilizáveis para a Produção de Etanol. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2003.

FINGUEIRUT, J. Palestra Panorama da Fermentação Alcoólica no Brasil. Jaime Fingueirut. jaime@ctc.com.br. *XV Sinaferm Recife*, PE, 4 de Agosto, 2005.

FIECHTER, A. Biosurfactantes: moving towards industrial application. *Trends in Food Science and Technology*, n. 31, p. 283-293, 1992. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(10\)80013-5](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(10)80013-5)

FISHER, J. Hidrólise de lactose por β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* imobilizada em reator de leito fixo. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

FLEURACKERS, S. J. J. On the Use of Waste Frying Oil in The Synthesis of Sophorolipids. *Europe Jornal Lipid Science and technology*, v. 108, p. 5-12, 2006. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200500237>

FOGLER, H. Scott. Elementos de engenharia das reações químicas. Rio de Janeiro, Brasil: 4a Edição; LTC Editora, 2009.

FROMENT, Gilbert F. et al. Chemical reactor analysis and design. New York: Wiley, 1990.

GOMEZ, P. A. A. Simulação de diferentes alternativas de arranjo de uma unidade de fermentação piloto móvel para a produção de etanol. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2011.

GHOSE, T.K., THYAGI, R.D. Rapid Ethanol Fermentation of Cellulose Hydrolysate. II Product and Substrate Inhibition and Optimization of Fermentor Design. *Biotechnology and Bioengineering*, 21, p. 1401-1420, 1979. <https://doi.org/10.1002/bit.260210808>

GROOT, W.J.; SIKKENK, C.M.; WALDRAM, R.H.; VAN ER LANS, R.G.J.M.; LUYBEN, K.C.A.M. Kinetics of ethanol production by baker's yeast in an integrated process of fermentation and microfiltration. *Bioprocess Eng.*, v.8, p.39-47, 1992. <https://doi.org/10.1007/BF00369262>

HERYANI, H.; PUTRA, M. D. Kinetic study and modeling of biosurfactant production using *Bacillus* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*, 27, 49-54, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.03.005>

HISS, Haroldo. Cinética de Processos Fermentativos. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. p. 93-122. (*Biotecnologia Industrial*; v.2)

HOLMBERG, K. Natural Surfactants. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, v. 6, p. 148-159, 2001. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(01\)00074-7](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(01)00074-7)

HOPPE, G.K & HANSFORD, G.S. Ethanol inhibition of continuous anaerobic yeast growth. *Biotechnology Letters*, v.4, n.1, p.39-44, 1982. <https://doi.org/10.1007/BF00139280>

HU, Y.; JU, L. K. Purification of lactonic sophorolipids by crystallization. *J. Biotechnol.*, v. 87 (3), p. 263-272, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00248-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00248-6)

HUALLANCO, M. B. A. Modelagem Cinética e Simulação de Processos de Produção de Frutooligosacarídeos por Frutotransferase de *Rhodotorula* sp. *Livre e Imobilizada*. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2010.

INGHAM, J., DUNN, I. J., HEINZLE, E., PRENOSIL, J. E., SNAPE, J. B., *Chemical Engineering Dynamics*, VHC Publishers INC, New York, 645pp, 2007. <https://doi.org/10.1002/9783527614219>

JAMAL, P.; NAWAWI, W. M. F. W.; ALAM, Z. Utilization of sludge palm oil as a novel substrate for production. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 0241-9247, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.024>

JARZEBSKI, A.B; MALINOWSKI, J.J.; GOMA, G. Modeling of ethanol fermentation at high yeast concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*, v.34, n.9, p.1225-1230, 1989. <https://doi.org/10.1002/bit.260340915>

JIN, C. K.; CHIANG, H.L.; WANG, S.S. Steady-state analysis of the enhancement in ethanol productivity of a continuous fermentation process employing a protein

phospholipid complex as a protecting agent. *Enzyme and Microbial Technology*, v.3, n. 3, p.249-257, 1981. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(81\)90095-8](https://doi.org/10.1016/0141-0229(81)90095-8)

JOHNSON, L.A., MYERS, D.J., BURDEN, D.J. Soy Protein's History. *Prospectis in Food, Feed. Inform* 3:429-444, 1992.

JUNIOR, A. F. B. Estimação de parâmetros, modelagem e Simulação da síntese de Fisher-Tropsch em reator tubular de leito fixo com catalisador de cobalto. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

KAMALI, F. P.; MEUWISSEN, M. P. M.; BOER, I. J. M.; VAN MIDDELAAR, C. E.; MOREIRA, A.; OUDE LANSINK, A. G. J. M. Evaluation of the environmental, economic, and social performance of soybean farming systems in Southern Brazil. *Journal of Cleaner Production*, p. 1-10, 2016

KARANTH, N. G. K., DEO, P. G., VEENANADIG, N. K. Microbial production of biosurfactants and their importance. *Curr. Sci.*, v.1, p. 116-126, 1999.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J.Cell Biol.* 27:137 – 8A, 1965.

KELLER, R; DUNN, J. Computer of the biomass production rate of cyclic fed batch continuous culture. *J. Appl. Chem. Biotechnol*, v.28, p. 784-790, 1978. <https://doi.org/10.1002/jctb.5700281116>

LANG, S.; WAGNER, F. Structure and Properties of Biosurfactants. In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N. C. C. (ed), *Biosurfactants and Biotechnonology*. New York: Maecel Dekker, p. 21-45, 1987. <https://doi.org/10.1201/9781315138428-2>

LANG, S. Biological Amphiphiles: Microbial Surfactants. *Opinion in Colloid and Interface Science*, v. 74, p. 59-70, 2002.

LEE, J. M.; POLLARD, J.F.; COULMAN, G. A. Ethanol fermentation with cell recycling: computer and simulation. *Biotechnology and Bioengineering*, v.25, n.2, p.497-511, 1983. <https://doi.org/10.1002/bit.260250215>

LEVENSPIEL, O. *Engenharia das Reações Químicas-Cálculo de Reatores*. São Paulo, Brasil: Edgard Blucher. 1972.

LEVENSPIEL, O. Monod Equation: a revised and a generalization to product inhibition situations. *Biotechnology and Bioengineering*, v.22, n.8, p.1671-1687, 1980. <https://doi.org/10.1002/bit.260220810>

LIMA, A. S. Produção, estabilidade e isolamento de bioemulsificante obtido a partir da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica*. Campinas, 1996. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. In: LIMA, U. A. (Coord.). *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p.1-43. (Biotecnologia Industrial; v.3).

LIMA, C. J. B. Produção de Biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* empregando óleo de soja residual. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2007.

LIN, J. F., CHOU, C. C. (2002), “The response surface method and the analysis of mild oxidational wear”, *Tribology International*, v 35, pp. 771–785. [https://doi.org/10.1016/S0301-679X\(02\)00030-0](https://doi.org/10.1016/S0301-679X(02)00030-0)

LUONG, J. H. T. Kinetics of Ethanol Inhibition in Alcohol Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, p. 280-285, 1985. <https://doi.org/10.1002/bit.260270311>

MAKULA, R. A.; FINNERTY, W. R. Microbial assimilation of hydrocarbons: cellular distribution of fatty acids. *Journal of Bacteriology*, v. 112, p. 398-407, 1972.

MAZUTTI, M. A. Avaliação Cinética e Modelagem Matemática da Produção de Inulinase por Fermentação em Estado Sólido em Biorreator de Leito Fixo. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2009.

MESQUITA, A. C. Uso das Técnicas de Oxidação Química e Biodegradação na Remoção de Alguns Componentes Recalcitrantes. Tese de Doutorado, UFRJ, 2004, 158p.

MITCHELL, D. A.; von MEIEN, O. F.; KRIEGER, N.; DALSENTER, F. D., A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in sold-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 17, p. 15-26, 2004. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00120-7](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00120-7)

McNEIL, B. e HARVEY, L. M. *Fermentation – a practical approach*. 1st ed. IRL PRESS at Oxford University Press. 1990.

MOUAFI, F. E.; MOSTAFA, M. A. E.; MOHARAM, M. E. Optimization of biosurfactant production by *Bacillus brevis* using response surface methodology. *Biotechnology Reports*, 9: 31 -37, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.12.003>

MOMBOUQUETTE, G.H. Models for high cell density bioreactors must consider biomass volume fraction. Cell recycle example. *Biotechnology and Bioengineering*, v.29, n.9, p. 1075-1080, 1987. <https://doi.org/10.1002/bit.260290906>

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*. n. 60, p. 371-380, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0013-7952\(00\)00117-4](https://doi.org/10.1016/S0013-7952(00)00117-4)

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEM, R. Towards comercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol.*, v 24, p. 509-515, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.09.005>

MUSHTAQ, F. Analysis and Validation of Chemical Reactors performance models developed in a commercial software platform. 2014. Master of Science Thesis - KTH School of Industrial Engineering and Management, 2013.

NETO, A. B. Estudo do processo de produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em cultivos contínuos com alta concentração celular. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, SP, 2004.

NISTCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. *Revista Química Nova*, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000500013>

OLAFADEHAN, O. A. The Transient Characteristics of a Packed Bed Tubular Reactor for Lactose – Lactase Hydrolusis. B. Sc. Research Project, University of Lagos, Lagos, Nigeria, 1989.

OLIVEIRA, F. J. S.; VASQUEZ, L.; CAMPOS, N. P. de.; FRANÇA, F. P. de. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas alcaligenes* strain. *Process Biochemistry*, v. 44, p.383-389, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.11.014>

PACHECO, T. F. Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

PALANKI, S., KRAVARIS, C. and Wang H.Y. Synthesis of state feedback laws for end-point optimization in batch processes. *Chemical Engineering Science*, 48, 135-152., 1993. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(93\)80290-7](https://doi.org/10.1016/0009-2509(93)80290-7)

PINTO, J.C.S; LAGE, P.L. Apostila Métodos Numéricos Aplicados à Engenharia Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1997.

PLOCINICZAK, M. P.; PLAZA, G. A.; SEGET, Z. P.; CAMEOTRA, S. S. Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances, *Int. J. Mol. Sci.*, v. 12, p. 633-654, 2011. <https://doi.org/10.3390/ijms12010633>

QURESHI, N., LOLAS, A., BLASCHEK, H.P. Soy molasses as fermentation substrate for production of butanol using *Clostridium beijerinckii* BA 101. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26:290-295, 2001. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000131>

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T. J.; McCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipid Biosurfactant Production by Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Using Low-Cost Raw Materials. *Biotechnol. Prog.*, v. 18, p. 1277-1281, 2002. <https://doi.org/10.1021/bp020071x>

RANADE, V. V. Computational flow modeling for chemical reactor engineering. London, England: Academic press, 2001.

REISER, J. K. A. K.; OCHSNER, U. A.; FIECHER, A. Genetic of surface-active compounds. *Biosurfactants (surfactant Science series)* in: Dekker, (ed). New York, v.48, p.231-249, 1993.

RIBEIRO, E. J. Apostila Açúcar e álcool. Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, 2010.

RODRIGUES, M. S. Produção de Biossurfactantes utilizando melão de soja. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2016.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied Microbiol. Biotechnol.*, v. 52 (2), p. 154-162, 1999. <https://doi.org/10.1007/s002530051502>

SANZ, E.; VOSS, C. I. Inverse modeling for a seawater intrusion in coastal aquifers: Insights about parameter sensitivities, variances, correlations and estimation procedures derived from the Henry problem. *Advances in Water Resources*, v.29, p.439-457, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2005.05.014>

SARAMAGO, S. P.; STEFFEN JR. V. Introdução as técnicas de Otimização em Engenharia. Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. Fermentação Descontínua. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. p. 193-204. (Biotecnologia Industrial; v.2).

SASSAKI, R. A. Distribuição de tempos de residência em sistemas alimentados com vazão variável. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 2005.

SEVELY, Y.; PORCIEL, J.P.; RAUZY, G.R.; BABANS, J.P. Paper presented at the 8th IFAC Trienal Congress, Kyoto, Japan, Aug., 1981.

SIM, L.; WARD, O. P.; LI, Z. Y. Production and characterisation of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Hampshire, v.19, p. 232-238, 1997. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900450>

SIVAPATHASEKARAN C, MUKHERJEE S, SEN R. Optimization of a marine medium for augmented biosurfactant production. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. 2010; 8, article A92. <https://doi.org/10.2202/1542-6580.2231>

SCHMAL, Martin. Cinética e reatores: aplicação na engenharia química: teoria e exercícios. Rio de Janeiro, Brasil; Synergia, 2010.

SCHMIDELL, Willibaldo; FACCIOTTI, Maria Cândida Reginato. Biorreatores e Processos fermentativos. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher, 2001. p. 179-192. (Biotecnologia Industrial; v.2).

SHAFI, R.; KHANNA, S. Biosurfactants. *Indian Journal of Microbiology*, n. 33, p. 163-184, 1995.

STREMEL, D. P. Desenvolvimento de Modelos Estruturados Alternativos para o Processo de Produção de Etanol, p. 283, 2001.

SWEETLAND, B. Modelos para reatores não ideais. In: H. Scoot Fogler. Elementos de Engenharia das Reações Químicas, 4ª edição. Rio de Janeiro: LTC, 2009. Cap. 14, p. 765-813.

THATIPAMALA, R., ROHANI, S., HILL, G.A. Effects of High Product and Substrate Inhibitions on the Kinetics and Biomass and Product Yields During Ethanol Batch Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 40, p. 289-297, 1992. <https://doi.org/10.1002/bit.260400213>

TOLEDO, E. C. V. Modelagem, Simulação e Controle de Reatores Catalíticos de Leito Fixo. Campinas. Tese (Doutor em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. 337p., 1999.

TOSETTO, G. M. Influência da Matéria Prima no Comportamento Cinético de Levedura na Produção de Etanol. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 82p, 2002.

VARJANI, S. J., UPASANI, V. N. Critical review on Biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresource Technology*, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.047>

VIEGAS, M. C. Otimização de sistema de fermentação alcoólica contínua utilizando reatores tipo torre e leveduras com características floculantes. 139 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

VICCINI, G.; MITCHELL, D. A.; BOIT, S. D.; GERN, J. C.; ROSA, A. S.; COSTA, R. M.; DALSENTER, F. D. H.; von MEIEN, O. F.; KRIEGER, N., Analysis of growth kinetic profiles in solid-state fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, v. 39, n° 4, p. 271-294, 2001.

WANG, F.; SHEU, J. Multiobjective parameter estimation problems for fermentation processes using a high ethanol tolerance yeast. *Chemical Engineering Science*, v.55, p.3685-3695, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(00\)00038-5](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(00)00038-5)

WU, J. Y.; YEH, K. L.; LU, W. B.; LIN, C. L.; CHANG, J. S. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site, Article of *Bioresource Technology*, fev. p. 1157-1164, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.02.026>

YIN, H.; QIANG, J.; JIA, Y.; YE, J.; PENG, H.; QIN, H.; ZHANG, N.; HE, B. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. *Article of Process Biochemistry*, nov. p. 302-308, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.11.003>

ZARPELLON, F. e ANDRIETTA, S. R. Fermentação Contínua para Produção de Álcool.
STAB Açúcar e Álcool e Subprodutos, p. 23-28, 1992