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

OTIMIZAÇÃO DINÂMICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA NO PROCESSO EM BATELADA ALIMENTADA

PATRICIA CAROLINA SANTOS BORGES

Uberlândia – MG
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

OTIMIZAÇÃO DINÂMICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA NO PROCESSO EM BATELADA ALIMENTADA

Patricia Carolina Santos Borges

Orientadores: Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
Profa. Dra. Valéria Viana Murata

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
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

B732o Borges, Patrícia Carolina Santos, 1981-
Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo embatelada alimentada / Patrícia Carolina Santos Borges. - 2008.
141 f. : il.

Orientadores : Eloízio Júlio Ribeiro, Valéria Viana Murata.

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

1. Fermentação - Teses. 2. Álcool - Teses. I. Ribeiro, Eloízio Júlio. II. Murata, Valéria Viana. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

CDU: 663.15

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, EM 7 DE MARÇO DE 2008.

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Eloízio Júlio Ribeiro
Orientador (PPGEQ/UFU)

_____

Profa. Dra. Valéria Viana Murata
Co-orientadora (PPGEQ/UFU)

_____

Profa. Dra. Miriam Maria de Resende
(PPGEQ/UFU)

_____

Prof. Dr. Luís Cláudio Oliveira Lopes
(PPGEQ/UFU)

_____

Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano
(PPGEQ/UFSCar)

Este trabalho é dedicado à minha mãe, pela confiança depositada em mim, pelo incentivo e apoio aos meus estudos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me confortar e dar ânimo nos momentos difíceis, e equilíbrio nos momentos felizes.

Aos professores Eloízio Júlio Ribeiro e Valéria Viana Murata, pela orientação da dissertação, pela amizade, pela confiança em mim depositada e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Aos demais professores da banca examinadora, Miriam Maria de Resende, Luís Cláudio Oliveira Lopes e Roberto de Campos Giordano, pela participação e sugestões.

A toda minha família: minha mãe (Maria Aparecida) pelo apoio incondicional, meu pai, (Paulo Borges) pelo exemplo de humildade e honestidade, meu Irmão, Cunhada, Sobrinha, Tios, Primos e Avós, pela compreensão, dedicação e amizade.

Ao meu namorado (Celso Augusto) pela paciência, pelo companheirismo e colaboração nas atividades no laboratório.

Ao Fran Sérgio e à Adriene, por me ajudarem na compreensão dos métodos de estimação de parâmetros e otimização, além das dicas extras.

À Patrícia Tavares, à Sandra, e à Patrícia Angélica pelos conhecimentos compartilhados e pela colaboração na fase experimental da dissertação. Ao Marcelo Leite, por me instruir com relação à operação do fermentador.

Aos alunos da graduação Mirismar, Luana, Alex e Edelise, por me ajudarem nas análises das fermentações, pelo carinho e amizade.

À Empresa Mauri Brasil Ind. Com. e Imp. Ltda, pelo fornecimento das leveduras *S. cerevisiae* Y904.

À todos os professores e funcionários da FEQ/UFU, pelo apoio, pelos ensinamentos e participação na minha formação profissional. Em especial gostaria de agradecer às Professoras Miriam e Vicelma, e aos funcionários Zuleide e Anísio, por me ajudarem com o fornecimento de materiais e instrumentos usados nos experimentos, e ao Édio, pela colaboração com relação aos programas computacionais utilizados.

Às amigas Renata Fátima, D. Maria e D. Graça, pelo carinho, pelo apoio e amizade.

À Capes pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS iii
LISTA DE TABELAS x
NOMENCLATURA xii
RESUMO xiv
ABSTRACT xv

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO 1

CAPÍTULO 2 – FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM BATELADA ALIMENTADA 5
2.1 Revisão Bibliográfica 5
2.1.1 Processos Fermentativos 5
2.1.2 Microrganismos da Fermentação Alcoólica 6
2.1.3 Cinética da Fermentação Alcoólica 9
2.2 Materiais e Métodos 16
2.2.1 Cultura e Meio 16
2.2.2 Procedimento e Configuração Experimental 16
2.2.3 Métodos Analíticos 17
2.3 Resultados e Discussões 18
2.4 Conclusões 31

CAPÍTULO 3 – DESENVOLVIMENTO DO MODELO CINÉTICO 33
3.1 Revisão Bibliográfica 33
3.2 Materiais e Métodos 37
3.2.1 Cultura e Meio 37
3.2.2 Procedimento e Configuração Experimental 38
3.2.3 Métodos Analíticos 38
3.2.4 Modelos Matemáticos 38
3.2.5 Metodologia Aplicada na Estimação dos Parâmetros 41
3.3 Resultados e Discussões 42
3.3.1 Estimação dos Parâmetros do Modelo para as Fermentações em Batelada 42
3.3.2 Estimação dos Parâmetros do Modelo para as Fermentações em Batelada Alimentada 55
3.4 Conclusões 70

CAPÍTULO 4 – ANÁLISE DE SENSIBILIDADE PARAMÉTRICA 73
4.1 Revisão Bibliográfica 73
4.2 Análise de Sensibilidade Paramétrica 75
4.3 Estimativa da Correlação entre os Parâmetros 77
4.4 Resultados e Discussões 79
4.4.1 Análise de Sensibilidade Paramétrica 79
4.4.2 Correlação dos Parâmetros 86
4.5 Conclusões 88

CAPÍTULO 5 – OTIMIZAÇÃO DINÂMICA DA FERMENTAÇÃO EM BATELADA ALIMENTADA 91
5.1 Revisão Bibliográfica 91
5.1.1 O Problema Geral de Otimização 97
5.1.2 Métodos Numéricos de Solução de Problemas de Otimização Dinâmica 101
5.2 Metodologia da Otimização Dinâmica da Fermentação em Batelada Alimentada 103
5.3 Resultados e Discussões 107
5.4 Conclusões 114

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO GERAL E SUGESTÕES 117

APÊNDICES 119
APÊNDICE A – DADOS DOS EXPERIMENTOS 119
Apêndice A.1 – Resultados dos Experimentos em Batelada 119
Apêndice A.2 – Resultados dos Experimentos em Batelada Alimentada 120
APÊNDICE B – CURVAS DE CALIBRAÇÃO 125
Apêndice B.1 – Curvas de Calibração para a Determinação da Concentração de Sacarose 125
Apêndice B.2 – Curvas de Calibração para a Determinação da Concentração de Etanol 128

ANEXO 131

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 135

LISTA DE FIGURAS

2.1 Configuração do fermentador para o experimento em batelada alimentada 17

2.2 Concentrações de sacarose, células e etanol para os experimentos em batelada alimentada com t_e = 3 h e diferentes concentrações de substrato alimentado 19

2.3 Concentrações de sacarose, células e etanol para os experimentos em batelada alimentada com t_e = 4 h e diferentes concentrações de substrato alimentado 20

2.4 Concentrações de sacarose, células e etanol para os experimentos em batelada alimentada com t_e = 5 h e diferentes concentrações de substrato alimentado 20

2.5 Variações dos rendimentos em células (●) e em produto (○) com a concentração de sacarose na alimentação para t_e = 3 h 21

2.6 Variações dos rendimentos em células (●) e em produto (○) com a concentração de sacarose na alimentação para t_e = 4 h 22

2.7 Variações dos rendimentos em células (●) e em produto (○) com a concentração de sacarose na alimentação para t_e = 5 h 22

2.8 Variações da percentagem de utilização do açúcar (●) e concentração percentual de etanol (○) com a concentração de sacarose na alimentação para t_e = 3 h 24

2.9 Variações da percentagem de utilização do açúcar (●) e concentração percentual de etanol (○) com a concentração de sacarose na alimentação para t_e = 4 h 25

2.10 Variações da percentagem de utilização do açúcar (●) e concentração percentual de etanol (○) com a concentração de sacarose na alimentação para t_e = 5 h 25

2.11 Variação da produtividade de etanol com a taxa inicial de adição do açúcar ao fermentador para t_e = 3 h 25

2.12 Variação da produtividade de etanol com a taxa inicial de adição do açúcar ao fermentador para t_e = 4 h 26

2.13 Variação da produtividade de etanol com a taxa inicial de adição do açúcar ao fermentador para t_e = 5 h 26

2.14 Variações dos rendimentos em células (●) e em produto (○) com o tempo de enchimento do fermentador (t_e) para os experimentos com $s_F \approx 218$ g/L 27

2.15 Variação da produtividade de etanol com o tempo de enchimento do fermentador (t_e) para os experimentos com $s_F \approx 218$ g/L 27
2.16 Variações dos rendimentos em células y_{xs} (símbolos cheios) e em produto y_{ps} (símbolos vazios) com o tempo de fermentação (a) e concentração de etanol (b) para os experimentos com $s_F \approx 218$ g/L 28
2.17 Variações dos rendimentos em células (●) e em produto (○) com o tempo de enchimento do fermentador (t_e) para os experimentos com $s_F \approx 245$ g/L 29
2.18 Variação da produtividade de etanol com o tempo de enchimento do fermentador (t_e) para os experimentos com $s_F \approx 245$ g/L 29
2.19 Variações dos rendimentos em células y_{xs} (símbolos cheios) e em produto y_{ps} (símbolos vazios) com o tempo de fermentação (a) e concentração de etanol (b) para os experimentos com $s_F \approx 245$ g/L 29
2.20 Variações dos rendimentos em células (●) e em produto (○) com o tempo de enchimento do fermentador (t_e) para os experimentos com $s_F \approx 285$ g/L 30
2.21 Variação da produtividade de etanol com o tempo de enchimento do fermentador (t_e) para os experimentos com $s_F \approx 285$ g/L 30
2.22 Variações dos rendimentos em células y_{xs} (símbolos cheios) e em produto y_{ps} (símbolos vazios) com o tempo de fermentação (a) e concentração de etanol (b) para os experimentos com $s_F \approx 285$ g/L 30
3.1 Classificação dos Métodos de Otimização (Adaptado de Vanderplaats, 1999) .. 34
3.2 Configuração do fermentador para o experimento em batelada 38
3.4 Taxa específica máxima de crescimento celular experimental para a fermentação em batelada com $s_0 = 154$ g/L 45
3.5 Taxa específica máxima de crescimento celular experimental para a fermentação em batelada com $s_0 = 180{,}1$ g/L 45
3.6 Taxa específica máxima de crescimento celular experimental para a fermentação em batelada com $s_0 = 195{,}6$ g/L 45
3.7 Perfil da concentração de sacarose para $s_0 = 154$ g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado 46
3.8 Perfil da concentração de células para $s_0 = 154$ g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado 47
3.9 Perfil da concentração de etanol para $s_0 = 154$ g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado 47

3.10 Perfil da concentração de sacarose para s_0 = 180,1 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado 48
3.11 Perfil da concentração de células para s_0 = 180,1 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado 48
3.12 Perfil da concentração de etanol para s_0 = 180,1 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado 49
3.13 Perfil da concentração de sacarose para s_0 = 195,6 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado 49
3.14 Perfil da concentração de células para s_0 = 195,6 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado 50
3.15 Perfil da concentração de etanol para s_0 = 195,6 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado 50
3.16 Perfil da concentração de sacarose para s_0 = 154 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED a partir dos 2 experimentos em batelada com s_0 = 154 e 180,1 g/L. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado 52
3.17 Perfil da concentração de células para s_0 = 154 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED a partir dos 2 experimentos em batelada com s_0 = 154 e 180,1 g/L. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado 52
3.18 Perfil da concentração de etanol para s_0 = 154 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED a partir dos 2 experimentos em batelada com s_0 = 154 e 180,1 g/L. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado 53
3.19 Perfil da concentração de sacarose para s_0 = 180,1 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED a partir dos 2 experimentos em batelada com s_0 = 154 e 180,1 g/L. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado 53
3.20 Perfil da concentração de células para s_0 = 180,1 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED a partir dos 2 experimentos

em batelada com s_0 = 154 e 180,1 g/L. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado 54
3.21 Perfil da concentração de etanol para s_0 = 180,1 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED a partir dos 2 experimentos em batelada com s_0 = 154 e 180,1 g/L. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado 54
3.22 Taxa específica máxima de crescimento celular experimental após o tempo de enchimento de 5 horas para batelada alimentada com s_F = 217 g/L 57
3.23 Taxa específica máxima de crescimento celular experimental após o tempo de enchimento de 5 horas para batelada alimentada com s_F = 241,4 g/L 58
3.24 Taxa específica máxima de crescimento celular experimental após o tempo de enchimento de 5 horas para batelada alimentada com s_F = 285 g/L 58
3.25 Perfis das variáveis de estado para s_F = 217 g/L e t_e = 5 h. (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado. (a) Sacarose (b) Células (c) Etanol (d) Volume 59
3.26 Perfis das variáveis de estado para s_F = 241,4 g/L e t_e = 5 h. (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado. (a) Sacarose (b) Células (c) Etanol (d) Volume 60
3.27 Perfis das variáveis de estado para s_F = 285 g/L e t_e = 5 h. (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado. (a) Sacarose (b) Células (c) Etanol (d) Volume 61
3.28 (●) Taxa de crescimento específico e (▲) concentração de sacarose em função da concentração de etanol para a fermentação em batelada alimentada com t_e = 5 h e s_F = 217 g/L 62
3.29 (●) Taxa de crescimento específico e (▲) concentração de sacarose em função da concentração de etanol para a fermentação em batelada alimentada com t_e = 5 h e s_F = 241,4 g/L 62
3.30 (●) Taxa de crescimento específico e (▲) concentração de sacarose em função da concentração de etanol para a fermentação em batelada alimentada com t_e = 5 h e s_F = 285 g/L 63
3.31 Perfis das variáveis de estado para s_F = 245 g/L e t_e = 3 h. (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado. (a) Sacarose (b) Células (c) Etanol 65

(d) Volume .....

3.32 Perfis das variáveis de estado para s_F = 245 g/L e t_e = 4 h. (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado. (a) Sacarose (b) Células (c) Etanol (d) Volume 66

3.33 Perfis das variáveis de estado para s_F = 217 g/L e t_e = 5 h. (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED pelos três experimentos em batelada alimentada com t_e = 5h. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado. (a) Sacarose (b) Células (c) Etanol (d) Volume 68

3.34 Perfis das variáveis de estado para s_F = 241,4 g/L e t_e = 5 h. (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED pelos três experimentos em batelada alimentada com t_e = 5h. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado. (a) Sacarose (b) Células (c) Etanol (d) Volume 69

3.35 Perfis das variáveis de estado para s_F = 285 g/L e t_e = 5 h. (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED pelos três experimentos em batelada alimentada com t_e = 5h. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado. (a) Sacarose (b) Células (c) Etanol (d) Volume 70

4.1 Perfil de sensibilidade da concentração de sacarose em relação aos parâmetros do modelo (—) batelada com s_0 = 154 g/L e (---) batelada alimentada com s_F = 217 g/L e t_e = 5h 81

4.2 Perfil de sensibilidade da concentração de células em relação aos parâmetros do modelo (—) batelada com s_0 = 154 g/L e (---) batelada alimentada com s_f = 217 g/L e t_e = 5h 82

4.3 Perfil de sensibilidade da concentração de etanol em relação aos parâmetros do modelo (—) batelada com s_0 = 154 g/L e (---) batelada alimentada com s_F = 217 g/L e t_e = 5h 82

4.4 Perfil de sensibilidade da concentração de sacarose em relação aos parâmetros do modelo (—) batelada com s_0 = 180,1 g/L e (---) batelada alimentada com s_F = 241,4 g/L e t_e = 5h 83

4.5 Perfil de sensibilidade da concentração de células em relação aos parâmetros do modelo (—) batelada com s_0 = 180,1 g/L e (---) batelada alimentada com s_F = 241,4 g/L e t_e = 5h 83

4.6 Perfil de sensibilidade da concentração de etanol em relação aos parâmetros do modelo (—) batelada com s_0 = 180,1 g/L e (---) batelada alimentada com s_F = 241,4 g/L e t_e = 5h 84

4.7 Perfil de sensibilidade da concentração de sacarose em relação aos 84

parâmetros do modelo (—) batelada com s_0 = 195,6 g/L e (---) batelada alimentada com s_F = 285 g/L e t_e = 5h .....
4.8 Perfil de sensibilidade da concentração de células em relação aos parâmetros do modelo (—) batelada com s_0 = 195,6 g/L e (---) batelada alimentada com s_F = 285 g/L e t_e = 5h 85
4.9 Perfil de sensibilidade da concentração de etanol em relação aos parâmetros do modelo (—) batelada com s_0 = 195,6 g/L e (---) batelada alimentada com s_F = 285 g/L e t_e = 5h 85
5.1 (—) Perfil ótimo da concentração de sacarose. (---) Perfil simulado a partir do modelo estimado. (○) Dados experimentais para batelada alimentada com s_F = 285 g/L e t_e = 5 h. As linhas em azul representam os eventos t_{s1} e t_{s2} 109
5.2 (—) Perfil ótimo da concentração de células. (---) Perfil simulado a partir do modelo estimado. (○) Dados experimentais para batelada alimentada com s_F = 285 g/L e t_e = 5 h. As linhas em azul representam os eventos t_{s1} e t_{s2} 110
5.3 (—) Perfil ótimo da concentração de etanol. (---) Perfil simulado a partir do modelo estimado. (○) Dados experimentais para batelada alimentada com s_F = 285 g/L e t_e = 5 h. As linhas em azul representam os eventos t_{s1} e t_{s2} 110
5.4 Perfil ótimo do volume do fermentador. (---) Perfil simulado. (○) Dados experimentais para batelada alimentada com s_F = 285 g/L e t_e = 5 h. As linhas em azul representam os eventos t_{s1} e t_{s2} 111
5.5 (—) Perfil ótimo da vazão de alimentação de substrato – variável de controle. (---) e (○) Vazão de alimentação utilizada no experimento e na simulação em batelada alimentada com s_F = 285 g/L e t_e = 5 h. As linhas em azul representam os eventos t_{s1} e t_{s2} 111
5.6 Função Identificadora de Fase 112
5.7 (—) Rendimento ótimo em etanol. (---) e (○) Rendimento final em etanol obtido experimentalmente 112
5.8 (—) Taxa ótima de crescimento celular específica. (---) Taxa de crescimento celular específica a partir do modelo estimado. (○) Taxa de crescimento celular específica obtida pelos dados experimentais 113
5.9 (—) Perfil da produção de etanol (Função Objetivo) alcançada pela otimização. (---) Produção de etanol obtida pelo modelo estimado. (○) Produção de etanol obtida dos dados experimentais 113
B.1 Curva de Calibração utilizada nos experimentos em batelada com s_0 = 154 g/L, e batelada alimentada com s_F = 218 g/L e t_e = 3h 125
B.2 Curva de Calibração utilizada no experimento em batelada com s_0 = 180,1 g/L 126

B.3 Curva de Calibração utilizada no experimento em batelada com s_0 = 195,6 g/L 126
B.4 Curva de Calibração utilizada nos experimentos em batelada alimentada com s_F = 218 g/L e t_e = 4 e 5 h; s_F = 245 g/L e t_e = 3 h 127
B.5 Curva de Calibração utilizada nos experimentos em batelada alimentada com s_F = 245 g/L e t_e = 4 e 5 h; s_F = 285 g/L e t_e = 3 h 127
B.6 Curva de Calibração utilizada no experimento em batelada alimentada com s_F = 285 g/L e t_e = 4 e 5 h 128
B.7 Curva de Calibração utilizada em todos os experimentos em batelada e nos experimentos em batelada alimentada com s_F = 218 g/L e t_e = 3, 4 e 5 h; s_F = 245 g/L e t_e = 3h 129
B.8 Curva de Calibração utilizada nos experimentos em batelada alimentada com s_F = 245 g/L e t_e = 4 e 5 h; s_F = 285 g/L e t_e = 3, 4 e 5h 129
1 Geração dos indivíduos da população representados por vetores no método de Evolução Diferencial 132

LISTA DE TABELAS

2.1 Modelos matemáticos existentes para a fermentação alcoólica 12

2.2 Parâmetros cinéticos dos modelos apresentados na Tab. 2.1 14

2.3 Resultados experimentais da fermentação em batelada alimentada para t_e = 3h 22

2.4 Resultados experimentais da fermentação em batelada alimentada para t_e = 4h 23

2.5 Resultados experimentais da fermentação em batelada alimentada para t_e = 5h 23

2.6 Rendimentos médios em etanol para cada experimento em batelada alimentada 27

3.1 Escalas características para a obtenção dos valores adimensionais das variáveis dos modelos para as fermentações nos processos em batelada e batelada alimentada 39

3.2 Valores dos parâmetros cinéticos do modelo adimensional e condições iniciais para a estimação dos parâmetros 42

3.3 Valores dos parâmetros cinéticos na forma dimensional e dados experimentais 43

3.4 Taxas específicas máximas de crescimento obtidas pelos resultados experimentais 44

3.5 Parâmetros estimados pelos 2 experimentos em batelada com s_0 = 154 e 180,1 g/L 51

3.6 Condições iniciais e parâmetros estimados para os experimentos em batelada alimentada na forma adimensional 56

3.7 Condições iniciais e parâmetros estimados para os experimentos em batelada alimentada na forma dimensional 56

3.8 Condições iniciais e parâmetros estimados para os experimentos em batelada alimentada para $s_F \approx 245$ g/L na forma adimensional 64

3.9 Condições iniciais e parâmetros estimados para os experimentos em batelada alimentada para $s_F \approx 245$ g/L na forma dimensional 64

3.10 Parâmetros estimados considerando os três experimentos em batelada alimentada para t_e = 5h 67

4.1 Correlações dos pares de parâmetros do modelo batelada com s_0 = 154 g/L ... 87

4.2 Correlações dos pares de parâmetros do modelo batelada alimentada com s_F = 217 g/L 88
5.1 Funções Objetivo empregadas no POD envolvendo o processo de fermentação em batelada alimentada 98
5.2 Restrições impostas no POD envolvendo o processo de fermentação em batelada alimentada 98
5.3 Estratégia de controle e índice diferencial definido por fase 105
5.4 Dados operacionais do processo em batelada alimentada utilizados no experimento, simulação e otimização 107
5.5 Resultados da fermentação, eventos e função objetivo dos perfis estudados ... 108
5.6 Comparação entre soluções ótimas obtidas com e sem restrição na produtividade 114
A.1 Resultados do experimento em Batelada com s_0 = 154 g/L 119
A.2 Resultados do experimento em Batelada com s_0 = 180,1 g/L 119
A.3 Resultados do experimento em Batelada com s_0 = 195,6 g/L 120
A.4 Resultados do experimento em Batelada Alimentada com s_F = 218,4 ± 0,1 g/L, te = 3 h 120
A.5 Resultados do experimento em Batelada Alimentada com s_F = 218,0 ± 2 g/L, t_e = 4h 121
A.6 Resultados do experimento em Batelada Alimentada com s_F = 217 ± 1 g/L, t_e = 5 h 121
A.7 Resultados do experimento em Batelada Alimentada com s_F = 245,0 ± 4 g/L, t_e = h 122
A.8 Resultados do experimento em Batelada Alimentada com s_F = 245,0 ± 3 g/L, t_e = 4h 122
A.9 Resultados do experimento em Batelada Alimentada com s_F = 241,4 ± 0,1 g/L, t_e = 5 h 123
A.10 Resultados do experimento em Batelada Alimentada com s_F = 277,0 ± 3 g/L, t_e = 3h 123
A.11 Resultados do experimento em Batelada Alimentada com s_F = 285,0 ± 4 g/L, t_e = 4h 124
A.12 Resultados do experimento em Batelada Alimentada com s_F = 285,0 ± 4 g/L, t_e = 5 h 124
1 Estratégias de cruzamento propostas por Storn e Price (1995) 133

NOMENCLATURA

D	Taxa de diluição	1/h
F	Vazão de alimentação de substrato	L/h
F_a	Vazão de alimentação de substrato adimensional	
k_i	Constante de inibição do crescimento celular pelo substrato	g/L
K_i	Constante de inibição do crescimento celular pelo substrato adimensional	
k_s	Constante de saturação para o crescimento celular	g/L
K_S	Constante de saturação para o crescimento celular adimensional	
m_s	Constante de manutenção celular	1/h
M_S	Constante de manutenção celular adimensional	
n	Potência do termo de inibição pelo produto	
p	Concentração de produto	g/L
P	Concentração de produto adimensional	
pa	Parâmetros	
p_m	Concentração de produto onde cessa o crescimento microbiano	g/L
P_{max}	Concentração de produto onde cessa o crescimento microbiano adimensional	
Q_e	Produtividade do etanol	g/h
Q_p	Produtividade do etanol	g/Lh
Q_s	Taxa inicial de adição do açúcar ao fermentador	g/h
s	Concentração de substrato	g/L
S	Concentração de substrato adimensional	
se_i	Sensibilidade paramétrica da variável de estado *y* em relação ao parâmetro pa_i ($se_i = dy/dpa_i$)	
s_F	Concentração de substrato na alimentação	g/L
S_F	Concentração de substrato na alimentação adimensional	
s_r	Concentração de substrato residual	g/L
t	Tempo da fermentação	h
t_e	Tempo de enchimento do meio no fermentador	h
T_e	Tempo de enchimento do meio no fermentador adimensional	
t_f	Tempo final da fermentação	h
t_{s1}	Tempo em que começa a fase singular	h
t_{s2}	Tempo em que termina a fase singular	h

u	Variável de controle (Vazão de alimentação de substrato)	L/h
v	Volume do meio no fermentador	L
v_T	Volume total do meio no fermentador	L
V	Volume do meio no fermentador adimensional	
x	Concentração celular	g/L
X	Concentração celular adimensional	
y	Variáveis de estado (x, s, p e v) na análise de sensibilidade	
Y	Vetor das variáveis de estado na análise de sensibilidade	
y_{ps}	Rendimento do produto com relação ao substrato	g_{et}/g_{sac}
Y_{PS}	Rendimento do produto com relação ao substrato adimensional	
y_{xs}	Rendimento das células com relação ao substrato	g_{cel}/g_{sac}
Y_{XS}	Rendimento das células com relação ao substrato adimensional	
z	Variável de estado na otimização dinâmica	

Letras gregas:

λ	Variáveis adjuntas	
μ	Taxa específica de crescimento celular	1/h
μ_a	Taxa específica de crescimento celular adimensional	
μ_m	Taxa específica máxima de crescimento celular	1/h
μ_{max}	Taxa específica máxima de crescimento celular adimensional	
ν	Taxa específica de formação de produto	1/h
ν_{max}	Taxa específica máxima de formação de produto	1/h
σ	Taxa de consumo de substrato	1/h
σ_a	Taxa de consumo de substrato adimensional	
π	Taxa de formação de produto	1/h
π_a	Taxa de formação de produto adimensional	
τ	Tempo da fermentação adimensional	

Subscritos:

0	Condição inicial
1	Condição no tempo de fermentação de 1 hora
f	Condição final
max	Valores máximos
min	Valores mínimos
et	Etanol produzido
cel	Células produzidas
sac	Sacarose consumida

RESUMO

Este trabalho apresenta um estudo teórico e experimental da otimização dinâmica da fermentação alcoólica em batelada alimentada utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* num fermentador de 5 L. Foram realizados doze experimentos, três em batelada e nove em batelada alimentada, com concentrações iniciais de sacarose na faixa de 154 a 195,6 g/L para os experimentos em batelada e na faixa de 217 a 285 g/L para os experimentos em batelada alimentada. Os tempos de enchimento do fermentador variaram de 3 a 5 horas. O volume do inóculo correspondeu a 30% do volume do fermentador com concentração de álcool igual a 4%, típica dos processos industriais.

São apresentados resultados sobre a influência do tempo de enchimento e da concentração de sacarose alimentada sobre os perfis de concentração de células, substrato e produto e sobre os rendimentos e produtividades na fermentação em batelada alimentada. A estimação dos parâmetros do modelo cinético não estruturado proposto por Tosetto (2002, Dissertação de Mestrado em Engenharia Química – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP. 82p) usando os resultados experimentais da fermentação em batelada e da fermentação em batelada alimentada, foi obtida pelo algoritmo de evolução diferencial de Storn e Price (1995, disponível em http://www.ICSI. Berkeley.edu/~storn/code.html, acesso: 13 novembro 2007). A análise de sensibilidade paramétrica e a estimativa do grau de correlação entre os parâmetros por meio da matriz de sensibilidade dos modelos foram feitas com o código DDASPK (Petzold *et al.*, 2000, Code DDASPK. Copyright. University of Califórnia, 1-206) e com a metodologia proposta por (Sanz e Voss, 2006, Advances in Water Resources, 29, 439-457) respectivamente. O modelo cinético proposto representou satisfatoriamente a fermentação em batelada alimentada apesar da alta correlação entre os parâmetros, e o Problema de Otimização Dinâmica foi formulado para um caso experimental específico que resultou na maior produção de etanol (concentração de substrato alimentado = 285 g/L e tempo de enchimento = 5 h). O perfil ótimo simulado da vazão de substrato alimentado que maximiza a produção de etanol, sujeito a restrições no volume, na vazão de alimentação e no rendimento, foi obtido pela metodologia proposta por Lobato *et al.* (2006, XXII IACChE (CIIQ) 2006 / V CAIQ AAIQ Asociación Argentina de Ingenieros Químicos IACChe - Interamerican Confederation of Chemical Engineering), que utiliza a Função Identificadora de Fases para determinar a seqüência de arcos não singulares e singulares e os tempos de transição entre as fases. O perfil ótimo é formado por uma seqüência: vazão máxima-vazão singular-vazão mínima, com tempo de fermentação de 5,11 h, definida com base na análise das condições operacionais que favoreciam o crescimento celular na fase inicial e a formação de produto na fase final, conforme indicado por Modak *et al.* (1986, Biotechnol. Bioeng., 28, 1396-1407).

Palavras-chave: Fermentação em Batelada Alimentada, Etanol, Evolução Diferencial, Sensibilidade Paramétrica, Otimização Dinâmica.

ABSTRACT

This work presents an experimental and theoretical study of the dynamic optimization of the alcoholic fermentation in fed-batch mode utilizing the *Saccharomyces cerevisiae* yeast in a bioreactor of 5 L. Twelve experiments were carried out, three them in batch and nine in fed-batch mode, with initial sucrose concentrations between 154 and 195.6 g/L for the experiments in batch and between 217 and 285 g/L for the experiments in fed-batch. The filling times for the bioreactor varied from 3 to 5 hours. The inoculum volume corresponded to 30% of the bioreactor volume with alcohol concentration like 4%, typical of the industrial processes.

The results about the influence of the filling time and of the fed sucrose concentration about the substrate, product and cells concentration profiles and about the yields and productivities in the fed-batch fermentation are presented. The estimation of the parameters of the non structured kinetic model proposed by Tosetto (2002, Dissertation in Chemical Engineering – Campinas Estadual University, Campinas-SP. 82p), using the experimental results of the batch and fed-batch fermentation, was obtained through the algorithm of differential evolution by Storn and Price (1995, available in http://www.ICSI. Berkeley.edu/~storn/code.html, access: november 13 2007). The analysis of parametric sensitivity and the estimate of the rank correlation between the parameters through the sensitivity matrix of the models were realized through the code DDASPK (Petzold *et al.*, 2000, Code DDASPK. Copyright. University of Califórnia, 1-206) and by using the methodology proposed by Sanz e Voss (2006, Advances in Water Resources, 29, 439-457) respectively. The kinetic model proposed represented satisfactorily the fermentation in fed-batch despite of the high correlation between the parameters, and the Dynamic Optimization Problem was formulated for a specific experimental case that resulted in the biggest ethanol production (fed substract concentration = 285 g/L and filling time = 5 h). The simulated optimal profile of the fed substract rate that maximizes the ethanol production, subject to constraints in the volume, in the feed rate and in the yield, was obtained by the methodology proposed by Lobato *et al.* (2006, XXII IACChE (CIIQ) 2006 / V CAIQ AAIQ Asociación Argentina de Ingenieros Químicos IACChe - Interamerican Confederation of Chemical Engineering), which utilizes the Switching Function to define the sequence of singular and non singular arcs and the switching times. The optimal profile is formed by the following sequence: minimum feed rate-singular feed rate-maximum feed rate, with time of fermentation of 5.11 h, defined on the basis of the analysis of the operational conditions that favored the cellular growth in the initial phase and the formation of product in the final phase, as indicated by Modak *et al.* (1986, Biotechnol. Bioeng., 28, 1396-1407).

Keywords: Fed-batch Fermentation, Ethanol, Differential Evolution, Parameter Sensitivity, Dynamic Optimization.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Em anos recentes, pesquisas para melhorar a produção de etanol têm aumentado por razões ecológicas e econômicas, principalmente para seu uso como uma alternativa aos combustíveis à base de petróleo. O combustível etanol pode ser produzido de duas formas: pela rota petroquímica a partir da hidratação do etileno e pela rota biotecnológica a partir da fermentação da biomassa agrícola por microrganismos. O desafio é identificar os gargalos que limitam os processos de fermentação industriais e desenvolver processos que forneçam alta produção de etanol (Alfenore *et al.*, 2004).

O Brasil é o maior exportador e segundo maior produtor de álcool, atrás apenas dos EUA que lideram a produção de álcool basicamente a partir do milho. É também o país com maior potencial de expansão da produção de biocombustíveis atualmente no mundo por ter condições privilegiadas de solo e clima para a produção em larga escala (Furtado e Scandiffio, 2006; Strapasson, 2006; Cabrini e Marjotta-Maistro, 2007). O Brasil deverá moer 468 milhões de toneladas de cana-de-açúcar para a indústria, na safra 2008/09 da região Centro-Sul, sendo que 56% serão destinadas para a produção de álcool e 44% para o açúcar. O aumento é de 12,8% em relação ao ciclo 2007/08. Esta estimativa é prevista devido às instalações de novas usinas e aumento da demanda interna (JornalCana, 2007). O Estado de São Paulo detém dois terços da produção de álcool do Brasil e 75% das exportações do produto. O plantio de cana utiliza cerca de 16% do território do Estado, o que representa 4,2 milhões de hectares (Usinas, 2007). O Estado de Minas Gerais é o terceiro produtor de cana, álcool e açúcar sendo que o Triângulo Mineiro concentra 68% da produção de cana, 79% da produção de açúcar e 61% do álcool no estado. A taxa de crescimento da produção de cana em Minas Gerais é de 8,6% ao ano, contra 4,81% da média nacional (Triângulo, 2007).

Vários países ampliaram a utilização de álcool, com destaque para os EUA, Brasil, Colômbia, Peru, Venezuela e Paraguai. O programa de combustíveis renováveis da União Européia avançou com o biodiesel. Apesar de os EUA possuírem uma demanda potencial muito maior do que sua capacidade de abastecimento atual, eles impõem tarifas para a importação de álcool. Foi o país que mais expandiu a produção de álcool, sendo que sua produção aumentou mais do que o esperado entre 2000 e 2006, ultrapassando a produção brasileira. Japão, China e Tailândia têm grande expectativa de aumento do consumo de álcool, tendo em vista os programas de implementação do uso do álcool como combustível.

O Japão é o maior importador potencial, devido basicamente à grande demanda por combustíveis renováveis, ao alto consumo de gasolina, à baixa produção de álcool e à tarifa de importação praticamente nula (Cabrini e Marjotta-Maistro, 2007).

O custo do etanol brasileiro é menor que o do petróleo e o do álcool produzido de outras biomassas, pois quando se usa cana como matéria-prima, não é necessária a conversão do amido em glicose, o que ocorre nos processos que utilizam milho (EUA) e trigo (Alemanha) como matéria-prima. Além disso, o bagaço da cana contém uma grande quantidade de energia, o que diminui o custo de produção por não requerer a queima de combustíveis fósseis (Furtado e Scandiffio, 2006).

Entre os desenvolvimentos responsáveis por ganhos na produção do etanol, estão os processos de fermentação. A escolha entre processo contínuo ou em batelada para produção de etanol por fermentação tem sido muito discutida. Tradicionalmente as destilarias e usinas brasileiras usam o sistema descontínuo ou de batelada alimentada, porém a polêmica entre processos concorrentes sempre existiu na área industrial das usinas. No Brasil, o sistema de batelada é considerado mais confiável por muitos engenheiros por apresentar sistema de assepsia mais fácil. Não há estatísticas exatas, mas os pesquisadores acreditam que o processo contínuo seja responsável pela produção de 25% a 30% do etanol fabricado no Brasil – o sistema batelada domina o mercado das operações fermentativas. Algumas usinas voltaram ao processo em batelada após alguns anos de operação contínua. Quando se faz açúcar e álcool, o sistema mais aceito pelos técnicos é o batelada (Revista Alcoolbrás, 2006). No processo em batelada convencional, se for considerado o tempo necessário para encher as dornas, este processo se compara ao batelada alimentada (Andrietta *et al.*, 2003).

Com a implantação do programa Proálcool em 1975, houve um aumento considerável da capacidade de produção das unidades industriais, assim como um aumento no volume dos fermentadores. A variável tempo passou a ter influência muito grande no processo de fermentação alcoólica. Assim, as velocidades de enchimento passaram a ter um papel importante nesse processo. Vazões muito elevadas implicam tempos de enchimento menores, que podem provocar transbordamentos do meio em fermentação devido à formação excessiva de espuma, com perdas para o processo, ou mesmo inibição do metabolismo das leveduras pelo acúmulo de substrato no meio em fermentação. Além dessas perdas, o tempo de fermentação pode aumentar, e por isso, diminuir a produtividade. Vazões muito baixas conduzem a tempos de fermentação elevados, o que ocasiona menores produtividades (Vasconcelos e Valdman, 1988).

Vasconcelos (1993) estudou a influência da variação da vazão de alimentação na produtividade e eficiência fermentativa por meio de dados obtidos em escala piloto e industrial, e destacou a importância da fase de enchimento da dorna no processo

fermentativo. Andrietta *et al.* (2003) também analisaram a interferência da velocidade de enchimento sobre a produtividade e rendimento do processo em batelada alimentada a partir de experimentos realizados em laboratório num fermentador em batelada alimentada com diferentes tempos de enchimento e vazão de alimentação constante. Os autores determinaram, ainda, por estes mesmos experimentos, os parâmetros do modelo cinético de Lee *et al.* (1983) modificado com a adição de um termo de inibição pelo substrato.

Para otimizar processos industriais em termos de concentração de etanol, produtividade e rendimento é necessária a quantificação do comportamento dinâmico do microrganismo fermentativo em condições reais. Dentre as várias etapas compreendidas na formulação de um modelo matemático a partir de um conjunto de resultados experimentais, destaca-se, pela sua dificuldade, a de obtenção dos parâmetros que melhor ajustam os dados disponíveis (Augusto *et al.*, 1994). Há muita discussão a respeito de qual processo usar: contínuo, batelada ou batelada alimentada, para estimar os parâmetros do modelo cinético da fermentação alcoólica. Pertev *et al.* (1997) estimaram parâmetros de um modelo cinético para produção de leveduras pelo processo em batelada e batelada alimentada. Pela diferença dos conjuntos de parâmetros obtidos, estes autores concluíram que os valores dos parâmetros podem mudar dependendo das condições operacionais e do tipo de processo utilizado.

A estimativa de parâmetros de modelos não estruturados, que descrevem o crescimento microbiano, é muitas vezes realizada pela fermentação contínua. Experimentos contínuos são demorados e de natureza complexa. Ao contrário, experimentos mais simples podem ser alcançados com a fermentação em batelada, o que não reduz a dificuldade de estimar os parâmetros cinéticos de um modelo de Monod clássico (Baltes *et al.*, 1994). Geralmente, um modelo cinético, estabelecido a partir de observações experimentais em batelada, é aplicado para avaliar os perfis de concentração de massa celular, substrato e produto para processos fermentativos em batelada alimentada. Entretanto, o efeito da diluição causa diferentes morfogênesis (mudanças estruturais que ocorrem durante o desenvolvimento de um organismo, órgão, ou parte dele) do microrganismo se comparado ao processo em batelada. Por outro lado, o modelo cinético estabelecido por observações experimentais em batelada alimentada pode não ser adequado para predizer os perfis de concentração para fermentação em batelada (Wang e Sheu, 2000).

Nos modelos cinéticos, pequenas variações no valor de alguns dos parâmetros podem ocasionar uma completa distorção nos resultados. A determinação qualitativa e quantitativa deste comportamento permite uma melhor compreensão dos mecanismos de fermentação propostos pelo modelo, e aponta ainda os parâmetros cuja variação é mais sentida pelo modelo e que, portanto, devem ser calculados com maior precisão (Aboutboul *et al.*, 1988). A análise de sensibilidade paramétrica de modelos algébrico-diferenciais e a correlação

entre os parâmetros, obtida pela matriz de sensibilidade, podem produzir informações usadas para estimativa de parâmetros, otimização, sensibilidade do processo e simplificação do modelo (Maly e Petzold, 1996; Sanz e Voss, 2006).

Por outro lado, a Otimização Dinâmica do Processo (POD) pode fornecer subsídios para a análise do processo com todas as suas implicações e estabelecer as condições de operação mais favoráveis. Um POD é formulado a partir do modelo matemático do processo e das restrições físicas que ele impõe (Santos *et al.*, 2005). A importância da otimização de processos em batelada alimentada está crescendo com o desenvolvimento da indústria bioquímica. Como os produtos desta indústria usualmente são caros, um pequeno aumento no rendimento pode ter um efeito considerável no processo como um todo, e leva à maximização de um índice de desempenho, usualmente o produto de interesse no final do ciclo da batelada (Palanki *et al.,* 1993; Costa, 1996; Costa *et al.*, 1998).

O presente trabalho apresenta um estudo da fermentação alcoólica em batelada alimentada abordando os seguintes itens:

- ✓ A discussão a respeito da influência das variações na velocidade de alimentação e nas concentrações de substrato alimentado sobre o processo;
- ✓ A estimativa dos parâmetros do modelo cinético não estruturado, apresentado por Tosetto (2002), a partir de experimentos em batelada e batelada alimentada, pela utilização de um método evolutivo;
- ✓ O estudo da análise de sensibilidade e correlação entre os parâmetros do modelo, realizado utilizando o código DDASPK (Petzold *et al.*, 2000);
- ✓ A formulação do problema de otimização dinâmica para determinar o perfil ótimo de alimentação de substrato que maximiza a produção de etanol, pela determinação da seqüência de arcos não singulares e singulares e dos tempos nos quais ocorre a transição entre eles, obtidos a partir de uma metodologia proposta por Lobato (2006) que calcula a Função Identificadora de Fases.

CAPÍTULO 2

FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM BATELADA ALIMENTADA

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Processos Fermentativos

O processo descontínuo ou batelada simples é o mais seguro quando se tem problemas de manutenção e de assepsia, pois ao final de cada batelada o reator deve ser esterilizado juntamente com o novo meio de cultura, recebendo um novo inóculo que deverá ser submetido a todos os controles necessários para assegurar a presença única do microrganismo desejado para o processo (Schmidell e Facciotti, 2001). Além de menores riscos de contaminação, este processo apresenta grande flexibilidade de operação, devido ao fato de poder utilizar os fermentadores para a fabricação de diferentes produtos e melhor condição de controle com relação à estabilidade genética do microrganismo. A fermentação descontínua pode levar a baixos rendimentos e produtividades, quando o substrato adicionado de uma só vez no início da fermentação exerce efeitos de inibição, repressão ou desvia o metabolismo celular a produtos que não interessam (Carvalho e Sato, 2001a). O processo em batelada é muito utilizado como base para as comparações de eficiências atingidas com relação aos outros processos, mas a sua baixa eficiência estimula o surgimento de formas alternativas (Schmidell e Facciotti, 2001).

O processo contínuo caracteriza-se por possuir uma alimentação contínua do meio de cultura a uma determinada vazão, sendo o volume de reação mantido constante pela retirada contínua de caldo fermentado (Facciotti, 2001). Várias indústrias utilizam processos contínuos na produção de etanol, que bem operados levam a uma maior produtividade, porém com custos iniciais e de operação muito maiores, exigindo sistemas de controle mais sofisticados. Além disso, a fermentação contínua é um processo que requer maior conhecimento do comportamento do microrganismo em relação ao meio ambiente onde ele atua. Fatores como pH, temperatura, concentrações de sacarose, etanol e biomassa e viabilidade celular, dentre outros, influenciam na produtividade do sistema, exigindo maior controle sobre o processo (Atala *et al.*, 2000). Nos processos de fermentação contínuos têm sido verificadas mutações nas células das leveduras, não só de comportamento fermentativo, como também relacionado às suas características genéticas (Finguerut, 2005).

Os processos em batelada alimentada, também conhecidos como *Melle-Boinot*, têm se mostrado eficientes e versáteis na grande maioria dos processos fermentativos, inclusive nos de fermentação alcoólica. Além de menores riscos de contaminação, este processo apresenta grande flexibilidade de operação, por permitir a utilização dos fermentadores para a fabricação de diferentes produtos, pela possibilidade de realizar fases sucessivas no mesmo recipiente, pelo controle mais estreito da estabilidade genética do microrganismo e pela capacidade de identificar todos os materiais relacionados quando se está desenvolvendo um determinado lote de produto (Carvalho e Sato, 2001a). Em tais processos, especialmente naqueles com altas densidades celulares, a produtividade é alta devido ao grande número de células viáveis no meio em fermentação. A batelada alimentada permite o controle da concentração de açúcar, minimizando os efeitos de inibição pelo substrato e permitindo a adição do mesmo nos momentos mais propícios durante a fermentação (Mcneil e Harvey, 1990). A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo, e a adição de mosto pode ser de forma contínua ou intermitente. Devido à flexibilidade de utilização de diferentes vazões de enchimento dos reatores com meio nutriente, é possível controlar a concentração de substrato no fermentador, de modo que o metabolismo microbiano seja deslocado para uma determinada via metabólica, levando ao acúmulo de um produto específico (Carvalho e Sato, 2001b). É possível trabalhar com altas concentrações de substrato, o que leva ao acréscimo da produtividade do etanol e à diminuição da quantidade de vinhaça produzida e do volume necessário de reatores (Impe Van *et al.*, 1994; Queinnec e Dahhou, 1994).

2.1.2 Microrganismos da Fermentação Alcoólica

De forma simplificada, a estequiometria da fermentação alcoólica é representada como segue:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow \text{fermentação} \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 \qquad 54\ \text{kcal/mol} \qquad (2.1)$$

Os principais microrganismos utilizados na produção de etanol correspondem aos fungos (leveduras) e algumas bactérias. Vários estudos relacionados com a melhoria das características da levedura ou com o processo de produção têm sido apresentados na literatura, com o objetivo de aumentar o rendimento e a produtividade de processos fermentativos. Estes estudos incluem a utilização de novas cepas de microrganismos, mudanças na composição e concentração de nutrientes do meio de cultura e reciclagem de resíduos (Navarro *et al.*, 2000). As do gênero *Saccharomyces* são as mais utilizadas e apresentam-se normalmente na forma unicelular e com 2 a 8 micrômetros de diâmetro. A

transformação da sacarose em etanol e CO_2 por essas leveduras envolve 12 reações em seqüência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Tal aparato enzimático está confinado no citoplasma celular, sendo, portanto, nessa região da célula que a fermentação alcoólica se processa (Lima *et al.*, 2001).

As leveduras *S. cerevisiae* são microrganismos de alta eficiência fermentativa. Este fato tem permitido a seleção de cepas industriais com características adquiridas que as tornam produtores superiores de etanol, mais tolerantes aos produtos da fermentação. As constantes mudanças ambientais às quais as leveduras industriais são expostas conduzem a diferentes composições do meio no processo de produção de etanol. Tais mudanças incluem a temperatura, acúmulo de etanol ao longo do processo, concentração de solutos, força iônica do meio e óxidos reativos. Além disso, toxinas no meio de cultivo como furfural e o hidroximetilfurfural, o ácido acético e fenóis que aumentam pela hidrólise da hemicelulose dos resíduos, podem também limitar a fermentação. Garay-Arroyo e Covarrubias (2004) comparam as habilidades de diferentes cepas de *S. cerevisae*, adaptadas a ambientes industriais ou em laboratórios controlados, em tolerar as várias condições de estresse indicadas anteriormente.

Segundo Birck e Walker (2000), os íons magnésio têm um efeito de diminuir a mortalidade de células de *Saccharomyces cerevisiae* devido ao efeito tóxico do etanol quando em altas concentrações. Os íons magnésio atuam no microrganismo protegendo a superfície celular e reprimindo o estresse da biossíntese de proteínas. Assim, torna-se interessante avaliar o efeito dos íons magnésio frente à fermentação alcoólica, utilizando-se altas concentrações de substrato.

O comportamento dinâmico da levedura *S. cerevisiae* CBS8066 foi estudado por Alfenore *et al.* (2004) sobre diferentes condições de aeração numa faixa de concentração de etanol acima de 147 g/L. Para este propósito, fermentações em batelada alimentada com ou sem limitação de oxigênio foram comparadas em termos de crescimento, formação de etanol e subprodutos; e viabilidade celular. As fermentações foram realizadas num fermentador de 20 L, com a temperatura regulada em 30 °C, e pH igual a 4, além da adição de 14% (v/v) da solução de amônia. Estes autores observaram que a alimentação de nutrientes e as estratégias de aeração agiram como fatores determinantes na fermentação com alta concentração de etanol. Os resultados obtidos se mostraram importantes na prática para o desenvolvimento de processos de fermentação com alta produção de etanol e alta densidade celular, onde é crucial o controle da produção de biomassa, viabilidade celular, produção de etanol e minimização de subprodutos.

Dentre as outras leveduras, também utilizadas na produção de etanol, estão as dos gêneros *Kluyveromyces* e *Candida.* Yanase *et al.* (2004) estudaram microorganismos recombinantes que podem produzir etanol a partir de pentose pela introdução de enzimas

(que metabolizam pentose) em microrganismos que pertencem ao gênero *Zymobacter* os quais naturalmente não metabolizam este tipo de substrato. Jamai *et al.* (2007) estudaram a viabilidade de produzir etanol a partir de glicose pela espécie de levedura *Candida tropicalis* quando as células estão livres ou imobilizadas em alginato de cálcio, avaliando sua habilidade em tolerar e decompor fenóis e polifenóis em concentrações altamente tóxicas. Elas não exigem a etapa de sacarificação, sendo indicadas para a produção de biocombustíveis a partir de fontes renováveis. Ozmihci e Kargi (2007) utilizaram uma cultura pura de *Kluyveromices marxianus* (DSMZ 7239) em cinco ciclos repetidos de operações batelada alimentada para produção de etanol a partir da solução do pó de soro de queijo. O coeficiente de rendimento em células (y_{xs}) diminuiu com o aumento do conteúdo de açúcar alimentado devido a efeitos adversos das altas concentrações de açúcar. O coeficiente de rendimento em etanol (y_{ps}) foi quase constante para as concentrações de açúcar alimentado abaixo de 150 g/L, e diminuiu para concentração de 200 g/L devido à alta pressão osmótica e à manutenção a altas concentrações de açúcar.

Com relação ao emprego de bactérias na produção de etanol, merece destaque a espécie *Zymomonas mobilis.* Segundo Bai *et al.* (2008), a bactéria *Z. mobilis* tem sido intensamente estudada nos últimos 30 anos e vários pesquisadores a colocam como alternativa para substituição da levedura *S. cerevisae*, devido às suas "características superiores" como: rendimento de etanol de 97% do rendimento teórico a partir da glicose contra 93% alcançado pela levedura *S. cerevisae*; menor produção de biomassa e mais carbono destinado à fermentação; fluxo metabólico de glicose superior (Lin e Tanaka, 2006; Bai *et al.*, 2008). Apesar destas vantagens tão evidentes, a bactéria *Z. mobilis* não é apropriada para a produção industrial de etanol devido ao espectro de substrato muito restrito de somente 3 açúcares (D-glicose, D-frutose e sacarose); seu crescimento em sacarose é acompanhado pela formação extracelular de oligômeros de frutose e sorbitol provocando a diminuição significativa do rendimento de etanol; ela não é apropriada para a produção de etanol a partir de materiais celulósicos; sua biomassa não é aceita para uso como alimentação animal, gerando problemas para a sua destinação; a fermentação contínua com a espécie *Z. mobilis* tende a ser oscilatória, o que pode provocar o aumento do açúcar residual médio. Nos vários estudos que têm sido publicados recentemente sobre a fermentação com a bactéria *Z. mobilis*, a única fonte de carbono utilizada tem sido a glicose e como ela suporta temperaturas maiores do que a levedura *S. cerevisae*, o impacto da temperatura sobre a cinética tem sido avaliado. Nos estudos de otimização de processos fermentativos, a literatura demonstra que tem se aplicado mais a cinética da fermentação com a bactéria *Z. mobilis* do que com a levedura *S. cerevisiae*, mas esta bactéria não é economicamente competitiva com a levedura *S. cerevisae* e a possibilidade de seu emprego generalizado nas indústrias, especialmente no Brasil, ainda é muito pequena.

2.1.3 Cinética da Fermentação Alcoólica

A cinética da fermentação alcoólica é um assunto de interesse dos centros de pesquisa especializados, tendo em vista seu potencial industrial e econômico (Lima e Marcondes, 2002). O objetivo básico do estudo da cinética de processos microbianos é quantificar as taxas de crescimento celular, de consumo de substrato, de formação de produtos e demais parâmetros relacionados (Viegas, 2003). A complexidade da descrição cinética que é requerida e apropriada depende das situações físicas e da aplicação pretendida. Não é possível a formulação de um modelo que inclua todas as características e detalhes celulares (Stremel, 2001). Os modelos cinéticos normalmente usados em fermentações podem ser divididos em (Bailey e Ollis, 1986):

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

O tipo de modelo mais encontrado na literatura para descrever a fermentação alcoólica é do tipo não-estruturado e não-segregado. A equação mais simples e popular para descrever o crescimento microbiano é a equação de Monod, que considera a presença de substrato como limitante para o crescimento (Han e Levenspiel, 1988). A cinética de Monod está apresentada na Tab 2.1, pela Eq. 2.2 e é aplicável somente quando não ocorre a presença de produtos metabólicos tóxicos (Luong, 1985).

Entretanto, segundo Thatipamala *et al*. (1992), na fermentação alcoólica o rendimento de biomassa com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* diminui de 0,156 para 0,026 com o aumento da concentração de etanol de 0 a 107 g/L, indicando uma relação entre o rendimento da biomassa e a inibição pelo produto. Estes autores propuseram um modelo para representar a diminuição do rendimento da biomassa (y_{xs}) com o aumento das concentrações iniciais de etanol e de substrato e a diminuição da taxa de crescimento específico com o aumento da concentração inicial de substrato. Foi considerado um modelo específico para a fase *Lag* e observaram experimentalmente que a inibição pelo substrato afetou mais o rendimento em etanol do que a inibição pelo produto, por provocar a diminuição da viabilidade celular. Observaram ainda que a fase *Lag* aumentou com o aumento da concentração inicial de substrato.

A inibição do crescimento celular devido à concentração de etanol é evidenciada acima de 15 g/L. A concentração máxima de etanol permitida, acima da qual as células não crescem, foi predita em 112 g/L. A capacidade de produção de etanol em que as células são completamente inibidas foi de 115 g/L de etanol (Luong, 1985; Ferreira, 1998). Além da inibição provocada pela presença de etanol, outro fator a ser avaliado é a limitação relacionada ao crescimento microbiano ao substrato ou mesmo a outras substâncias presentes no meio (Han e Levenspiel, 1988). A inibição pelo substrato desativa importantes enzimas, além de modificar o caminho metabólico que é vital à sobrevivência da levedura. O efeito inibidor provocado pelo substrato na fermentação alcoólica ocorre quando a concentração supera 150 g/L (Thatipamala *et al.*, 1992).

A fermentação alcoólica é também afetada pela temperatura do biorreator, onde o rendimento alcoólico é maior em temperaturas mais baixas, 15ºC a 20ºC, porém apresentam uma demora para obtenção da população máxima. Quando a temperatura no biorreator é de 25ºC a 30ºC a taxa inicial de fermentação é maior e a temperaturas superiores a 35ºC decresce a viabilidade celular (Torija *et al.*, 2003) e podem ocorrer perdas e contaminações. O intervalo de temperatura usual em indústrias é de 31 a 33 ºC (Amorim, 2005).

Um modelo para a produção de etanol a partir de uma mistura de glicose e maltose foi proposto por Lee *et al.* (1995), que incluiu um termo representando o efeito de repressão da glicose no consumo de maltose. Ferreira *et al.* (1998) estimaram os parâmetros do modelo cinético de Andrews, citado por Luong (1987), considerando concentrações iniciais de substrato na faixa de 5 a 190 g/l, por meio de experimentos num reator em batelada usando *Saccharomyces cerevisiae*. Barba *et al.* (2001) estimaram os parâmetros do modelo de crescimento para a fermentação de soro usando *K. lactis* por meio de experimentos em batelada e batelada alimentada. Os dados experimentais de dois testes em batelada e os pontos experimentais da fase batelada do teste em batelada alimentada foram utilizados para a estimação dos parâmetros. O modelo foi validado pelo experimento em batelada alimentada.

Tosetto (2002) analisou o comportamento cinético da cepa de levedura Y904 em nove diferentes matérias-primas provenientes de unidades produtoras de açúcar e álcool. Foram estudadas as cinéticas de produção de etanol, células e de consumo de substrato, assim como o desempenho da cepa em cada matéria-prima com relação à produtividade e rendimento em etanol. Para a avaliação cinética, foram utilizados seis modelos do tipo não estruturado. Os que mais se adequaram aos dados experimentais, com a utilização de um único substrato e concentrações iniciais de sacarose entre 150 e 190 g/L, foram os modelos de Ghose e Thyagi (1979), com o parâmetro *n* diferente de um, e o de Jin *et al.* (*apud* Tosetto, 2002). Em todos os ensaios realizados, observou-se que a velocidade específica de produção de etanol esteve vinculada à velocidade específica de crescimento microbiano até

determinada fase da fermentação. Após esta fase, a diminuição da velocidade de crescimento microbiano não causou a diminuição da velocidade específica de produção de etanol, mostrando que as mesmas não estão mais associadas. Vasconcelos *et al.* (1992) testaram dez modelos cinéticos para o processo de fermentação alcoólica industrial em batelada alimentada, com vazão variável de alimentação e reciclo do microrganismo agente da fermentação (*S. cerevisiae*). Foram realizados vinte e dois ensaios experimentais na destilaria anexa à Usina Seresta – AL, utilizando mosto de caldo de cana-de-açúcar. O volume de operação dos fermentadores foi de aproximadamente 145.000 litros. Os autores concluíram que o modelo o qual considerou a inibição pelo produto na forma parabólica, foi o que apresentou os melhores ajustes dos resultados experimentais.

Os resultados experimentais do processo simultâneo de sacarificação e fermentação de bagaço a etanol usando uma cepa recombinante *S. cerevisiae* YPB-G foram avaliados por Kroumov *et al.* (2006) para desenvolver um modelo não estruturado de nível bi-hierárquico. O desenvolvimento do modelo incluiu uma aplicação da metodologia de análise da superfície de resposta para avaliar os parâmetros chave dos modelos cinéticos e analisar a taxa de síntese de enzimas amilolíticas.

Lakana *et al.* (2007) utilizaram sorgo suplementado com 0,5% de sulfato de amônia como substrato para a produção de etanol por *S. cerevisiae* TISTR 5048 pelo processo em batelada e em batelada alimentada. Os autores verificaram que na fermentação em batelada quanto maiores as concentrações de substrato, maiores as concentrações de produto, o rendimento y_{ps} e o tempo de fermentação, e que os parâmetros cinéticos são dependentes da concentração inicial de células e de açúcar. Para a fermentação em batelada alimentada, foi determinada a estratégia ótima de alimentação de substrato, e concluiram que a quantidade de açúcares totais consumida no final dos experimentos foi similar para os dois processos, enquanto a concentração máxima de etanol e o rendimento de etanol no processo em batelada foram inferiores com relação ao processo em batelada alimentada. Entretanto a produtividade foi menor no processo em batelada alimentada.

Embora o efeito de inibição pelo etanol seja considerado nos modelos do tipo Aiba, estes modelos prevêem que a concentração de etanol pode tender a valores infinitos antes que o crescimento celular seja completamente inibido, o que parece pouco razoável. Por outro lado, quando a fermentação contínua de etanol é operada a uma baixa taxa de diluição, e especialmente no caso onde a concentração de açúcar do meio é baixa, a concentração de açúcar limitante pode não ser detectável. Nestas condições, as taxas específicas para crescimento celular e produção de etanol seriam nulas, o que também não é correto, uma vez que o meio com células e etanol na prática é continuamente produzido. Portanto, apesar destes modelos serem amplamente citados na literatura desde que foram propostos, pouca discussão tem sido feita quanto a estas inconsistências estruturais. Bai *et al.* (2008)

discutem a carência claramente demonstrada nos estudos publicados sobre o tema: as equações cinéticas são restritas a faixas de validade muito estreitas e distantes das encontradas no processo industrial; os parâmetros cinéticos estimados demonstram forte correlação e não são estatisticamente tratados e poucos estudos tratam do efeito da temperatura sobre estes modelos.

A Tab. 2.1 apresenta vários modelos da cinética da fermentação alcoólica formulados por diversos autores considerando os efeitos inibitórios.

Tabela 2.1 - Modelos matemáticos existentes para a fermentação alcoólica.

Referência	Modelo	Nº Eq.
Sem inibição (*Monod*)	$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s}$	2.2
Aiba et al., 1968	$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s} exp(-k_1 \times p)$	2.3
	$v = v_{max} \frac{s}{k'_s + s} exp(-k_2 \times p)$	2.4
Aiba et al., 1969	$\mu = \frac{\mu_m}{1 + p/k_p} \frac{s}{k_s + s}$	2.5
	$v = \frac{v_{max}}{1 + p/k'_p} \frac{s}{k'_s + s}$	2.6
Ghose e Thyagi, 1979	$\mu = \mu_m \frac{s}{s + k_s + s^2/k_i} \left(1 - \frac{p}{p_{max}}\right)$	2.7
Levenspiel, 1980	$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s} \left(1 - \frac{p}{p_{max}}\right)^n$	2.8
Hoppe e *Hansford,* 1982; *apud Gòdia et al.,* 1988	$\mu = \mu_m \frac{k_p}{k_p + p} \frac{s}{k_s + s}$	2.9
	$v = v_{max} \frac{k'_p}{k'_p + p} \frac{s}{k'_s + s}$	2.10
*Lee et al.,*1983	$\mu = \mu_m \left(\frac{s}{k_s + s}\right) \left(1 - \frac{p}{p_{max}}\right)^n \left(1 - \frac{x}{x_{max}}\right)^m$	2.11
Sevely et al., 1980*; apud Dourado,* 1987	$\mu = \mu_m \left(\frac{s}{k_s + s}\right) \left(\frac{k_p}{p + k_p}\right) \left(1 - \frac{p}{p_{max}}\right)$	2.12
Jin et al., 1981; *apud Dourado,* 1987	$\mu = \mu_m exp(-k_1 p - k_2 s) \left(\frac{s}{k_s + s}\right)$	2.13
Han e *Levenspiel*, 1988	$\mu = \mu_m \left(\frac{s}{k_s (1 - I/I_{max})^m + s}\right) \left(1 - \frac{I}{I_{max}}\right)^n$	2.14

Continuação da Tabela 2.1

Andrews e *Noack*	*apud Han e Levenspiel,* 1988	$\mu = \mu_m \left(\frac{1}{1 + k_s/s + s/k_i} \right)$	2.15
Webb		$\mu = \mu_m \frac{s(1 + ks/k'_s)}{k_s + s + s^2/k'_s}$	2.16
Yano et al.		$\mu = \mu_m \frac{1}{1 + k_s/s + \sum_j (s/k_i)^j}$	2.17
Teissier-type		$\mu = \mu_m [exp(-s/k_i) - exp(-s/k_s)]$	2.18
Webb		$\mu = \mu_m \frac{s}{s + k_s(1 + \sigma/k_i)} exp(1{,}17\sigma)$	2.19*
Wayman e *Tseng,* 1976		$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s}, s < s'$	2.20
		$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s} - k_i(s - s'), s > s'$	2.21
Dagley e *Hinshelwood*		$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s}(1 - kp)$	2.22
Holzberg et al.		$\mu = \mu_m - k(p - k_i)$	2.23
Jerusalimsky e *Neronova*		$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s} \frac{k_i}{k_i + p}$	2.24
Bazua e *Wilke,*1977		$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{p}{p_{max}}\right)^{0,5} \frac{s}{k_s + s}$	2.25
Aboutboul et al., 1988		$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s + s^2/k_i} exp(-k_p p)$	2.26
		$v = v_{max} \frac{s}{k'_s + s + s^2/k'_i} exp(-k'_p p)$	2.27
Thatipamala et al., 1992		$\mu = \mu_m \left(1 - \frac{p}{p_{max}}\right)^n$	2.28
		$\mu = \mu_m \left(\frac{s_{max} - s}{s_{max} - s_{min}} \right)$	2.29
Andrews, 1968		$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s + s^2/k_i}$	2.30
Stepanova e Romanovskii, 1965		$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s + s^2/k_i} \left(\frac{k_p}{k_p + s} \right)$	2.31
Han e *Levenspiel*, 1987; *apud Ferreira,* 1998		$\mu = \mu_m \left(\frac{s}{k_s + s} \right) \left(1 - \frac{s}{s_{max}}\right)^m \left(1 - \frac{p}{p_{max}}\right)^n$	2.32
Aiba et al., 1968, acoplado ao de *Edwards*, 1987; *apud Ferreira,* 1998		$\mu = \mu_m \frac{s}{k_s + s} exp\left[-(k_1 s + k_2 p)\right]$	2.33

*σ é a força iônica.

Continuação da Tabela 2.1

Wang e *Sheu* , 2000	$\mu = \mu_m \dfrac{s}{k_s + s + s^2/k_i} \dfrac{k_p}{k_p + p + p^2/k_1}$	2.34
	$\nu = \nu_{max} \dfrac{s}{k'_s + s + s^2/k'_i} \dfrac{k'_p}{k'_p + p + p^2/k'_1}$	2.35
Tosetto, 2002	$\mu = \mu_m \dfrac{s}{s + k_s + s^2/k_i} \left(1 - \dfrac{p}{p_{max}}\right)^n$	2.36
Andrietta et al., 2003	$\mu = \mu_m \left(\dfrac{s}{k_s + s + s^2/k_i}\right)\left(1 - \dfrac{p}{p_{max}}\right)^n \left(1 - \dfrac{x}{x_{max}}\right)^m$	2.37

A multiplicidade de modelos cinéticos que descrevem o crescimento microbiano é devido ao fato destes serem construídos para uma levedura específica, em condições experimentais pré-definidas (Dourado *et al.*, 1987). Alguns modelos cinéticos com aproximação convencional baseada na cinética de Michaelis-Menten, exibidos na Tab. 2.1, possuem constantes cinéticas com valores específicos apresentados pelos seus autores, de acordo com os experimentos feitos por eles, apresentados na Tab. 2.2.

Tabela 2.2 - Parâmetros cinéticos dos modelos apresentados na Tab 2.1.

Nº Eq.	μ_m / ν_{max} (1/h)	k_s /k'_s (g/L)	p_{max} (g/L)	x_{max} (g/L)	s_{max} (g/L)	n (----)	m (----)	k_i /k'_i (g/L)	k_p /k'_p (g/L)	k_1 /k'_1 (L/g)	k_2 (L/g)
2.3	0,408	0,22	-	-	-	-	-	-	-	0,016/0,028	-
2.4	1,0	0,44	-	-	-	-	-	-	-	-	0,029/0,015
2.5	0,408	0,22	-	-	-	-	-	-	16/55*	-	-
2.6	1,0	0,44	-	-	-	-	-	-	71,5/12,5*	-	-
2.7	0,40	0,48	87	-	-	1	-	203,49	-	-	-
2.8	0,42	0,222	87,5	-	-	0,41	-	-	-	-	-
2.9**	0,713	0,297	-	-	-	-	-	-	2,005	-	-
2.10**	1,385	1,925	-	-	-	-	-	-	7,1425	-	-
2.11	0,24	1,6	90	100	-	1	1	-	-	-	-
2.12	0,3	5	85	-	-	1	-	-	4,5	-	-
2.13	0,453	0,22	-	-	-	-	-	-	-	0,06035	0,0055
2.14	0,448	0,2355	83,57	-	-	0,304	0	-	-	-	-
2.15	0,117	30	-	-	700	1,82	66,8	-	-	-	-
2.26	0,46	5,6	-	-	-	-	-	620	0,033	-	-
2.27	2,3	9,6	-	-	-	-	-	480	0,024	-	-
2.28	0,46	-	106,9	-	-	1,958	-	-	-	-	-
2.29	0,46	-	S_{min} = 150		330	-	-	-	-	-	-
2.30	0,3	2,5	-	-	-	-	-	100	-	-	-
2.31	0,3	2,5	-	-	-	-	-	100	10	-	-
2.32	0,3052	2,3156	115	-	300	2,954	1,877	-	-	-	-
2.33	0,3052	2,3156	-	-	-	-	-	-	-	0,0080	0,0280
2.34	0,9819	2,3349	-	-	-	-	-	213,589	27,9036	41,2979	-
2.35	2,3507	7,3097	-	-	-	-	-	5759,10	252,306	15,2430	-
2.36#	0,5	21	85,5	-	-	0,9	-	10,5	-	-	-
2.36#	0,5	21	88	-	-	0,7	-	15,5	-	-	-
2.37	0,45	5	93	90	-	2	1,4	42	-	-	-

* Batelada/contínuo

** Média de 4 parâmetros obtidos a 4 diferentes S_0.

A primeira linha são os parâmetros estimados a partir de um meio sintético, e a segunda linha, a partir do mel da Usina Alvorada – MG.

Diversos fatores como a evaporação e perdas do processo, adição de soluções de ácidos e bases para o controle do pH, adição de antiespumante, produção de substâncias que mudam o volume do meio, crescimento celular, entre outros, podem afetar significativamente as várias concentrações e, consequentemente, os valores dos parâmetros calculados. O volume de biomassa no meio fermentativo, por exemplo, pode apresentar efeitos sobre os valores dos rendimentos, eficiências, produtividades, taxas de consumo e produção, calculados a partir das concentrações de substrato e de produto medidas em experimentos. Borzani (2003) propõe correções que consideram tal efeito nos processos em batelada.

Apesar dos vários trabalhos que tratam da cinética de fermentação, pouca influência estes tiveram sobre o arranjo das plantas industriais instaladas no Brasil. No entanto, o projeto rigoroso de uma planta de fermentação tem que passar, obrigatoriamente, por uma modelagem detalhada do processo, pelo uso de modelos cinéticos precisos que possibilitam a obtenção de condições ótimas de operação. Por outro lado, a manutenção destas condições dependerá da escolha de uma estratégia de controle adequada que só é possível conhecendo-se o comportamento do processo. Isto pode ser adequadamente realizado pelo estudo prévio de modelagem da planta e simulação em computador (Andrietta, 1994).

Com base na revisão bibliográfica e informações industriais, foi levantado que:

- ✓ o processo de fermentação em batelada alimentada apresenta menores riscos de contaminação, maior flexibilidade de operação, e controle da concentração de substrato no fermentador (diminui os efeitos inibitórios desfavoráveis à produção de etanol) quando comparado aos processos contínuo e batelada convencional;
- ✓ as leveduras *S. cerevisiae* são microrganismos de alta eficiência fermentativa, sendo que algumas cepas industriais, com características diferenciadas, são mais tolerantes aos produtos da fermentação. Apesar de haver outros microrganismos que apresentam alta eficiência fermentativa, a possibilidade de empregá-los em indústrias, principalmente no Brasil, ainda é muito pequena;
- ✓ considerando os modelos cinéticos apresentados, o modelo de Ghose e Thyagi (1979) modificado por Tosetto (2002), que considera inibições pelo substrato e pelo produto, descreveu adequadamente as fermentações conduzidas em algumas indústrias brasileiras quando comparado a outros modelos apesar dos parâmetros não terem apresentado significado físico.

Em virtude destes fatores, o processo de fermentação alcoólica em batelada alimentada pela levedura *S. cerevisiae* foi escolhido como objeto de estudo no presente trabalho. O desempenho do processo em batelada alimentada devido à variação do tempo de enchimento e da concentração de sacarose na alimentação foi avaliado por meio da produção de etanol, do rendimento e da produtividade. No Capítulo 3 será apresentado o

desenvolvimento do modelo cinético para as fermentações em batelada e batelada alimentada utilizando o modelo de Ghose e Thyagi (1979) considerando a potência do termo de inibição pelo produto diferente de 1 (Tosetto, 2002).

2.2 Materiais e Métodos

2.2.1 Cultura e Meio

As fermentações foram preparadas de tal forma que as condições das mesmas fossem próximas às condições industriais.

A cepa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904, cedida pela MAURI (Mauri Brasil Ind. Com. e Imp. Ltda – Pederneiras, SP), foi o microrganismo utilizado neste estudo.

A composição do meio de cultivo consistiu de sacarose (açúcar cristal Caeté – Usina Caeté S.A. – Conceição das Alagoas, MG) na faixa de 217,0 a 285 g/L; KH_2PO_4, 5 g/L; $MgSO_4.7H_2O$, 1 g/L; NH_4Cl, 5 g/L; KCl, 1 g/L; e extrato de levedura, 6 g/L.

Antes de iniciar os experimentos a quantidade de sacarose no açúcar comercial, igual a 98%, foi determinada por um teste enzimático colorimétrico. Dessa forma, a medida do açúcar foi corrigida para se obter a quantidade adequada de sacarose. Mesmo considerando a pureza do açúcar comercial, perdas na fase de filtração e na manipulação da solução de açúcar resultaram em alguns experimentos com concentrações de sacarose um pouco menor.

2.2.2 Procedimento e Configuração Experimental

As fermentações foram realizadas em um fermentador Bioflo 110 (New Brunswick Scientific CO., NJ, USA) com volume total de 5,000 ± 0,006 L, com mesmo volume de trabalho (Fig. 2.1). O volume do inóculo foi de 1,500 ± 0,003 L (30% do volume total), o qual continha aproximadamente 150 g do fermento biológico (hidratado previamente com 500mL de água destilada por 50 minutos), 60,0 ± 0,5 mL de etanol (4% do volume do inóculo) e o restante, água destilada. Inicialmente não havia substrato no inóculo (s_0 = 0 g/L). A temperatura da fermentação foi mantida a 32 ± 0,1 ºC, e o pH do meio em 4,50 ± 0,01 (corrigido apenas antes do início das fermentações, pela adição de uma solução de H_2SO_4). Até o volume total do meio atingir 5,000 ± 0,006 L, a agitação foi de 150 ± 1 rpm para evitar a formação excessiva de espuma. Depois, prosseguiu-se na forma em batelada com agitação de 200 ± 1 rpm até a concentração de sacarose estar próxima a 1 g/L. Ao volume inicial do inóculo foram acrescidos 3,500 ± 0,004 L do meio de alimentação com tempos de

enchimento de 3, 4 e 5 horas. Foram realizados nove experimentos em batelada alimentada, variando as concentrações de substrato do meio alimentado (s_F) e os tempos de enchimento do fermentador (t_e). O volume do meio aumentou linearmente com o tempo, de acordo com a Eq. 2.38:

$$v = v_0 + Ft \tag{2.38}$$

em que v_0 é o volume inicial (1,5 L) e F é a taxa de alimentação de substrato.

Figura 2.1 – Configuração do fermentador para o experimento em batelada alimentada.

2.2.3 Métodos Analíticos

As fermentações foram acompanhadas ao longo do tempo pelas medidas das concentrações de substrato, de células e de produto, retirando-se de hora em hora uma amostra de 35 mL, a qual era centrifugada por 6 min a 15.000 rpm. Do sobrenadante foram analisadas as concentrações de substrato e produto, e do sedimento, a concentração celular.

a) Determinação da concentração de biomassa

Para determinar a concentração de biomassa, o sedimento celular foi lavado três vezes com água destilada, transferido pela diluição com o mínimo de água para uma placa previamente tarada, e depois, seco em estufa a 85 ºC até peso constante. O valor da massa seca foi obtido pela diferença de peso da placa (Steckelberg, 2001).

b) Determinação da concentração de sacarose

A sacarose foi determinada indiretamente pela análise de glicose. Uma alíquota de 1 mL de sobrenadante foi hidrolisada com 1 mL de HCl 2N a 67,5 ºC, e depois neutralizada com 3 mL de NaOH 1N. A concentração de glicose foi medida por um teste enzimático colorimétrico (Kit Bioclin. Glicose Líquido Estável. Quibasa – Química Básica – Belo Horizonte/MG) no qual a glicose é oxidada pela glicose-oxidase produzindo peróxido de hidrogênio, que em presença da peroxidase reage com a 4-aminoantipirina e fenol, formando um cromógeno vermelho cereja cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose. Para isso, adicionou-se 20 µL da amostra hidrolisada e corretamente diluída em um tubo de ensaio com 2 mL do reativo de cor, e levou ao banho-maria por 10 min a 37 ºC. Em seguida, o tubo foi resfriado à temperatura ambiente, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 500 nm e comparada com uma curva padrão (Apêndice B.1).

c) Determinação da concentração de álcool

O método espectrofotométrico para a determinação de teores alcoólicos se baseia na oxidação do etanol a ácido acético pela reação com dicromato de potássio em meio ácido. A solução adquire uma tonalidade verde proporcional à concentração de álcool na amostra, possibilitando a leitura em espectrofotômetro (Steckelberg, 2001). Antes de iniciar os testes para quantificar o etanol produzido na fermentação, colocou-se 25 mL do sobrenadante em um balão volumétrico e acrescentou-se 50 mL de água destilada. Esta nova solução foi destilada, para evitar subprodutos interferentes, e recolhido 50 mL de destilado num erlenmeyer, que foi diluído na proporção de 1:25. Em um tubo de ensaio transferiu-se 5 mL do destilado diluído, acrescentou-se 2 mL de água destilada, juntamente com 2 mL do reagente de cor. O tubo foi colocado em banho-maria na temperatura de 60ºC por 30 minutos, resfriado à temperatura ambiente e a absorbância lida em espectrofotômetro a 600 nm. Os valores obtidos foram comparados com uma curva padrão (Apêndice B.2).

2.3 Resultados e Discussões

As estimativas dos erros experimentais para as concentrações de substrato (s) e produto (p) foram calculadas pelo desvio padrão de um conjunto de 3 amostras para o substrato e 2 amostras para o produto.

Como a análise da concentração de biomassa ao longo da fermentação foi feita a partir de amostras sem réplicas, a estimativa do erro experimental foi realizada pelo método descrito por Kline e McClintock (1953), sendo que o erro (e_R) é definido por:

$$e_R = \left[\left(\frac{\partial R}{\partial v_1} e_1 \right)^2 + \left(\frac{\partial R}{\partial v_2} e_2 \right)^2 + \ldots + \left(\frac{\partial R}{\partial v_n} e_n \right)^2 \right]^{1/2} \tag{2.39}$$

em que R é a função da concentração de células (R=x=m/v). Assim v_1 = m e v_2 = v. O termo e_n representa o erro em relação à medida experimental da massa (e_1 = 0,0201 g) e do volume (e_2 = 0,0005 L) da biomassa. O erro e_1 foi calculado pela soma dos desvios da medida da balança (0,0001) e da operação de separação da centrífuga (0,02; considerando uma precisão de separação igual a 98%), o erro e_2, pelo desvio da medida da proveta utilizada para quantificar o volume (0,0005). Já os erros das medidas de volume foram considerados equivalentes aos erros dos instrumentos de medidas (provetas, balões volumétricos, etc.). A propagação das incertezas no cálculo dos rendimentos seguiu o método descrito por Lavarda (1997).

As Figs. 2.2-2.4 apresentam as variações das concentrações de sacarose, células e etanol com o tempo de fermentação para cada experimento em batelada alimentada. Nestas figuras, observou-se que o aumento da concentração de sacarose no meio alimentado (s_F) resultou em maior formação de produto no final da fermentação (p_f), sem notável crescimento celular.

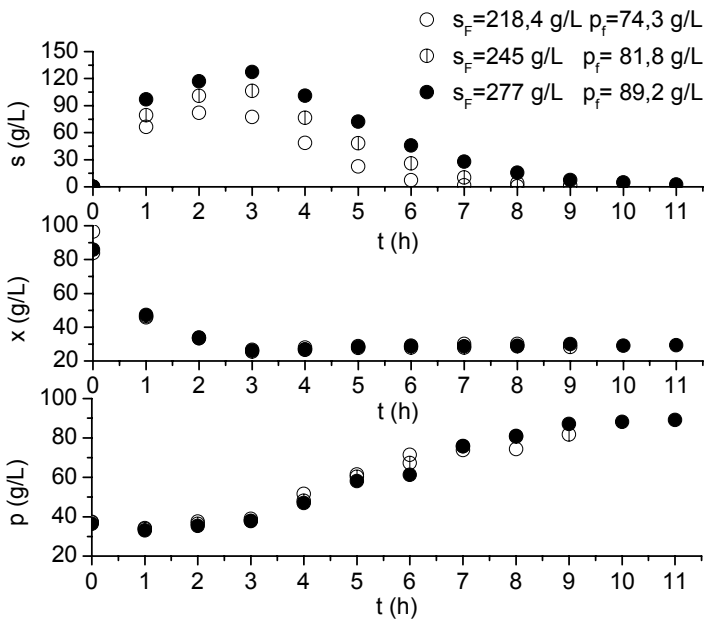


Figura 2.2 – Concentrações de sacarose, células e etanol para os experimentos em batelada alimentada com t_e = 3 h e diferentes concentrações de substrato alimentado.

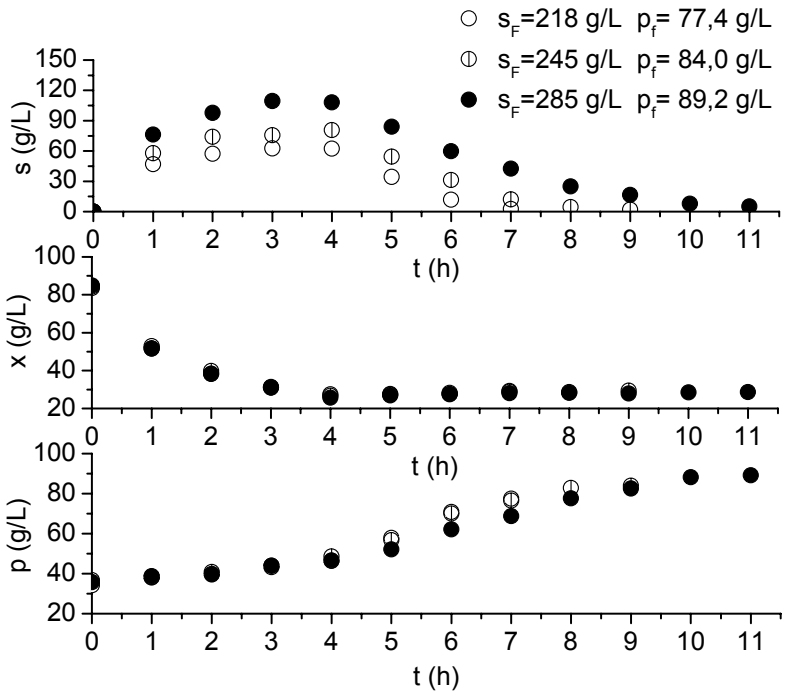


Figura 2.3 – Concentrações de sacarose, células e etanol para os experimentos em batelada alimentada com t_e = 4 h e diferentes concentrações de substrato alimentado.

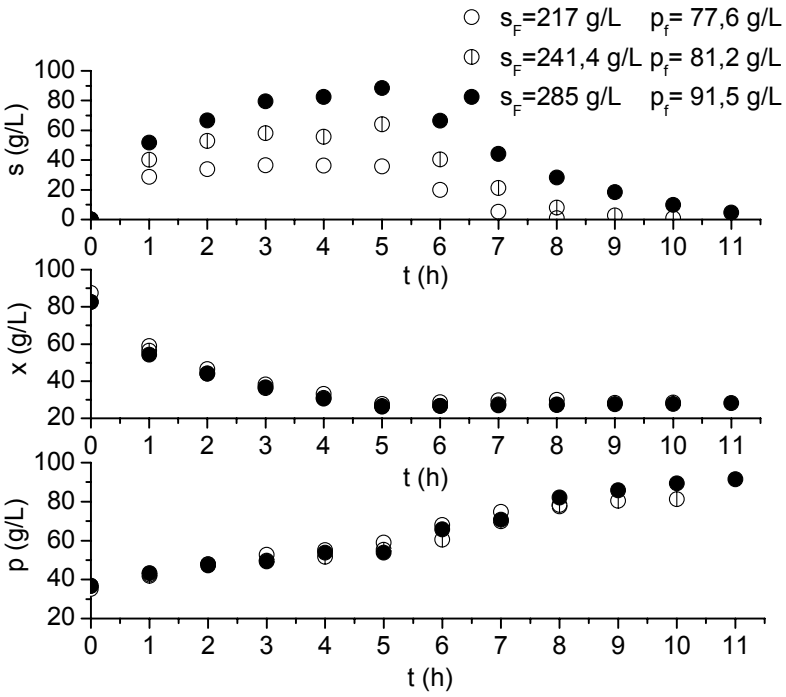


Figura 2.4 – Concentrações de sacarose, células e etanol para os experimentos em batelada alimentada com t_e = 5 h e diferentes concentrações de substrato alimentado.

Para analisar os dados experimentais, de modo que tais experimentos pudessem ser comparados, foram consideradas as concentrações residuais de sacarose (s_r) iguais a 1 g/L.

O rendimento em etanol (y_{ps}), o rendimento em células (y_{xs}) e a produtividade (Q_p) foram calculados pelas Eqs. 2.40-2.42:

$$y_{ps} = \frac{p(t)v(t) - p_0 v_0}{[v(t) - v_0]s_F + v_0 s_0 - v(t)s(t)} \tag{2.40}$$

$$y_{xs} = \frac{x(t)v(t) - x_0 v_0}{[v(t) - v_0]s_F + v_0 s_0 - v(t)s(t)} \tag{2.41}$$

$$Q_p = \frac{p_f - p_0}{t_f} \tag{2.42}$$

Pela análise dos experimentos com tempo de enchimento (t_e) igual a 3 h, observou-se que os rendimentos finais em etanol (y_{ps}) foram aproximadamente iguais a 0,41 g_{et}/g_{sac} e praticamente não variaram com o aumento da concentração de sacarose na alimentação (s_F). Os rendimentos finais em células (y_{xs}) aumentaram com o aumento de s_F, mas a partir de s_F = 245 g/L, o incremento no valor de y_{xs} foi bem menor, como pode ser visto na Fig. 2.5. As produtividades do etanol (Q_p) quase não variaram com o aumento de s_F, ficando próximas a 4,8 g/Lh.

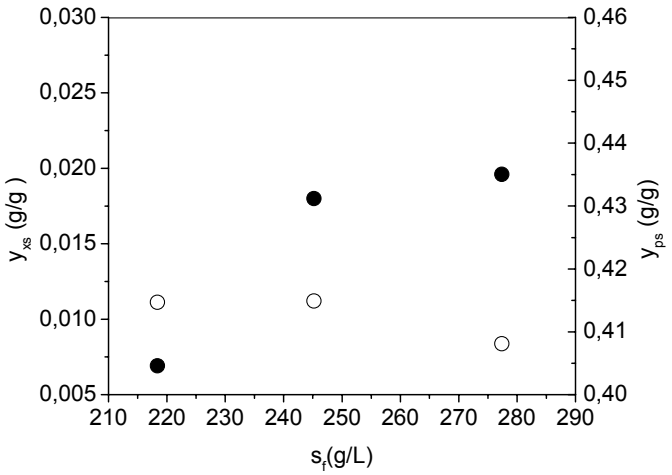


Figura 2.5 – Variações dos rendimentos em células (●) e em produto (○) com a concentração de sacarose na alimentação para t_e = 3 h.

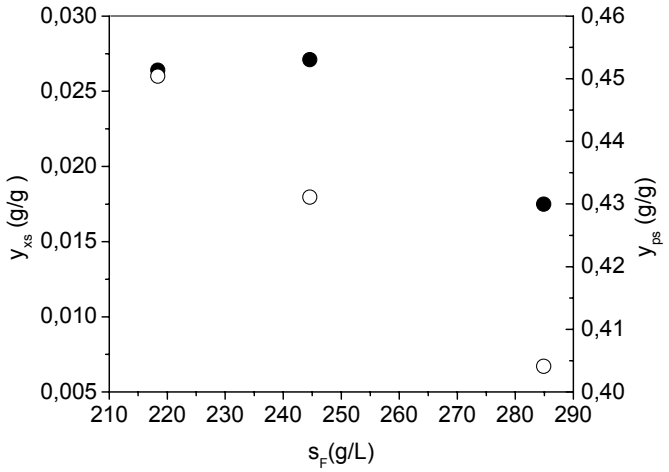


Figura 2.6 – Variações dos rendimentos em células (●) e em produto (○) com a concentração de sacarose na alimentação para t_e = 4 h.

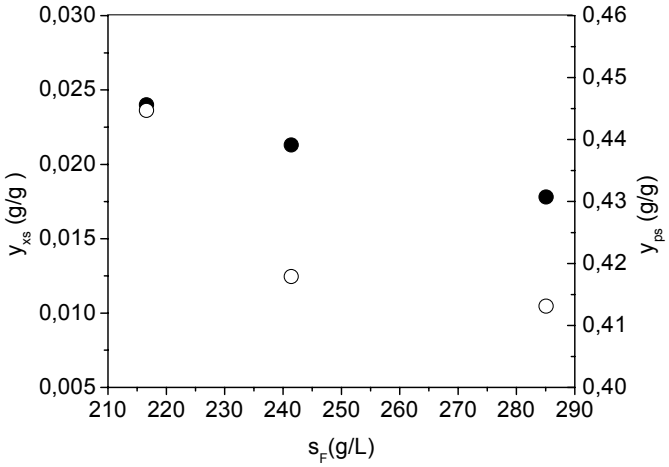


Figura 2.7 – Variações dos rendimentos em células (●) e em produto (○) com a concentração de sacarose na alimentação para t_e = 5 h.

Tabela 2.3 - Resultados experimentais da fermentação em batelada alimentada para t_e = 3h.

	s_F=218,4 ± 0,1g/L	s_F=245 ± 4 g/L	s_F=277 ± 3 g/L
s_0 (g/L)	0	0	0
x_0 (g/L)	96,0 ± 2	84,0 ± 1	86,0 ± 1
p_0 (g/L)	37,42 ± 0,01	37,2 ± 0,3	36,39 ± 0,01
v_0 (L)	1,500 ± 0,003	1,500 ± 0,003	1,500 ± 0,003
v_T (L)	4,966 ± 0,006	4,995 ± 0,006	4,998 ± 0,006
F (L/h)	1,155 ± 0,004	1,110 ± 0,004	1,166 ± 0,004
t_f (h)	8	9	11
s_r (g/L)	0,57 ± 0,09	1,37 ± 0,03	2,4 ± 0,2
y_{ps} (g/g) final	0,415 ± 0,005	0,415 ± 0,008	0,408 ± 0,007
y_{ps} (g/g) para s_r = 1 g/L	0,415	0,415	0,408
y_{xs} (g/g) final	0,007 ± 0,006	0,018 ± 0,005	0,019 ± 0,004
y_{xs} (g/g) para s_r = 1 g/L	0,007	0,018	0,020
Q_p (g/L h) final	4,6 ± 0,7	5,0 ± 0,4	4,8 ± 0,4
Q_p (g/L h) para s_r = 1 g/L	4,8	4,9	4,6

Para os experimentos com t_e = 4 h, os rendimentos y_{ps} e as produtividades Q_p diminuíram com o aumento de s_F. Os rendimentos y_{xs} foram próximos a 0,026 g_{cel}/g_{sac} para s_F = 218 e 245 g/L, diminuindo consideravelmente para s_F = 285 g/L (Fig. 2.6).

Tabela 2.4 - Resultados experimentais da fermentação em batelada alimentada para t_e = 4h.

	s_F=218 ± 2g/L	s_F=245 ± 4 g/L	s_F=285 ± 4 g/L
s_0 (g/L)	0	0	0
x_0 (g/L)	84,0 ± 2	84,0 ± 1	85,0 ± 1
p_0 (g/L)	34,2 ± 0,1	36,7 ± 0,1	35,81 ± 0,01
v_0 (L)	1,500 ± 0,003	1,500 ± 0,003	1,500 ± 0,003
v_T (L)	4,983 ± 0,006	4,988 ± 0,006	4,988 ± 0,006
F (L/h)	0,871 ± 0,004	0,872 ± 0,004	0,872 ± 0,004
t_f (h)	7	9	11
s_r (g/L)	2,6 ± 0,1	1,8 ± 0,2	5,1 ± 0,2
y_{ps} (g/g) final	0,448 ± 0,005	0,431 ± 0,008	0,404 ± 0,006
y_{ps} (g/g) para s_r = 1 g/L	0,450	0,431	0,404
y_{xs} (g/g) final	0,025 ± 0,006	0,026 ± 0,005	0,016 ± 0,004
y_{xs} (g/g) para s_r = 1 g/L	0,026	0,027	0,018
Q_p (g/L h) final	6,2 ± 0,2	5,2 ± 0,2	4,85 ± 0,01
Q_p (g/L h) para s_r = 1 g/L	6,2	5,1	4,38

Nos experimentos com t_e = 5 h, os rendimentos y_{ps} e y_{xs} diminuíram com o aumento de s_F, e quando s_F foi aumentada de 241,4 para 285 g/L, y_{ps} e y_{xs} diminuíram em menor proporção (Fig. 2.7). A produtividade Q_p diminuiu até s_F = 241,4 g/L, e teve um aumento para s_F = 285 g/L.

Tabela 2.5 - Resultados experimentais da fermentação em batelada alimentada para t_e = 5h.

	s_F=217 ± 1 g/L	s_F=241,4 ± 0,1g/L	s_F=285 ± 4 g/L
s_0 (g/L)	0	0	0
x_0 (g/L)	88,0 ± 2	83,0 ± 1	83,0 ± 1
p_0 (g/L)	35,17 ± 0,01	36,71 ± 0,01	36,78 ± 0,01
v_0 (L)	1,500 ± 0,003	1,500 ± 0,003	1,500 ± 0,003
v_T (L)	4,986 ± 0,006	4,987 ± 0,006	4,985 ± 0,006
F (L/h)	0,660 ± 0,004	0,668 ± 0,004	0,670 ± 0,004
t_f (h)	8	10	11
s_r (g/L)	0,894 ± 0,001	0,899 ± 0,001	4,57 ± 0,04
y_{ps} (g/g) final	0,445 ± 0,004	0,418 ± 0,002	0,413 ± 0,007
y_{ps} (g/g) para s_r = 1 g/L	0,445	0,418	0,413
y_{xs} (g/g) final	0,024 ± 0,006	0,021 ± 0,005	0,017 ± 0,004
y_{xs} (g/g) para s_r = 1 g/L	0,024	0,021	0,018
Q_p (g/L h) final	5,3 ± 0,5	4,4 ± 0,3	5,0 ± 0,4
Q_p (g/L h) para s_r = 1 g/L	5,3	4,5	4,8

As variações da utilização de açúcar e concentração percentual de etanol em função da concentração de sacarose alimentada, para cada tempo de enchimento (t_e) do fermentador, são apresentadas nas Figs. 2.8-2.10. Considerando uma concentração residual de sacarose

igual a 1 g/L, quando a concentração de sacarose na alimentação aumentou de 218 para 285 g/L, para todos os tempos de enchimento 3, 4 e 5 h, a percentagem de utilização de açúcar ficou acima de 99,5% e a concentração percentual de etanol aumentou de 9,4% a 11,4% (v/v) para t_e = 3 h, de 9,9% a 11,5% (v/v) para t_e = 4 h, e de 9,8% a 11,8% (v/v) para t_e = 5 h. Logo, a concentração de sacarose ótima na alimentação foi igual a 285 g/L para t_e = 5h, a qual produziu a maior concentração percentual de etanol (11,8%, v/v).

As Figs. 2.11-2.13 apresentam as variações da produtividade do etanol ($Q_e=F(p_f-p_0)$, g/h) com a taxa inicial de adição do açúcar ao fermentador ($Q_s=Fs_F$, g/h). A produtividade do etanol aumentou com o aumento da taxa inicial de adição do açúcar para todos os tempos de enchimento do fermentador, devido à efetiva utilização do açúcar com a produção simultânea de etanol. Isto quer dizer que os efeitos de inibição do crescimento celular devido às condições iniciais usadas na fermentação (s_F e p_0), não afetaram a produção de etanol de maneira que provocasse a diminuição da produtividade. Os valores das produtividades em etanol em g/h, como esperado (devido à equação usada no cálculo: $Q_e=F(p_f-p_0)$), diminuíram com o aumento do tempo de enchimento, já que as vazões de alimentação são definidas como a razão do volume do meio alimentado pelo tempo de enchimento. As taxas iniciais de adição do açúcar ótimas foram iguais a 323,4 g/h (s_F = 277 g/L), 248,4 g/h (s_F = 285 g/L) e 191,1 g/h (s_F = 285 g/L) para os tempos de enchimento de 3, 4 e 5 horas, nas quais foram obtidas as maiores produtividades de etanol iguais a 62,2, 48,02 e 37,68 g/h, respectivamente.

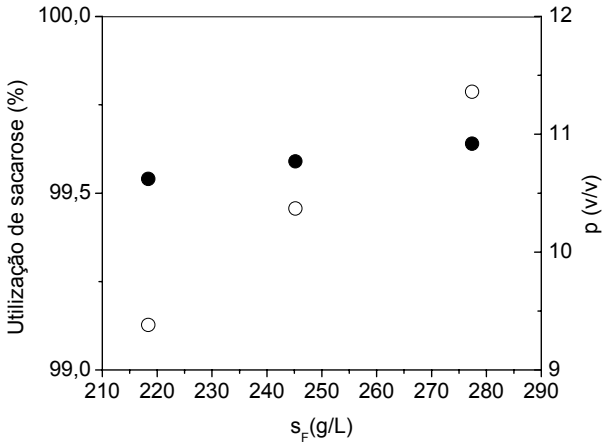


Figura 2.8 – Variações da percentagem de utilização do açúcar (●) e concentração percentual de etanol (○) com a concentração de sacarose na alimentação para t_e = 3 h.

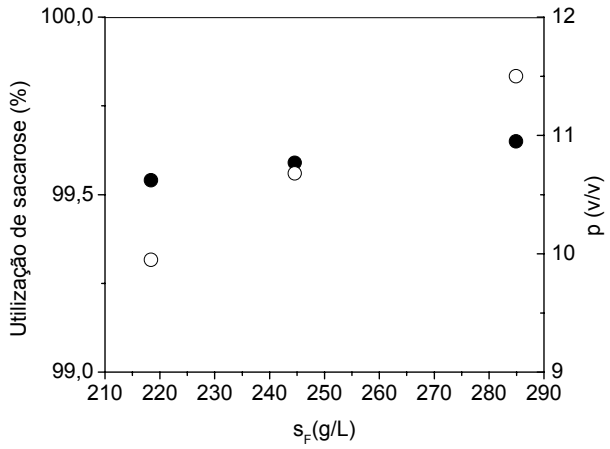


Figura 2.9 – Variações da percentagem de utilização do açúcar (●) e concentração percentual de etanol (○) com a concentração de sacarose na alimentação para t_e = 4 h.

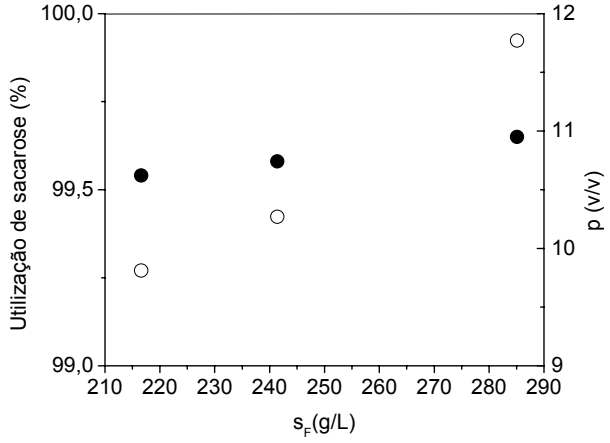


Figura 2.10 – Variações da percentagem de utilização do açúcar (●) e concentração percentual de etanol (○) com a concentração de sacarose na alimentação para t_e = 5 h.

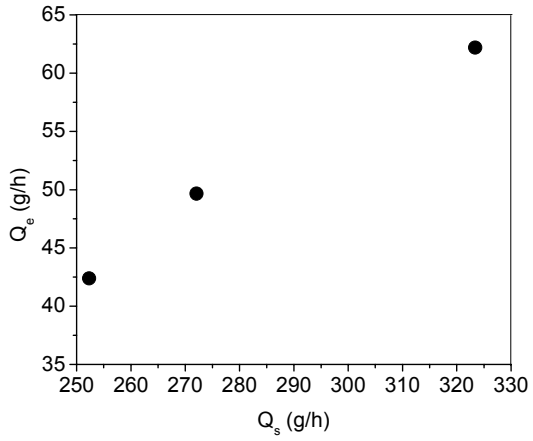


Figura 2.11 – Variação da produtividade de etanol com a taxa inicial de adição do açúcar ao fermentador para t_e = 3 h.

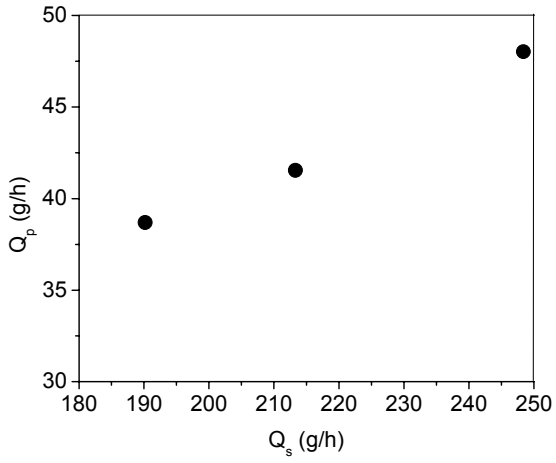


Figura 2.12 – Variação da produtividade de etanol com a taxa inicial de adição do açúcar ao fermentador para t_e = 4 h.

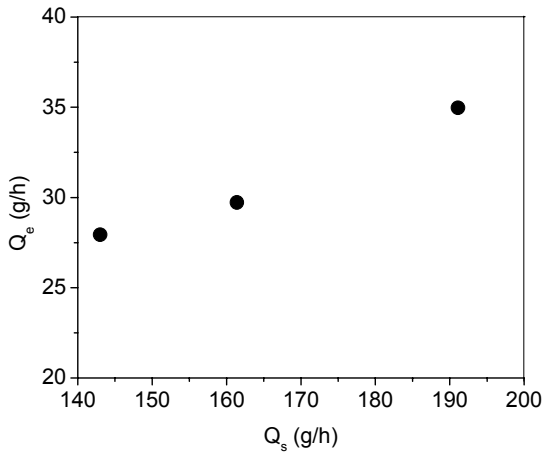


Figura 2.13 – Variação da produtividade de etanol com a taxa inicial de adição do açúcar ao fermentador para t_e = 5 h.

A partir deste ponto, a apresentação dos resultados foi realizada considerando as concentrações de sacarose na alimentação constantes e tempos de enchimento do fermentador variáveis.

As variações dos rendimentos em células (y_{xs}) e em etanol (y_{ps}) com o tempo de enchimento são exibidas nas Figs. 2.14, 2.17 e 2.20, considerando a concentração de sacarose residual igual a 1 g/L. As Figs. 2.16, 2.19 e 2.22 apresentam a variação dos rendimentos com o tempo de fermentação e com a concentração de etanol. Observa-se uma maior dispersão dos resultados no início da fermentação, principalmente para o rendimento em células, provavelmente devido ao efeito da diluição do meio fermentativo. Na Tab. 2.6, os rendimentos médios são exibidos para melhor compreender as Figs. 2.16, 2.19 e 2.22.

Os rendimentos finais em células e em etanol, para concentrações de sacarose na alimentação (s_F) de 218 g/L, aumentaram respectivamente de 0,006 a 0,026 g/g e de 0,415 a 0,45 g/g, quando o tempo de enchimento foi aumentado de 3 para 4 horas, e em seguida diminuíram para 0,024 g/g e 0,445 g/g com t_e = 5h (Fig. 2.14). A produtividade do etanol ($Q_p=(p_f-p_0)/t_f$, g/Lh) também aumentou de 4,8 a 6,2 g/Lh com o aumento do tempo de enchimento de 3 para 4 h, e em seguida diminuiu para 5,3 g/Lh com t_e = 5 h (Fig. 2.15). Pela análise dos rendimentos em células e em etanol com o tempo de fermentação e com a concentração de etanol (Fig. 2.16), os primeiros tiveram valores maiores no tempo de enchimento de 3 horas ($y_{xsmédio}$ = 0,0217), e os rendimentos em etanol tiveram valores maiores com t_e igual a 5 horas ($y_{psmédio}$ = 0,431). Logo, para as concentrações de sacarose no meio alimentado próximas a 218 g/L, os tempos de enchimento favoráveis foram os de 4 e 5 horas, os quais forneceram maiores resultados de produtividade e rendimentos em etanol (em todo o tempo de fermentação), respectivamente.

Tabela 2.6 - Rendimentos médios em etanol para cada experimento em batelada alimentada.

	$s_F \approx 218$ g/L		$s_F \approx 245$ g/L		$s_F \approx 285$ g/L	
t_e (h)	$y_{psmédio}$	$y_{xsmédio}$	$y_{psmédio}$	$y_{xsmédio}$	$y_{psmédio}$	$y_{xsmédio}$
3	0,405	0,0217	0,410	0,0152	0,393	0,0153
4	0,414	0,0178	0,413	0,0190	0,392	0,0122
5	0,431	0,0138	0,415	0,0154	0,405	0,0134

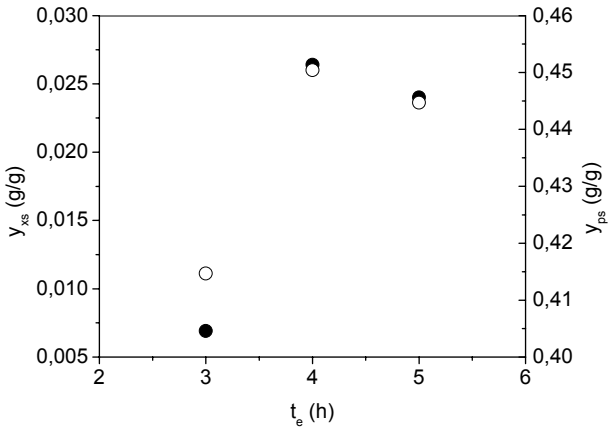


Figura 2.14 – Variações dos rendimentos em células (●) e em produto (○) com o tempo de enchimento do fermentador (t_e) para os experimentos com $s_F \approx 218$ g/L.

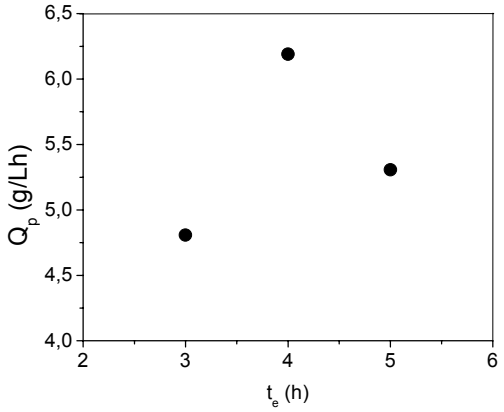
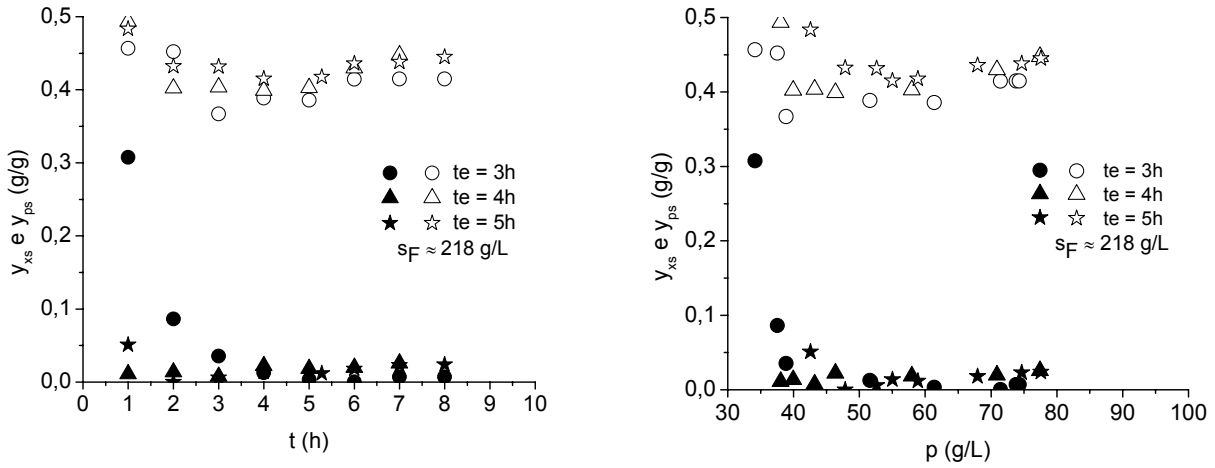


Figura 2.15 – Variação da produtividade de etanol com o tempo de enchimento do fermentador (t_e) para os experimentos com $s_F \approx 218$ g/L.



(a) (b)

Figura 2.16 - Variações dos rendimentos em células y_{xs} (símbolos cheios) e em produto y_{ps} (símbolos vazios) com o tempo de fermentação (a) e concentração de etanol (b) para os experimentos com $s_F \approx 218$ g/L.

Os resultados relativos aos rendimentos e produtividade para s_F próxima a 245 g/L foram semelhantes aos resultados para s_F próxima a 218 g/L. Os rendimentos em células e em etanol aumentaram de 0,018 a 0,027 g/g e 0,415 a 0,431 g/g respectivamente, quando o tempo de enchimento foi aumentado de 3 para 4 horas, e em seguida diminuíram para 0,021 g/g e 0,418 g/g com t_e = 5h. A produtividade do etanol aumentou de 4,9 a 5,1 g/Lh com o aumento do tempo de enchimento de 3 para 4 h, e em seguida diminuiu para 4,5 g/Lh com te = 5 h. Pela Fig. 2.19, notou-se que os rendimentos em células foram realmente maiores no tempo de enchimento igual a 4 horas em todo o tempo de fermentação ($y_{xsmédio}$ = 0,0190), mas os rendimentos em etanol foram maiores em t_e igual a 5 horas ($y_{psmédio}$ = 0,415). Assim, os tempos de enchimento de 4 e 5 horas apresentaram resultados viáveis para as concentrações de sacarose no meio alimentado próximas a 245 g/L, a partir dos quais foram obtidos os maiores valores de produtividade e rendimento em etanol (em todo o tempo de fermentação), respectivamente.

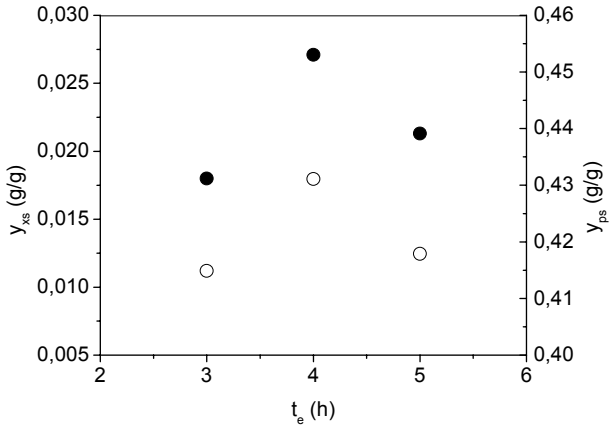


Figura 2.17 – Variações dos rendimentos em células (●) e em produto (○) com o tempo de enchimento do fermentador (t_e) para os experimentos com $s_F \approx 245$ g/L.

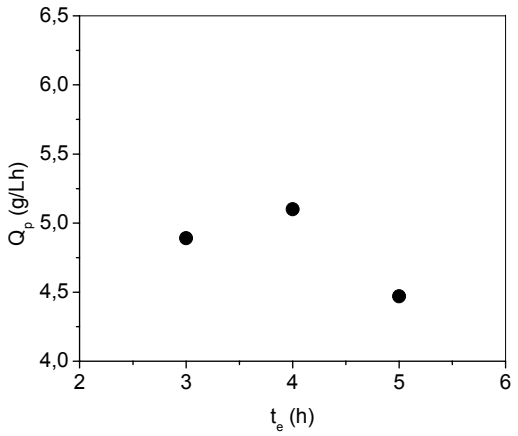
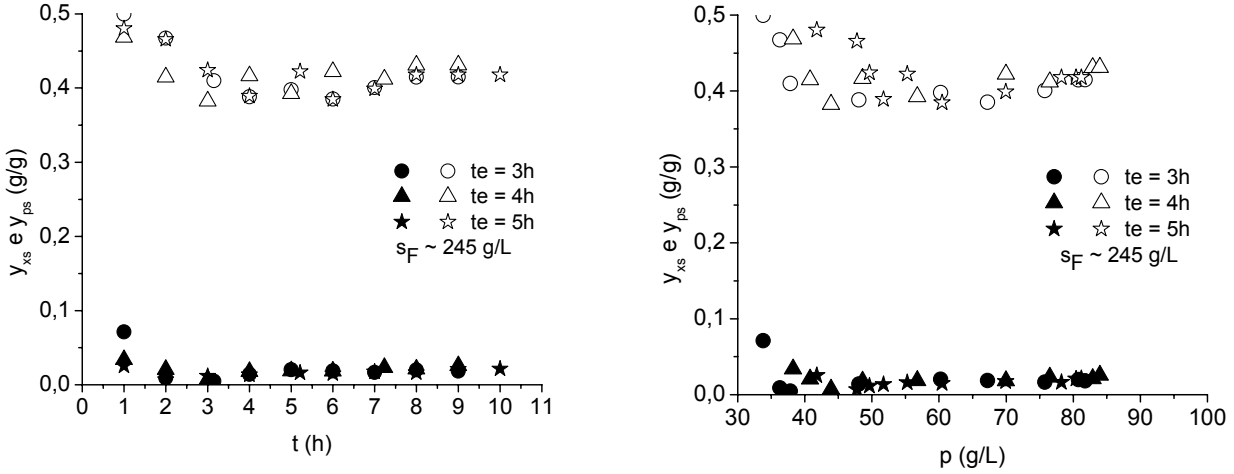


Figura 2.18 – Variação da produtividade de etanol com o tempo de enchimento do fermentador (t_e) para os experimentos com $s_F \approx 245$ g/L.



(a) (b)

Figura 2.19 - Variações dos rendimentos em células y_{xs} (símbolos cheios) e em produto y_{ps} (símbolos vazios) com o tempo de fermentação (a) e concentração de etanol (b) para os experimentos com $s_F \approx 245$ g/L.

Os rendimentos e a produtividade em etanol obtidos para as concentrações de sacarose na alimentação próximas a 285 g/L diferiram dos resultados obtidos para as concentrações próximas a 218 e 245 g/L com relação aos tempos de enchimento. Os rendimentos em células e em etanol mantiveram-se próximos a 0,019 g/g e 0,406 g/g respectivamente, quando o tempo de enchimento aumentou de 3 para 4 horas. Posteriormente, o rendimento em etanol aumentou para 0,413 g/g e o rendimento em células se manteve em 0,018 g/g com o aumento de t_e para 5 horas. A produtividade do etanol também diminuiu de 4,6 a 4,38 g/Lh com o aumento de t_e para 4 h, e em seguida aumentou para 4,8 g/Lh em t_e = 5 h. Pela análise dos rendimentos em células e em etanol com o tempo de fermentação e com a concentração de etanol (Fig. 2.22), os primeiros tiveram valores maiores no tempo de

enchimento de 3 horas ($y_{xsmédio}$ = 0,0153), e os segundos, no tempo de enchimento de 5 horas ($y_{psmédio}$ = 0,405), como visto na análise anterior. Logo, o tempo de enchimento ótimo, para as concentrações de sacarose na alimentação próximas a 285 g/L, foi igual a 5 horas, no qual obteve-se os maiores valores de produtividade e rendimento em etanol.

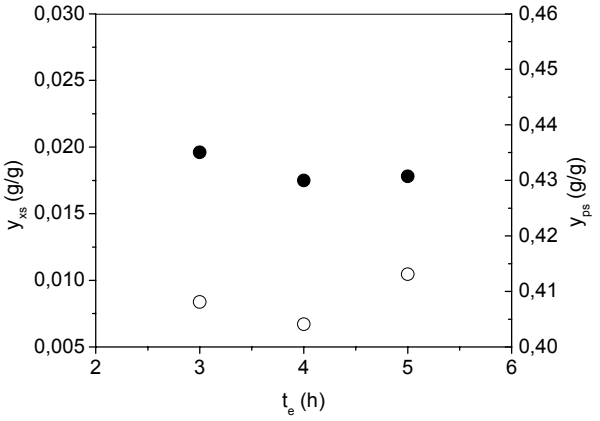


Figura 2.20 – Variações dos rendimentos em células (●) e em produto (○) com o tempo de enchimento do fermentador (t_e) para os experimentos com s_F ≈ 285 g/L.

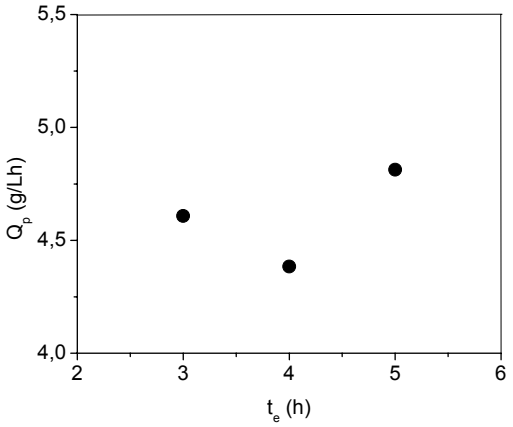
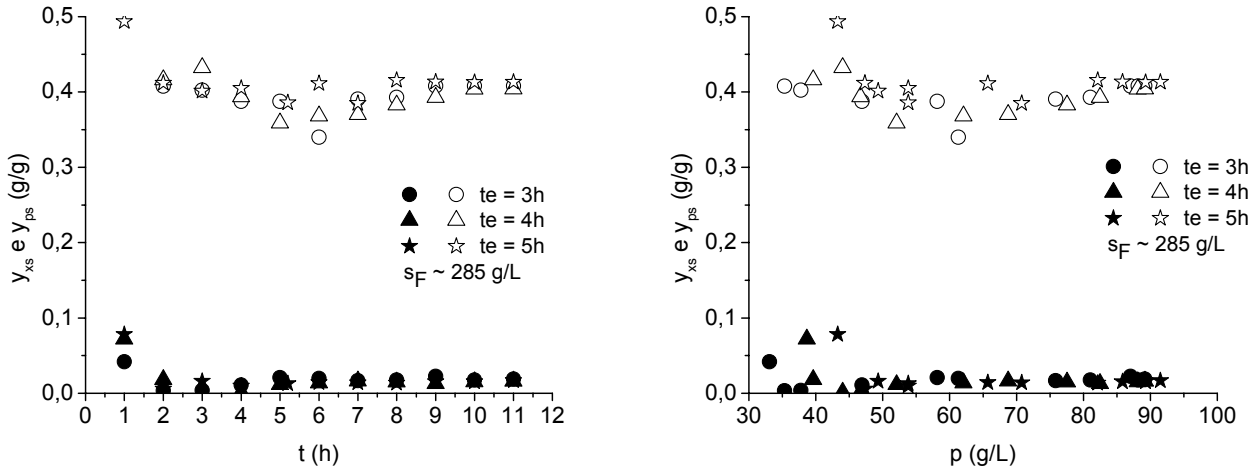


Figura 2.21 – Variação da produtividade de etanol com o tempo de enchimento do fermentador (t_e) para os experimentos com s_F ≈ 285 g/L.



(a) (b)

Figura 2.22 - Variações dos rendimentos em células y_{xs} (símbolos cheios) e em produto y_{ps} (símbolos vazios) com o tempo de fermentação (a) e concentração de etanol (b) para os experimentos com s_F ≈ 285 g/L.

Andrietta *et al.* (2003) estudaram a influência da vazão de alimentação nos rendimentos em células e em etanol adotando tempos de enchimento iguais a 1, 2 e 3 horas para concentrações de sacarose na alimentação iguais a 239,4, 230,14 e 254,82 g/L respectivamente. Também consideraram a concentração de etanol no inóculo próxima a 32 g/L e utilizaram o microrganismo *S. cerevisiae* na fermentação alcoólica. Observaram que os rendimentos em etanol diminuíram de 0,378 a 0,32 g/g com o aumento do tempo de

enchimento de um fermentador de 5L, e os rendimentos em células variaram significativamente (0,0257, 0,006 e 0,02 g/g). Também notaram que, quanto mais rápido se alimentou o fermentador, maior foi o tempo de fermentação, e que a produtividade ($Q_p=(p_f-p_0)/t_f$, 5,62, 4,77 e 4,96 g/Lh para concentração de substrato residual igual a 1 g/L) foi pouco afetada pela velocidade de enchimento do fermentador. Estas observações foram diferentes das verificadas no presente trabalho para concentrações de sacarose no meio alimentado próximas a 245 g/L, pois os rendimentos em etanol não diminuíram linearmente com o tempo de enchimento e quanto mais rápido se alimentou o fermentador, menor foi o tempo de fermentação. Além disso, os rendimentos finais para tempos de enchimento entre 3 a 5 horas alcançaram valores superiores (0,413, 0,431 e 0,418 g/g) aos apresentados por Andrietta *et al.* (2003) para tempos de enchimento entre 1 a 3 horas. Ambos os trabalhos concordaram relativamente em relação à produtividade ser pouco afetada pela variação dos tempos de enchimentos. A comparação destes dois trabalhos destacou a importância de se estudar a influência da variação dos tempos de enchimento para condições operacionais específicas na fermentação, pois se notou que dependendo do tempo de enchimento, foram obtidos melhores rendimentos em etanol.

2.4 Conclusões

No presente trabalho, a partir dos experimentos em batelada alimentada, foi observado que com o aumento da concentração de sacarose no meio alimentado houve maior formação de produto no final da fermentação, sem notável crescimento celular.

Considerando a variação da concentração de sacarose na alimentação, o tempo de enchimento igual a 3 horas favoreceu o crescimento celular. A concentração de sacarose ótima na alimentação foi igual a 285 g/L para t_e = 5h, a qual produziu a maior concentração de etanol (11,8%, v/v). As produtividades em g/h foram crescentes com o aumento de s_F, indicando que os efeitos de inibição do crescimento celular devido às condições iniciais usadas na fermentação (s_F e p_0), não afetaram a produção de etanol de maneira que provocasse a diminuição da produtividade. As taxas iniciais de adição do açúcar ótimas foram iguais a 323,4 g/h (s_F = 277 g/L), 248,4 g/h (s_F = 285 g/L) e 191,1 g/h (s_F = 285 g/L) para os tempos de enchimento de 3, 4 e 5 horas, nas quais foram obtidas as maiores produtividades de etanol em g/h iguais a 62,2, 48,02 e 37,68, respectivamente.

Pela análise dos resultados, considerando a variação dos tempos de enchimento, para as concentrações de sacarose no meio alimentado próximas a 218 e 245 g/L, os tempos de enchimento favoráveis foram os de 4 e 5 horas, os quais forneceram maiores valores de produtividade e rendimentos em etanol (em todo o tempo de fermentação), respectivamente. O tempo de enchimento ótimo, para as concentrações de sacarose na alimentação próximas

a 285 g/L, foi igual a 5 horas, no qual obteve-se os maiores valores de produtividade e rendimento em etanol.

Os rendimentos em etanol não diminuíram linearmente com o tempo de enchimento e quanto mais rápido se alimentou o fermentador, menor foi o tempo de fermentação.

Verificou-se a importância do estudo da influência da variação dos tempos de enchimento para condições operacionais específicas na fermentação, pois, dependendo do tempo de enchimento, obtêm-se maiores rendimentos em etanol.

CAPÍTULO 3

DESENVOLVIMENTO DO MODELO CINÉTICO

3.1 Revisão Bibliográfica

O Problema de Identificação de Parâmetros, ou também conhecido como Problema Inverso, surge da necessidade de obtenção de parâmetros de modelos teóricos que possam ser utilizados para simular o comportamento do sistema para diferentes condições de operação, evitando assim, a necessidade da realização de experimentos (Lobato *et al.*, 2007a).

Os Métodos de Otimização Clássicos ou Determinísticos se baseiam em informações de derivadas de primeira ou de segunda ordem para a determinação da direção de busca. A principal vantagem desses métodos é rápida taxa de convergência próxima ao ponto de ótimo (Vanderplaats, 1999; Edgar *et al.*, 2001). Entretanto, tais técnicas podem apresentar algumas dificuldades numéricas e problemas de robustez relacionados com a falta de continuidade das funções a serem otimizadas ou de suas restrições, funções não convexas, multimodalidade, necessidade de se trabalhar com valores discretos para as variáveis, existência de mínimos ou máximos locais, além da dificuldade de obtenção de aproximações numéricas das matrizes Jacobiana e Hessiana para problemas de alta dimensão (Vanderplaats, 1999; Edgar *et al.*, 2001).

Os Métodos de Otimização Não-Determinísticos, Estocásticos ou também conhecidos como Randômicos, são baseados nos processos de seleção natural da luta pela vida e da genética de populações, em analogia com processos físicos ou em abordagens puramente estruturais (Coelho, 2003). O desenvolvimento dessa metodologia pseudo-aleatória se deu por volta de 1950 com o surgimento dos algoritmos genéticos, quando biólogos utilizavam técnicas computacionais para a simulação de sistemas biológicos. Mas foi somente entre 1960 e 1970, na Universidade de Michigan sob a direção de John Holland em 1975, que iniciou o estudo de algoritmos genéticos como os conhecidos atualmente. As principais características desses métodos são (Vanderplaats, 1999; Edgar *et al.*, 2001):

- ✓ dispensam o uso de derivadas da função para a determinação da direção de busca;
- ✓ não investem todo o esforço computacional num único ponto, mas sim operam sobre uma população de pontos, com exceção do algoritmo de Recozimento Simulado

(Metropolis *et al.*, 1953), que trabalha com uma configuração inicial de projeto (Coelho, 2003);

- ✓ são métodos reconhecidos como métodos de busca global, isto é, através dos mecanismos em que esses são fundamentados, são capazes de escapar de ótimos locais, o que não ocorre quando métodos clássicos são utilizados.

Têm-se como principais desvantagens (Vanderplaats, 1999; Edgar *et al.*, 2001, Coelho, 2003):

- ✓ seus desempenhos variam de execução para execução (a menos que o mesmo gerador de números aleatórios com a mesma semente seja utilizado) pelo fato de esses métodos serem estocásticos;
- ✓ são muito mais dispendiosos que os métodos clássicos do ponto de vista do número de avaliações da função objetivo.

As várias técnicas de otimização são descritas na Fig. 3.1.

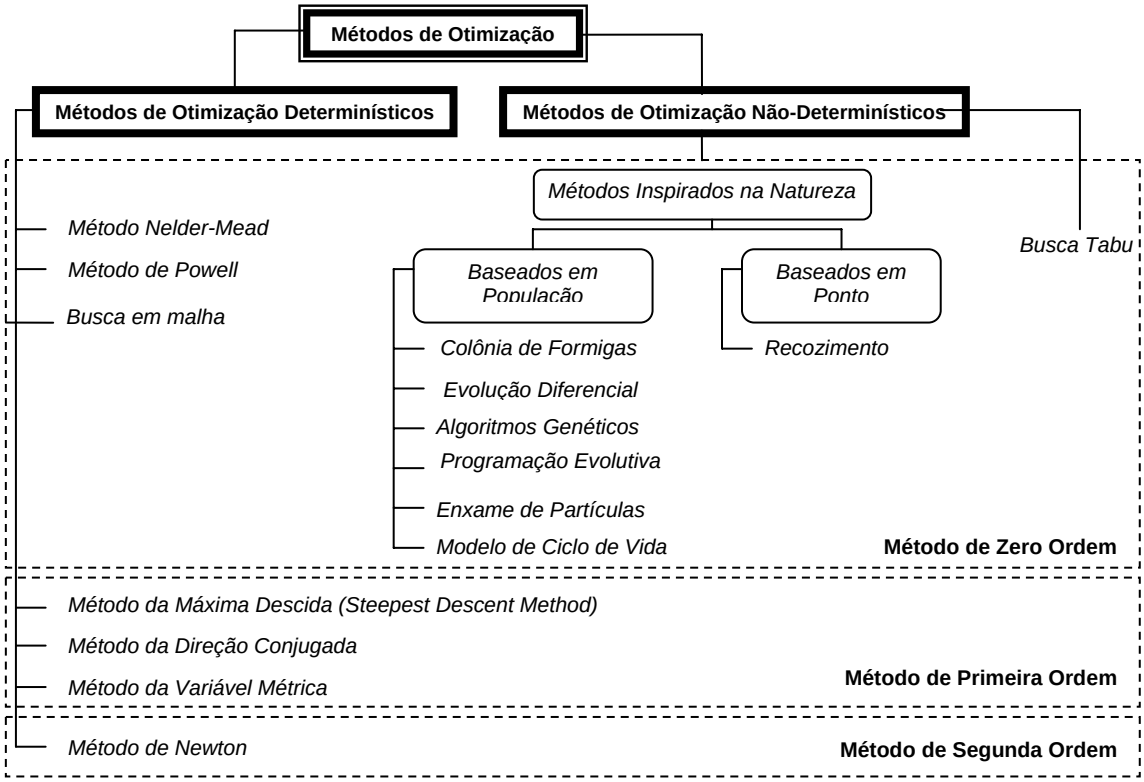


Figura 3.1 - Classificação dos Métodos de Otimização (Adaptado de Vanderplaats, 1999; Castro, 2001; Deb, 2001).

Tradicionalmente, o problema de Identificação de Parâmetros tem sido tratado por técnicas de otimização clássicas ou determinísticas, como nos trabalhos apresentados a seguir. Thatipamala *et al.* (1992) a partir de dados experimentais obtidos pela fermentação em batelada

por *S. cerevisiae* com diferentes concentrações iniciais de substrato e produto, estimaram os parâmetros dos modelos sugeridos utilizando o algoritmo dos mínimos quadrados de Levenberg-Marquardt. Os parâmetros do modelo proposto por Lee *et al.* (1995) foram estimados a partir de dados experimentais em batelada. Os coeficientes de rendimento foram calculados diretamente pelos dados experimentais. As taxas de crescimento máximas (μ_{Gmax} e μ_{Mmax}) foram determinadas por uma aproximação *spline* cúbica suave com um esquema de validação cruzada. As constantes de repressão (k_i) e Monod (k_G e k_M) foram determinadas por um método estatístico. Os valores das concentrações máximas de célula e etanol foram determinados por dados experimentais prévios de culturas contínuas. Pertev *et al.* (1997) reestimaram os parâmetros do modelo, já anteriormente estimados por Sonnleitner and Kappeli (1986) e Besli *et al.* (1995), a partir de uma técnica de estimação de parâmetros multiresposta. O modelo foi validado com experimentos em batelada e em batelada alimentada e os parâmetros diferiram com relação ao tipo de processo e condições iniciais. Os parâmetros do modelo de Andrews (*apud* Luong,1987) foram ajustados no trabalho de Ferreira *et al.* (1998) por uma estimação não linear pelo software STATISTICA® e por métodos gráficos. Os valores dos rendimentos y_{xs} e y_{ps} foram considerados constantes e iguais aos máximos valores obtidos experimentalmente.

Goswami e Srivastava (2000), a partir de dados cinéticos pelo processo em batelada, estimaram os parâmetros cinéticos de um modelo matemático não estruturado, utilizando um programa de otimização com técnica de regressão não linear (Bard, 1974). Tosetto (2002) calculou os parâmetros cinéticos dos modelos propostos a partir de uma rotina de ajuste desenvolvida em DELPHI® 5.0 por pesquisadores da Divisão de Biotecnologia e Processos do CPQBA/UNICAMP. Apesar do bom ajuste dos modelos de Ghose e Thyagi (1979) modificado e de Jin *et al.* (*apud* Tosetto, 2002) com a utilização de um único substrato, foram observados valores para o parâmetro k_s superiores ao valor do parâmetro k_i.

Um procedimento de identificação sistemática dos parâmetros do modelo sugerido por Grosfils *et al.* (2007) combinou vários ingredientes incluindo inicialização, uma estimativa não linear passo a passo e redução do modelo baseado na análise da variância/covariância dos parâmetros do modelo. Popova e Boyadjiev (2007) propuseram um método para resolver um problema de identificação de parâmetros para modelos multiparamétricos quando a função dos mínimos quadrados fosse multimodal. O uso de aproximações polinomiais para os dados experimentais permitiu obter valores de parâmetros em equações separadas do modelo. Assim, propuseram uma aproximação hierárquica para identificação de parâmetros usando três níveis hierárquicos para a obtenção dos valores dos parâmetros iniciais e inicialização do

procedimento de minimização da função dos mínimos quadrados. O melhoramento dos valores dos parâmetros iniciais nos níveis hierárquicos consecutivos conduziu ao decréscimo da variância do erro do modelo. Em comparação com outras investigações, a aproximação polinomial dos dados experimentais foi usada não apenas para a solução das equações diferenciais, mas para a obtenção de bons valores iniciais dos parâmetros (na área de mínimo global) para a minimização da função dos mínimos quadrados. O método foi testado na modelagem do processo de fermentação para produção de ácido glucônico. Os resultados obtidos foram coerentes com os dados experimentais.

O procedimento de estimativa de parâmetros para equações diferenciais ordinárias denominado 'chutes múltiplos' foi revisado e descrito em detalhe por Peifer e Timmer (2007). Ao contrário de outras formas de estimação de parâmetros em equações diferenciais, este procedimento não sofre muito com a atração ao mínimo local, e a velocidade de convergência é consideravelmente maior que os métodos de otimização global alcançam. Um procedimento de regularização para evitar a obtenção de parâmetros não identificáveis foi incluído na discussão do 'chute múltiplo'. Dois exemplos foram apresentados para demonstrar o desempenho deste método, um exemplo com dados simulados por um modelo que representa as oscilações de íons cálcio no citoplasma, e outro, com dados medidos *online* (Swameye *et al.*, 2003 *apud* Peifer e Timmer, 2007). Destacaram também, a possibilidade de estender o método de 'chute múltiplo' para a resolução de equações diferenciais parciais.

Drakunov e Law (2007) utilizaram uma técnica da moderna teoria de controle, chamada 'sliding mode observers' para estimação de parâmetros de modelos não lineares. Na teoria de controle um 'observador' é um algoritmo usado para estimar o estado de um sistema dinâmico quando apenas algumas saídas do sistema podem ser medidas. Observadores foram desenvolvidos e demonstrados para o modelo de Monod. O problema de cálculo de um observador não linear é, em grande parte, um problema de cálculo de um controle não linear, desde que termos adicionais no modelo do sistema sejam, de fato, controles que conduzem o estado do modelo à saída medida do sistema atual. Tal controle deve ser muito robusto já que a falta de conhecimento de alguns dos estados do sistema introduz incertezas.

Nos últimos anos, entretanto, o uso de técnicas não determinísticas ou o acoplamento destas com técnicas clássicas por um método híbrido vem ganhando importância devido à simplicidade oriunda destas metodologias evolutivas. A seguir são exibidos alguns trabalhos que aplicam estas metodologias.

Wang e Sheu (2000) usaram simultaneamente dados experimentais de fermentações em batelada e batelada alimentada com a levedura *S. diastaticus* (LORRE 316), altamente tolerante

ao etanol, para estimar os parâmetros do modelo cinético. O problema de estimação de parâmetros foi formulado como um problema de otimização multi-objetivo, que por sua vez foi convertido em um problema de mínimo-máximo. A Evolução Diferencial Híbrida (HDE), um algoritmo evolutivo, foi introduzido para resolver o problema de mínimo-máximo, com a finalidade de se obter a solução global. Como resultado, o modelo estimado pôde ajustar satisfatoriamente as duas observações experimentais: batelada e batelada alimentada.

Wang *et al*. (2001) também aplicaram o algoritmo evolutivo HDE para estimar parâmetros cinéticos de uma fermentação em batelada por *S. diastaticus* LORRE 316. No estudo de Kroumov *et al.* (2006) o procedimento de identificação dos parâmetros do modelo não linear baseou-se na aplicação do algoritmo genético (GA) híbrido e uma abordagem de decomposição. A solução ótima global foi alcançada a partir do GA para 100 gerações. Quatorze constantes cinéticas e estequiométricas foram avaliadas com sucesso para predizer os perfis experimentais de bagaço, glicose, biomassa e etanol.

Outros trabalhos como os de Silva-Neto e Soeiro (2002), Silva-Neto e Silva-Neto (2003), Chalhoub *et al.* (2007), Lobato *et al.* (2007a) e Arruda (2008), também utilizaram técnicas não determinísticas para identificação dos parâmetros de modelos.

Neste trabalho, devido às vantagens dos métodos estocásticos mencionadas anteriormente, será utilizada uma técnica não-determinística para a estimação de parâmetros cinéticos dos modelos batelada e batelada alimentada, pois como foi visto na Revisão Bibliográfica do Capítulo 2, a depender do processo utilizado, obtêm-se diferentes parâmetros para o modelo cinético. Esta estimação é empregada para que estes modelos possam ser utilizados, dentro da sua faixa de validade, para a predição de concentrações sem a necessidade da realização de práticas experimentais específicas para uma dada condição de operação.

3.2 Materiais e Métodos

A Cultura e o meio, o procedimento e a configuração experimental apresentados nesta Seção se referem aos experimentos em batelada realizados para serem utilizados na estimação dos parâmetros deste modelo.

3.2.1 Cultura e Meio

O microrganismo e a composição do meio de cultivo para a fermentação em batelada foram os mesmos adotados nos experimentos em batelada alimentada, com exceção das

concentrações de sacarose que foram 154 ± 2, 180,1 ± 0,9 e 195,6 ± 0,1 g/L para cada um dos três experimentos realizados.

3.2.2 Procedimento e Configuração Experimental

O procedimento e a configuração experimental também foram os mesmos adotados nas fermentações em batelada alimentada (Seção 2.2.2). Neste caso, todo o volume do meio, igual a 3,500 ± 0,004 L, foi adicionado ao fermentador, junto com o inóculo, no início da fermentação. A agitação foi mantida a 200 ± 1 rpm em todo o tempo de fermentação.

Figura 3.2 – Configuração do fermentador para o experimento em batelada.

3.2.3 Métodos Analíticos

Os métodos analíticos e as estimativas dos erros experimentais são apresentados nas Seções 2.2.3 e 2.3, respectivamente.

3.2.4 Modelos Matemáticos

Os valores das variáveis nas equações que descrevem o crescimento de microrganismos, o consumo de substrato, a formação de produto e a variação do volume do fermentador (apenas no modelo que representa a fermentação em batelada alimentada), ao longo do tempo de fermentação, se apresentam na forma adimensional, baseados nos trabalhos de Popova e

Boyadjiev (2007) e Dutta *et al.* (2001), onde as escalas características foram os máximos valores experimentais das variáveis de estado e do tempo (Tab. 3.1). A adimensionalização foi realizada com a finalidade de obter um modelo genérico que pudesse ser aplicado em simulações de fermentações a partir de sua dimensionalização pelos valores de condições operacionais específicas, e também, para diminuir o esforço computacional. O modelo cinético não estruturado apresentado nas Eqs. 3.3 e 3.22, foi desenvolvido por Ghose e Thyagi (1979) e modificado por Tosetto (2002) e considera a inibição pelo substrato e produto. A seguir, estas equações são apresentadas para as fermentações nos processos em batelada e em batelada alimentada.

Tabela 3.1 – Escalas características para a obtenção dos valores adimensionais das variáveis dos modelos para as fermentações nos processos em batelada e batelada alimentada.

Modelo para a Fermentação no Processo em Batelada					
Fermentações	x_{max} (g/L)	s_{max} (g/L)	p_{max} (g/L)	t_{max} (h)	
s_0 = 154 g/L	29,9	154,4	74,44	9	
s_0 = 180,1 g/L	31,3	180,1	80,77	11	
s_0 = 195,6 g/L	29,4	195,6	82,10	11	
Modelo para a Fermentação no Processo em Batelada Alimentada					
Fermentações	x_{max} (g/L)	s_{max} (g/L)	p_{max} (g/L)	t_{max} (h)	v_{max} (L)
s_F = 218 g/L e t_e = 3 h	96,5	218,4	74,29	8	4,966
s_F = 218 g/L e t_e = 4 h	84,3	218,4	77,44	7	4,983
s_F = 217 g/L e t_e = 5 h	87,5	216,6	77,57	8	4,986
s_F = 245 g/L e t_e = 3 h	84,0	245,2	81,78	9	4,995
s_F = 245 g/L e t_e = 4 h	83,5	244,6	84,0	9	4,988
s_F = 241,4 g/L e t_e = 5 h	82,6	241,4	81,21	10	4,987
s_F = 277 g/L e t_e = 3 h	85,9	277,4	89,16	11	4,998
s_F = 285 g/L e t_e = 4 h	84,9	284,9	89,20	11	4,988
s_F = 285 g/L e t_e = 5 h	82,6	285,1	91,5	11	4,985

a) Modelo para a Fermentação no Processo em Batelada

$$\frac{dX}{d\tau} = \mu_a X \qquad (3.1)$$

$$\mu_a = \mu_{max}\left(\frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}}\right)\left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)^n \qquad (3.2)$$

$$\frac{dS}{d\tau} = -\frac{1}{Y_{XS}}\frac{dX}{d\tau} - M_S X \quad (3.3)$$

$$\frac{dP}{d\tau} = \frac{Y_{PS}}{Y_{XS}}\frac{dX}{d\tau} \quad (3.4)$$

$$X = \frac{x}{x_{max}} \quad (3.5)$$

$$S = \frac{s}{s_{max}} \quad (3.6)$$

$$P = \frac{p}{p_{max}} \quad (3.7)$$

$$\tau = \frac{t}{t_{max}} \quad (3.8)$$

$$M_S = m_s t_{max} \quad (3.9)$$

$$Y_{XS} = y_{xs}\frac{s_{max}}{x_{max}} \quad (3.10)$$

$$Y_{PS} = y_{ps}\frac{s_{max}}{p_{max}} \quad (3.11)$$

$$\mu_{max} = \mu_m t_{max} \quad (3.12)$$

$$K_S = \frac{k_s}{s_{max}} \quad (3.13)$$

$$K_i = \frac{k_i}{s_{max}} \quad (3.14)$$

$$P_{max} = \frac{p_m}{p_{max}} \quad (3.15)$$

em que X é a concentração de células, S a concentração de sacarose, P a concentração de etanol, y_{ps} o rendimento em etanol, y_{xs} o rendimento em células, μ_{max} é a taxa específica máxima de crescimento celular, K_S é a constante de saturação para o crescimento celular, K_i a constante de inibição do crescimento celular pelo substrato, P_{max} a concentração de produto onde cessa o crescimento microbiano, n a potência do termo de inibição pelo produto e M_S a constante de manutenção celular.

b) Modelo para a Fermentação no Processo em Batelada Alimentada

$$\frac{dX}{d\tau} = -\frac{F_a}{V}X + \mu_a X \quad (3.16)$$

$$\frac{dS}{d\tau} = \frac{F_a}{V}(S_F - S) - \sigma_a X \quad (3.17)$$

$$\frac{dP}{d\tau} = -\frac{F_a}{V}P + \pi_a X \quad (3.18)$$

$$\frac{dV}{d\tau} = F_a \quad (3.19)$$

$$X = \frac{x}{x_{max}} \quad (3.20)$$

$$\mu_a = \mu_{max}\left(\frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}}\right)\left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)^n \quad (3.21)$$

$$\sigma_a = \left(\frac{1}{Y_{XS}}\mu_a + M_S\right) \quad (3.22)$$

$$\pi_a = \frac{Y_{PS}}{Y_{XS}}\mu_a \quad (3.23)$$

$$S_F = \frac{s_F}{s_{max}} \quad (3.24)$$

$$V = \frac{v}{v_{max}} \quad (3.25)$$

$$S = \frac{s}{s_{max}} \quad (3.26)$$

$$P = \frac{p}{p_{max}} \quad (3.27)$$

$$\tau = \frac{t}{t_{max}} \quad (3.28)$$

$$F_a = F\frac{t_{max}}{v_{max}} \quad (3.29)$$

$$Y_{XS} = y_{xs}\frac{s_{max}}{x_{max}} \quad (3.30)$$

$$Y_{PS} = y_{ps}\frac{s_{max}}{p_{max}} \quad (3.31)$$

$$\mu_{max} = \mu_m t_{max} \quad (3.32)$$

$$K_S = \frac{k_s}{s_{max}} \quad (3.33)$$

$$K_i = \frac{k_i}{s_{max}} \quad (3.34)$$

$$P_{max} = \frac{p_m}{p_{max}} \quad (3.35)$$

$$M_S = m_s t_{max} \quad (3.36)$$

em que F_a é a taxa de alimentação de substrato, V é o volume de trabalho do fermentador, S_F, a concentração de substrato na alimentação.

3.2.5 Metodologia Aplicada na Estimação dos Parâmetros

Para a estimação dos parâmetros cinéticos a partir dos experimentos em batelada e batelada alimentada foi escolhida a Técnica de Evolução Diferencial (ED) proposta por Storn e Price (1995) apresentada no Anexo, utilizada na otimização de problemas algébricos sem restrições.

Na literatura podem ser destacadas várias aplicações, dentre as quais, a estimação de parâmetros cinéticos no processo de fermentação (Chiou e Wang, 1999, Wang *et al.*, 2001) e de transferência de calor por radiação (Lobato *et al.*, 2007a), otimização dinâmica de um fermentador em batelada alimentada (Kapadi e Gudi, 2004), o projeto de sistemas mecânicos (Oliveira, 2006) e a otimização de estruturas veiculares (Oliveira *et al.*, 2007). No contexto da otimização multi-objetivo, podem-se citar: otimização de um reator adiabático industrial (Babu *et al.*, 2005), aplicação em um problema de controle ótimo com restrição de desigualdade e flutuação de índice diferencial (Lobato *et al.*, 2007b), projeto de sistemas mecânicos (Lobato e Steffen, 2007), estimação de parâmetros cinéticos e dos coeficientes de perda de calor em um secador rotatório (Arruda, 2008), entre outras aplicações (Storn *et al.*, 2005).

Neste trabalho, foi utilizada a versão implementada em ambiente Matlab® por Storn e Price (1996). O programa foi executado dez vezes para cada estimação dos parâmetros com a finalidade de obter o resultado adequado. Os limites considerados dos valores dos parâmetros

foram os menores e os maiores valores dos respectivos parâmetros encontrados na literatura (Tab. 2.2), sendo que estes valores foram adimensionalizados.

3.3 Resultados e Discussões

3.3.1 Estimação dos Parâmetros do Modelo para as Fermentações em Batelada

A estimativa dos parâmetros do modelo para as fermentações em batelada foi realizada a partir dos dados dos três experimentos em batelada não considerando a fase *Lag* de 1 hora. Os rendimentos experimentais finais em célula e em etanol foram utilizados na estimação.

a) Resultados obtidos considerando a estimação dos parâmetros para cada experimento em batelada.

Na Tab. 3.2 são apresentados as condições iniciais e os parâmetros adimensionais estimados pelo método de Evolução Diferencial com o tamanho da população (NP) igual a 20, estratégia sete (Anexo, Tab. 1), 200 iterações, taxa de perturbação (TP) igual a 0,8 e probabilidade de cruzamento (CR) igual a 0,8. E na Tab. 3.3, os mesmos dados são apresentados na forma dimensional.

Tabela 3.2 – Valores dos parâmetros cinéticos do modelo adimensional e condições iniciais para a estimação dos parâmetros.

	Batelada 1	Batelada 2	Batelada 3
t_1	0,11	0,09	0,09
S_1	0,9556	0,9813	0,9326
X_1	0,8117	0,7941	0,8229
P_1	0,2023	0,1624	0,1848
Y_{PS}	0,8624	0,8860	0,8970
Y_{XS}	0,1698	0,1952	0,1427
Parâmetros estimados (200 iterações)			
População	20	20	20
Função objetivo	0,009815	0,01477	0,02677
μ_{max} [0,001; 20]*	0,7593	1,035	0,6374
K_S [$6x10^{-5}$; 0,13]	0,1	0,1013	0,1283
K_i [0,001; 4,0]	0,9091	0,7839	0,6433
P_{max} [0,8;1,62]	1,205	1,257	1,556
n [0,1; 4,0]	0,6484	0,8103	0,7960
M_s [$1x10^{-6}$; 7,0]	0,06493	0,08304	0,02999

* Limites de pesquisa

Tabela 3.3 – Valores dos parâmetros cinéticos na forma dimensional e dados experimentais.

	Batelada 1	Batelada 2	Batelada 3
s_0 (g/L)	154 ± 2	180,1 ± 0,9	195,6 ± 0,1
x_0 (g/L)	24,8 ± 0,7	24,9 ± 0,7	25,3 ± 0,7
p_0 (g/L)	10,56 ± 0,01	9,506 ± 0,001	9,506 ± 0,001
y_{ps} (g/g)	0,416 ± 0,005	0,397 ± 0,006	0,376 ± 0,004
y_{xs} (g/g)	0,033 ± 0,006	0,034 ± 0,006	0,021 ± 0,005
s_r (g/L)	0,763 ± 0,001	0,75 ± 0,04	2,80 ± 0,05
t_f (h)	9	11	11
Parâmetros estimados			
μ_m (1/h)	0,08437	0,09414	0,05794
k_S (g/L)	15,44	18,25	25,10
k_i (g/L)	140,4	141,2	125,86
p_m (g/L)	89,65	101,5	127,8
n	0,6484	0,8103	0,7960
m_s (1/h)	0,007214	0,007549	0,002726

em que y_{ps} e y_{xs} foram calculados da seguinte forma:

$$y_{ps} = \left| \frac{p(t) - p_0}{s(t) - s_0} \right| \tag{3.37}$$

$$y_{xs} = \left| \frac{x(t) - x_0}{s(t) - s_0} \right| \tag{3.38}$$

Com o aumento da concentração inicial de sacarose no fermentador, houve uma pequena diminuição no rendimento em etanol. O rendimento em célula foi menor para a maior concentração de sacarose no início da fermentação.

Foram obtidos diferentes conjuntos de parâmetros para cada fermentação, evidenciando a importância das condições iniciais na identificação destes parâmetros.

Pela comparação dos parâmetros estimados neste trabalho (s_0 = 154 e 180,1 g/L) com os estimados no trabalho de Tosetto (2002) (s_0 = 166,49 e 168,17 g/L; Tab. 2.2 - Eq. 2.36), observou-se que os primeiros apresentaram valores de k_s e k_i mais coerentes com os obtidos na literatura, isto é, valores menores para k_s e maiores para k_i. Na expressão de Monod (Tab. 2.2 - Eq. 2.2), o valor de k_s corresponde à concentração de substrato limitante quando a taxa de crescimento específica é igual à metade do seu valor. Já o parâmetro k_i corresponde á concentração de substrato em que se inicia a inibição pelo mesmo. Neste caso, k_i não poderia ser menor que k_s.

Ferreira (1998) determinou por meio de experimentos, a máxima concentração de etanol acima da qual não há crescimento celular, que foi estabelecida em 115 g/L. Logo, os valores estimados neste estudo, para a concentração máxima de etanol (p_m), foram próximos do valor obtido experimentalmente.

Dos resultados de concentração celular em função do tempo (Figs. 3.8, 3.11 e 3.14), foram determinadas as taxas específicas máximas de crescimento celular para cada experimento em batelada, construindo-se uma curva do logaritmo neperiano da concentração de células em função da diferença entre o tempo decorrido e o tempo da fase *Lag* (Tab. 3.4 e Figs. 3.4-3.6), expressa pela Eq. 3.39. O coeficiente angular μ_m representa a taxa específica máxima de crescimento e x_0, a concentração de células no inóculo.

$$ln(x) = \mu_m(t - t_{Lag}) + ln(x_0) \tag{3.39}$$

Pelas Figs. 3.4-3.6, nota-se que as taxas específicas máximas de crescimento estimadas pelo método de Evolução Diferencial são tão baixas quanto às obtidas pelos resultados experimentais. Estes resultados foram muito menores que os apresentados na Tabela 2.2 para este parâmetro. Isto ocorreu devido à utilização de altas concentrações de células no inóculo.

Deve-se destacar que o modelo usado no trabalho de Tosetto (2002) não considerou a constante de manutenção celular (m_s), e nos experimentos utilizados para o ajuste dos parâmetros não foi considerada a presença de álcool no inóculo. Estes fatores, talvez possam explicar em parte a diferença entre os resultados obtidos.

Tabela 3.4 - Taxas específicas máximas de crescimento obtidas pelos resultados experimentais.

Fermentações	μ_m (1/h)
s_0 = 154 g/L	0,0273
s_0 = 180,1 g/L	0,0230
s_0 = 195,6 g/L	0,0206

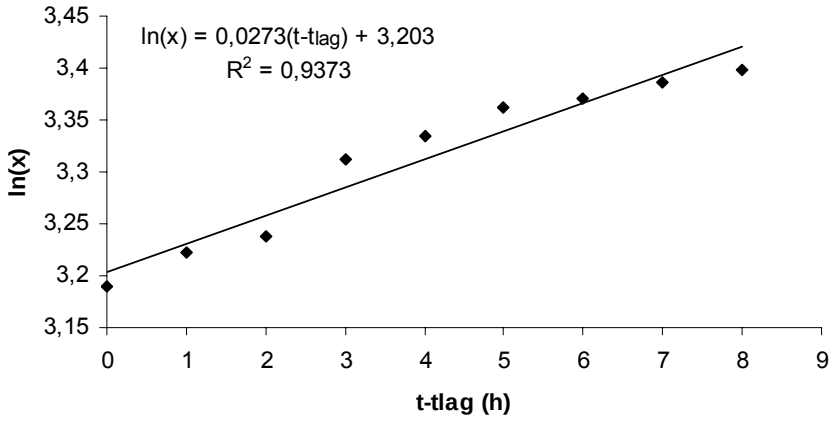


Figura 3.4 - Taxa específica máxima de crescimento celular experimental para a fermentação em batelada com s_0 = 154 g/L.

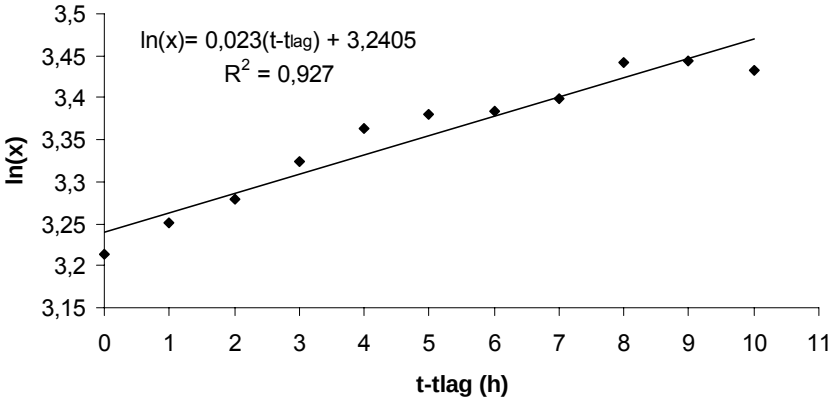


Figura 3.5 - Taxa específica máxima de crescimento celular experimental para a fermentação em batelada com s_0 = 180,1 g/L.

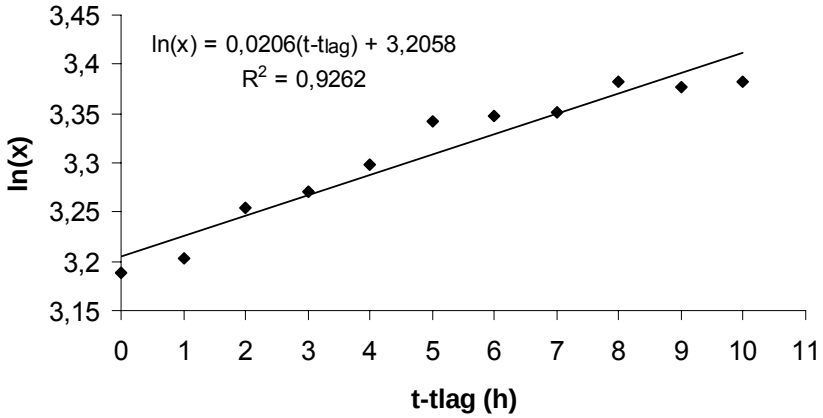


Figura 3.6 - Taxa específica máxima de crescimento celular experimental para a fermentação em batelada com s_0 = 195,6 g/L.

As Figs. 3.7-3.15 apresentam os resultados preditos pelo modelo em batelada e os dados experimentais, para as concentrações iniciais de sacarose iguais a 154, 180,1 e 195,6 g/L. Considerando os erros dos resultados experimentais, o modelo proposto descreveu estes resultados de forma satisfatória. Maiores desvios do ajuste do modelo foram observados para o perfil de concentração de sacarose para a fermentação em batelada com s_0 = 180,1 g/L (Fig. 3.10), e perfil de concentração de células para a fermentação em batelada com s_0 = 195,6 g/L (Fig. 3.14). Tais desvios explicam a diferença dos valores das funções objetivo obtidos em cada conjunto de parâmetros estimados (Tab. 3.2), já que a função objetivo é definida como a soma dos quadrados das diferenças entre o valor estimado e o experimental de cada variável de estado s, x e p.

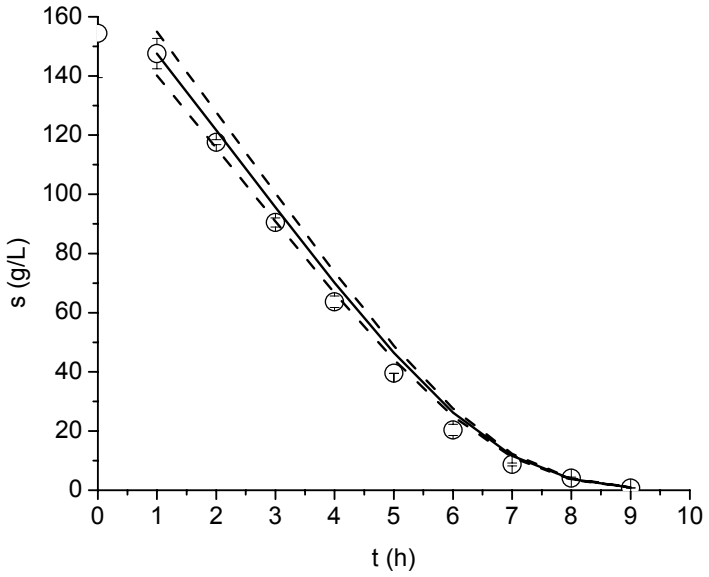


Figura 3.7 - Perfil da concentração de sacarose para s_0 = 154 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado.

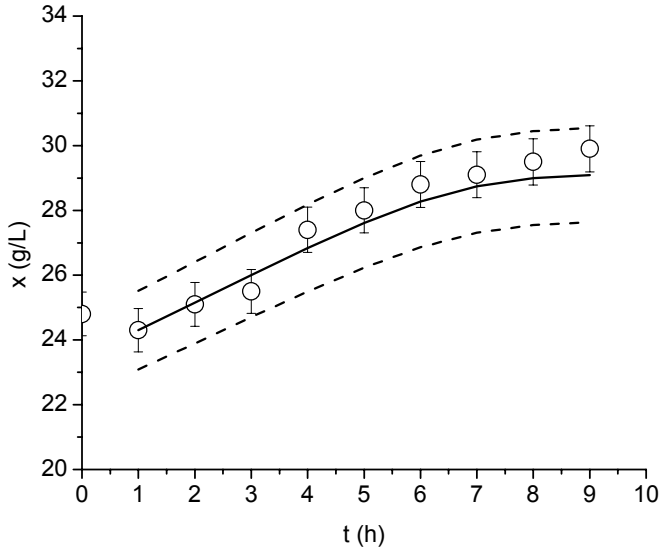


Figura 3.8 - Perfil da concentração de células para s_0 = 154 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado.

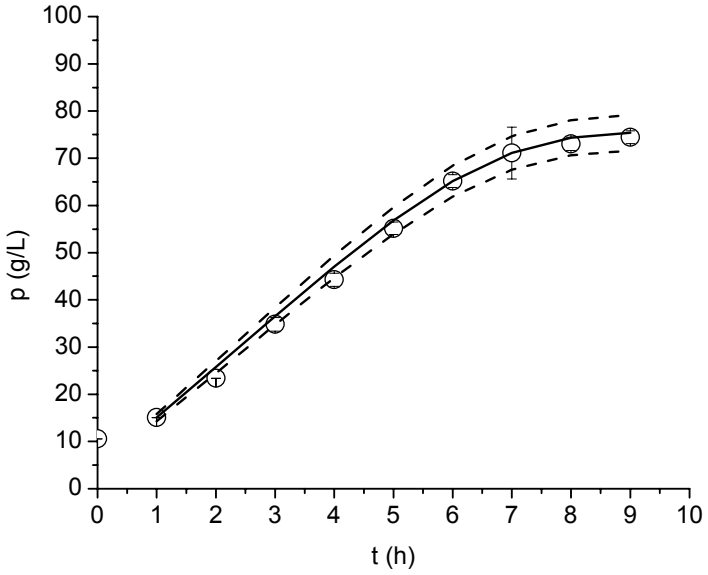


Figura 3.9 - Perfil da concentração de etanol para s_0 = 154 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado.

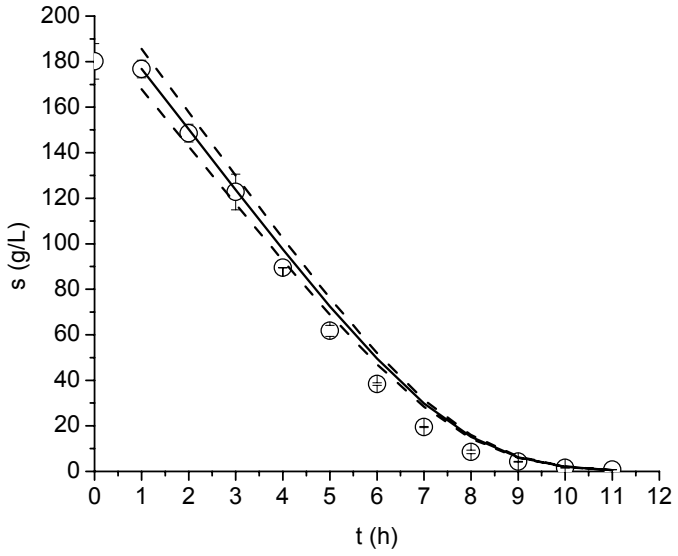


Figura 3.10 - Perfil da concentração de sacarose para s_0 = 180,1 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado.

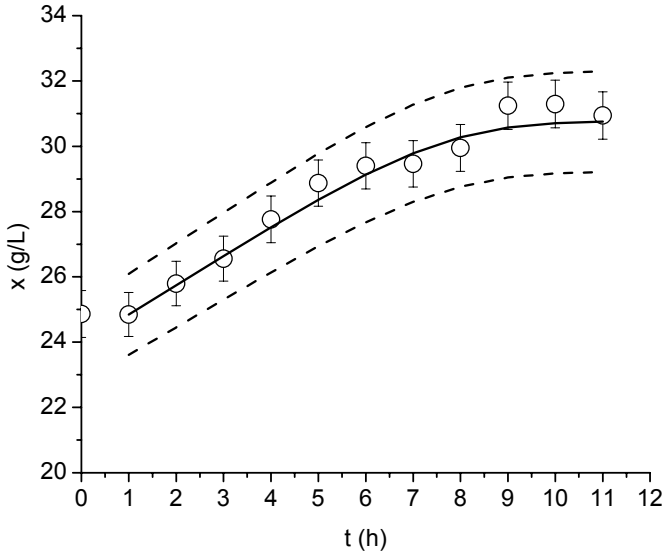


Figura 3.11 - Perfil da concentração de células para s_0 = 180,1 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado.

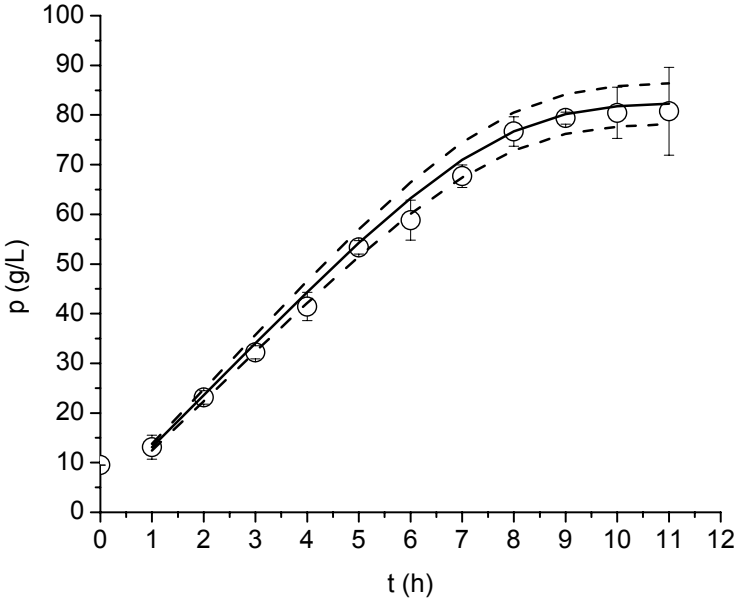


Figura 3.12 - Perfil da concentração de etanol para s_0 = 180,1 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado.

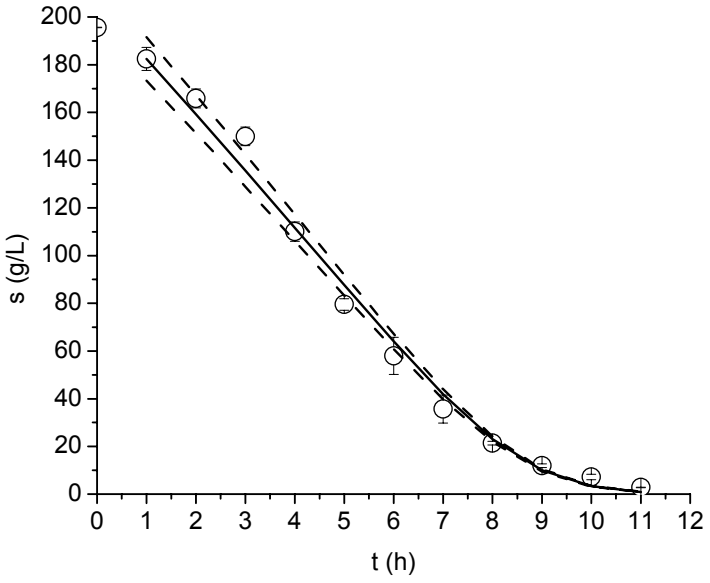


Figura 3.13 - Perfil da concentração de sacarose para s_0 = 195,6 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado.

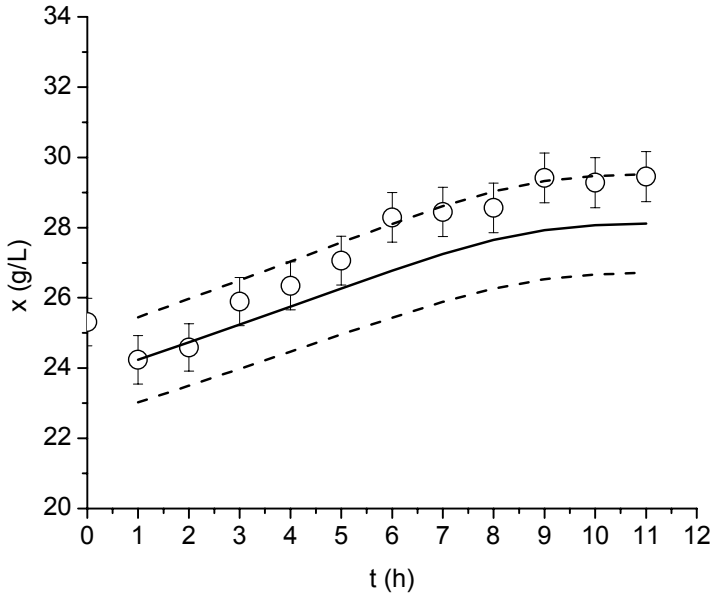


Figura 3.14 - Perfil da concentração de células para s_0 = 195,6 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado.

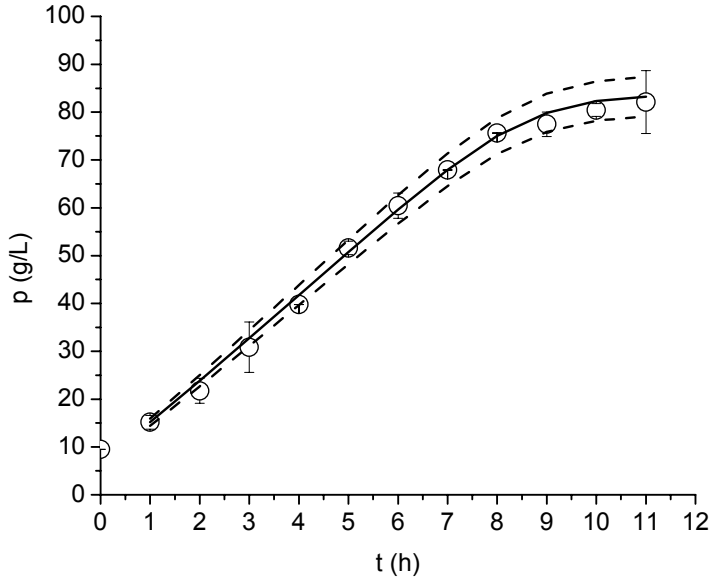


Figura 3.15 - Perfil da concentração de etanol para s_0 = 195,6 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado.

b) Resultados obtidos considerando a estimação dos parâmetros para o conjunto dos experimentos em batelada.

Como os três conjuntos de parâmetros estimados para cada batelada tiveram valores relativamente próximos, foi feita uma estimação dos parâmetros a partir de todos os três experimentos em batelada simultaneamente, cujos resultados não foram satisfatórios, observados pelos grandes desvios dos perfis simulados em relação aos pontos experimentais. Contudo, a estimativa dos parâmetros a partir dos dois experimentos com as respectivas concentrações de sacarose iniciais, 154 e 180,1 g/L, apresentou bons resultados. Provavelmente, porque estes dois conjuntos de parâmetros, obtidos anteriormente, tiveram valores mais próximos que o conjunto de parâmetros estimados pelo experimento com s_0 = 195,6 g/L.

Na Tab. 3.5 estão os resultados na forma adimensional, obtidos pelo método de Evolução Diferencial, e na forma dimensional para cada batelada.

Tabela 3.5 – Parâmetros estimados pelos 2 experimentos em batelada com s_0 = 154 e 180,1 g/L.

Parâmetros estimados na **forma adimensional** (250 iterações)			
População		20	
Função objetivo		6,0096	
μ_{max}	[0,0011; 22]*	1,651	
K_S	[3x10^{-5}; 0,12]	0,06656	
K_i	[0,0006; 4,0]	0,4425	
P_{max}	[0,7;1,62]	1,575	
n	[0,1; 4,0]	1,952	
M_s	[1x10^{-7}; 8,0]	0,08263	
Parâmetros estimados na **forma dimensional**			
		s_0 = 154 ± 2 g/L	s_0 = 180,1 ± 0,9 g/L
μ_m (1/h)		0,1835	0,1501
k_s (g/L)		10,28	11,99
k_i (g/L)		68,33	79,72
p_m (g/L)		117,2	127,2
n		1,951	1,951
m_s (1/h)		0,009181	0,007511

* Limites de pesquisa

As Figs. 3.16-3.21 apresentam os resultados simulados pelo modelo e os dados experimentais, para as concentrações iniciais de sacarose iguais a 154 e 180,1 g/L. Pode ser verificado por estas figuras, que o modelo proposto, considerando estes novos conjuntos de parâmetros, representou de forma satisfatória os resultados experimentais. Houve um maior

desvio do ajuste do modelo apenas para os perfis de concentração de sacarose (Figs. 3.16 e 3.19), fato que justificou o alto valor obtido da função objetivo (Tab.3.5).

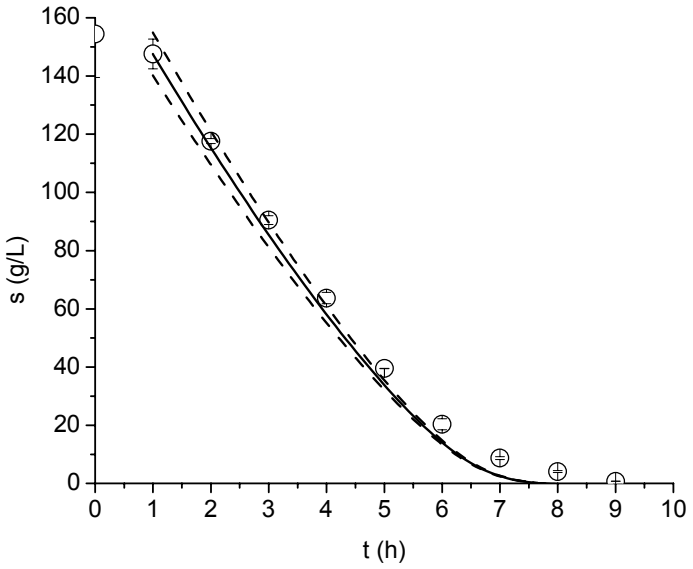


Figura 3.16 – Perfil da concentração de sacarose para s_0 = 154 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED a partir dos 2 experimentos em batelada com s_0 = 154 e 180,1 g/L. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado.

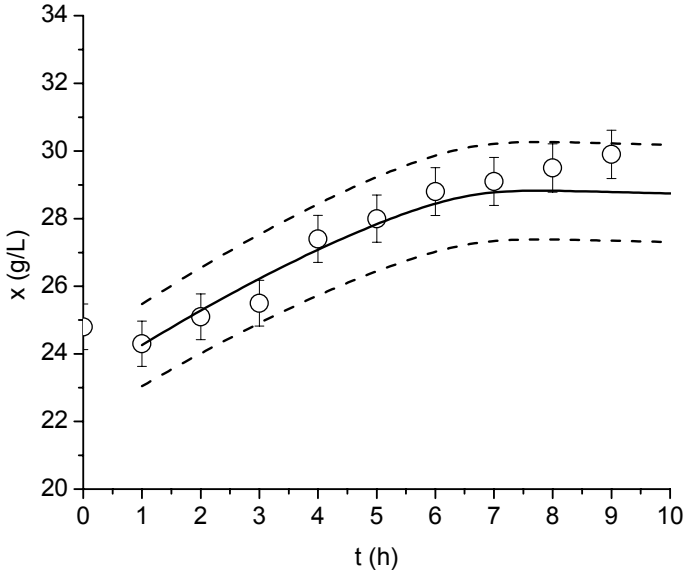


Figura 3.17 - Perfil da concentração de células para s_0 = 154 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED a partir dos 2 experimentos em batelada com s_0 = 154 e 180,1 g/L. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado.

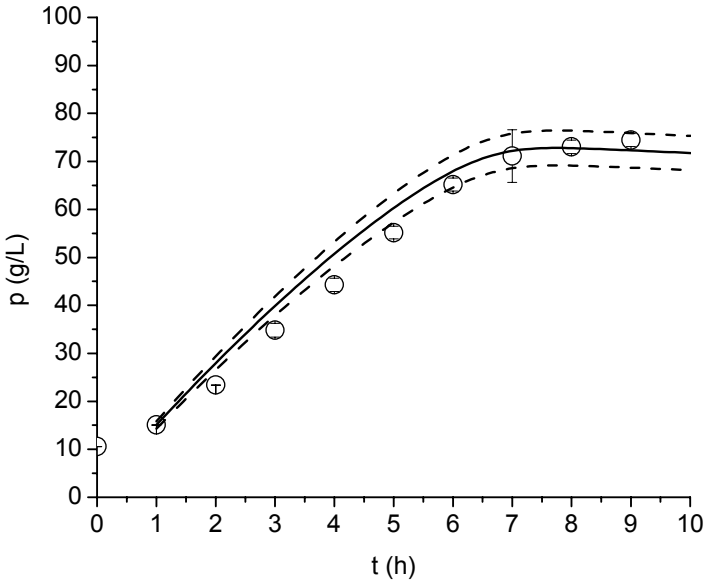


Figura 3.18 - Perfil da concentração de etanol para s_0 = 154 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED a partir dos 2 experimentos em batelada com s_0 = 154 e 180,1 g/L. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado.

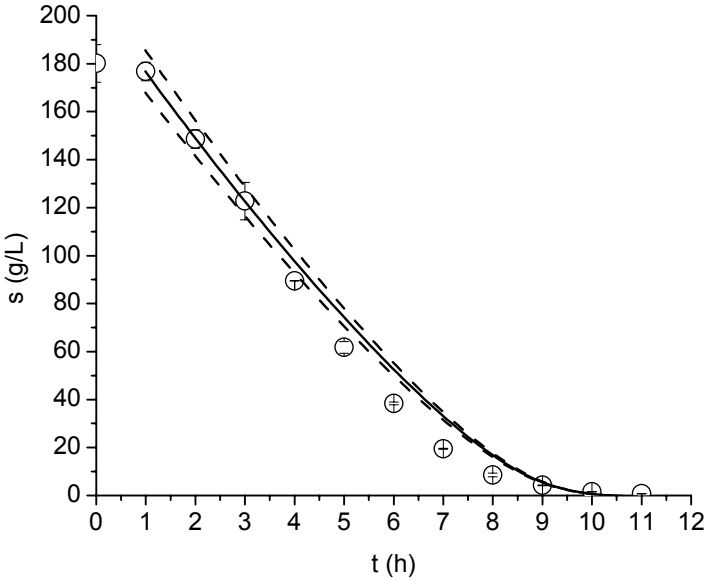


Figura 3.19 - Perfil da concentração de sacarose para s_0 = 180,1 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED a partir dos 2 experimentos em batelada com s_0 = 154 e 180,1 g/L. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado.

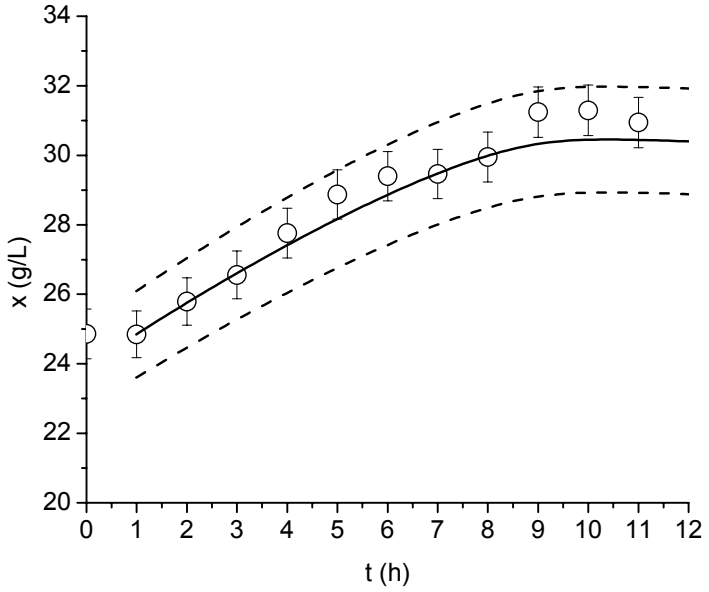


Figura 3.20 - Perfil da concentração de células para s_0 = 180,1 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED a partir dos 2 experimentos em batelada com s_0 = 154 e 180,1 g/L. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado.

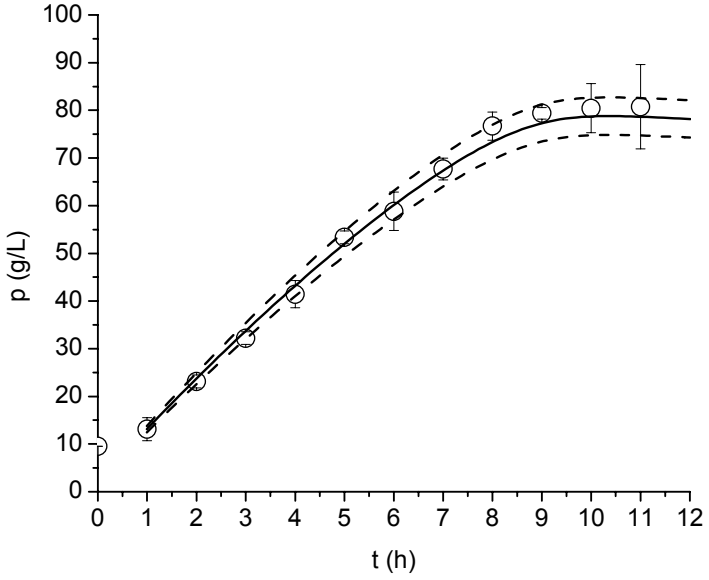


Figura 3.21 - Perfil da concentração de etanol para s_0 = 180,1 g/L (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED a partir dos 2 experimentos em batelada com s_0 = 154 e 180,1 g/L. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado.

Tanto os conjuntos de parâmetros obtidos para cada experimento em batelada, quanto o conjunto de parâmetros obtidos para os dois experimentos em batelada com s_0 = 154 e 180,1 g/L, foram utilizados para ajustar o modelo para o processo em batelada alimentada. Todas essas tentativas foram sem sucesso, o que evidenciou a especificidade de cada modelo com relação aos processos em batelada e em batelada alimentada, principalmente porque neste último houve o efeito da diluição do meio fermentativo pela alimentação de substrato, que provocou alterações com relação ao crescimento das células. Por esta razão, a estimativa dos parâmetros a partir dos experimentos em batelada alimentada foi realizada e apresentada na Seção seguinte.

3.3.2 Estimação dos Parâmetros do Modelo para as Fermentações em Batelada Alimentada

Os parâmetros do modelo para o processo em Batelada Alimentada foram estimados a partir dos experimentos em batelada alimentada para tempos de enchimento próximos a 5 horas, pelo fato de este ser o mais usado industrialmente (Amorim, 2005) e por ter sido o que forneceu melhores resultados neste estudo. Os rendimentos experimentais finais em célula e em etanol foram utilizados na estimação.

a) Resultados obtidos considerando a estimação dos parâmetros para cada experimento em batelada alimentada com t_e = 5h.

Na Tab. 3.6 são apresentados as condições iniciais e os parâmetros adimensionais estimados pelo método de Evolução Diferencial com NP igual a 20, estratégia sete, 200 iterações, TP igual a 0,8 e CR igual a 0,8. E na Tab. 3.7, os mesmos dados são apresentados na forma dimensional.

Tabela 3.6 - Condições iniciais e parâmetros estimados para os experimentos em batelada alimentada na forma adimensional.

	S_F = 1	S_F = 1	S_F = 1
S_0	0	0	0
X_0	1	1	1
P_0	0,4534	0,4520	0,4020
V_0	0,3008	0,3008	0,3009
Y_{PS}	1,242	1,242	1,287
Y_{XS}	0,05948	0,06236	0,05846
F_a	1,059	1,340	1,479
τ_e	0,6604	0,5217	0,4727
Parâmetros estimados (200 iterações)			
População	20	20	20
Função objetivo	0,003767	0,003791	0,005913
μ_{max} [0,0011; 22]*	0,2148	0,2293	0,2971
K_S [3x10^{-5}; 0,12]	0,04802	0,04272	0,1123
K_i [0,0006; 4,0]	3,756	2,872	1,298
P_{max} [0,7;1,62]	1,62	1,6	1,575
n [0,1; 4,0]	0,1	0,1	0,2861
M_s [1x10^{-7}; 8,0]	0,04036	0,02724	0,02964

* Limites de pesquisa

Tabela 3.7 – Condições iniciais e parâmetros estimados para os experimentos em batelada alimentada na forma dimensional.

	s_F=217 ± 1 g/L	s_F=241,4 ± 0,1g/L	s_F=285 ± 4 g/L
s_0 (g/L)	0	0	0
x_0 (g/L)	88,0 ± 2	83,0 ± 1	83,0 ± 1
p_0 (g/L)	35,17 ± 0,01	36,71 ± 0,01	36,78 ± 0,01
v_0 (L)	1,500 ± 0,003	1,500 ± 0,003	1,500 ± 0,003
y_{ps} (g/g)	0,445 ± 0,004	0,418 ± 0,002	0,413 ± 0,007
y_{xs} (g/g)	0,024 ± 0,006	0,021 ± 0,005	0,017 ± 0,004
F (L/h)	0,660 ± 0,004	0,668 ± 0,004	0,670 ± 0,004
t_e (h)	5,283	5,217	5,200
Parâmetros estimados			
μ_m (1/h)	0,02686	0,02293	0,02701
k_s (g/L)	10,40	10,31	32,02
k_i (g/L)	813,8	693,4	370,0
p_m (g/L)	125,7	129,9	144,1
n	0,1	0,1	0,2861
m_s (1/h)	0,005045	0,002724	0,002694

Os conjuntos de parâmetros obtidos foram diferentes para cada fermentação, principalmente para a fermentação com s_F igual a 285 g/L. Da mesma forma que os conjuntos de parâmetros estimados para o processo em batelada, os valores obtidos de k_s e k_i foram fisicamente significativos. Os valores de k_i foram maiores que os determinados no modelo para o processo em batelada, e os valores de n, menores. Isto está de acordo com o processo em

batelada alimentada, que diminui os efeitos de inibição pelo substrato e produto. Os valores estimados para a concentração máxima de etanol (p_m), estiveram relativamente próximos do valor experimental obtido por Ferreira (1998).

As taxas específicas máximas de crescimento celular foram determinadas para os três experimentos em batelada alimentada pela inclinação da reta do logaritmo neperiano da concentração de células em função da diferença entre o tempo da fermentação e o tempo de enchimento (Figs. 3.22-3.24) expressa pela Eq. 3.40. O coeficiente angular μ_m representa a taxa específica máxima de crescimento e x_0, a concentração de células no inóculo.

$$ln(x) = \mu_m(t - t_e) + ln(x_0) \tag{3.40}$$

As taxas específicas máximas de crescimento celular estimadas pelo método ED foram semelhantes às determinadas pelos resultados experimentais (Figs. 3.22-3.24).

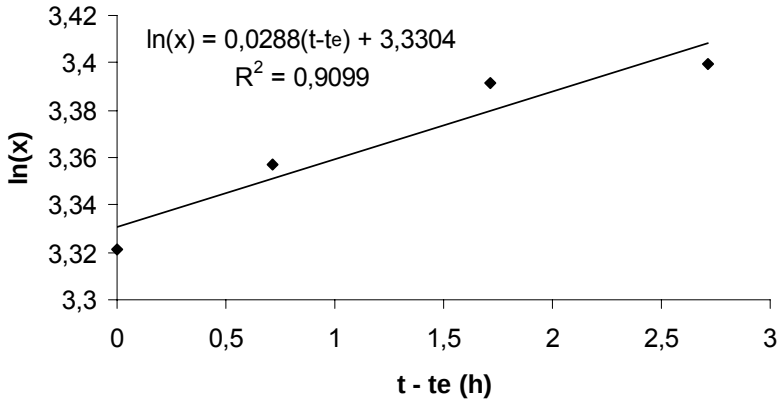


Figura 3.22 - Taxa específica máxima de crescimento celular experimental após o tempo de enchimento de 5 horas para a fermentação em batelada alimentada com s_F = 217 g/L.

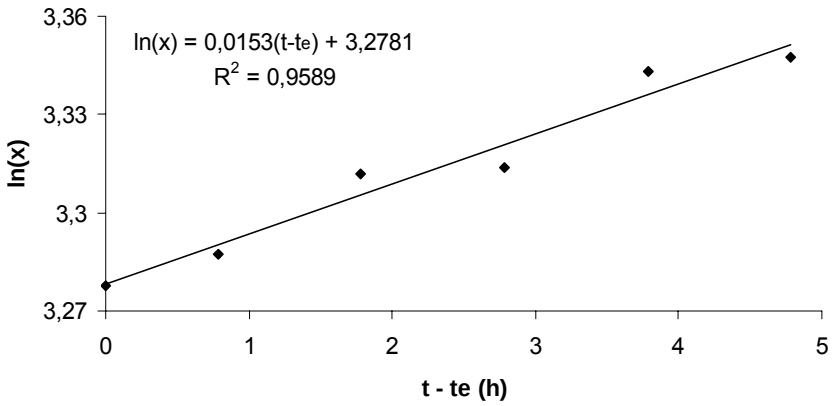


Figura 3.23 - Taxa específica máxima de crescimento celular experimental após o tempo de enchimento de 5 horas para a fermentação em batelada alimentada com s_F = 241,4 g/L.

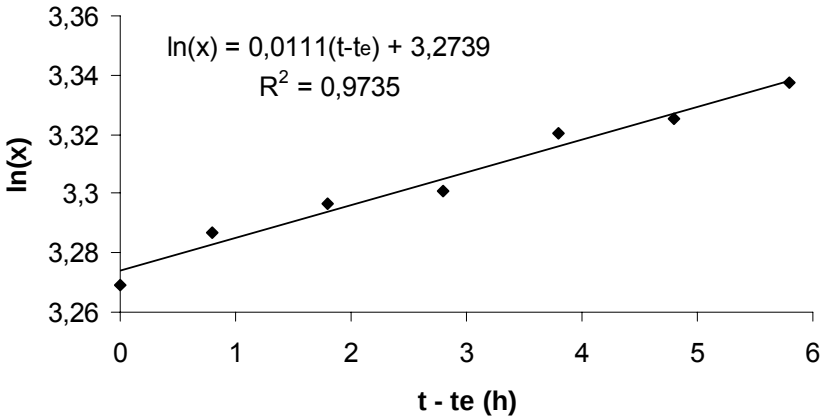


Figura 3.24 - Taxa específica máxima de crescimento celular experimental após o tempo de enchimento de 5 horas para a fermentação em batelada alimentada com s_F = 285 g/L.

Os resultados preditos pelo modelo em batelada alimentada e os resultados experimentais com t_e igual a 5 h, para as concentrações de sacarose no meio alimentado iguais a 217, 241,4 e 285 g/L, são apresentados nas Figs. 3.25-3.27. Considerando os erros dos resultados experimentais, o modelo proposto representou satisfatoriamente estes resultados, verificado também, pelos baixos valores das funções objetivo (Tab. 3.6).

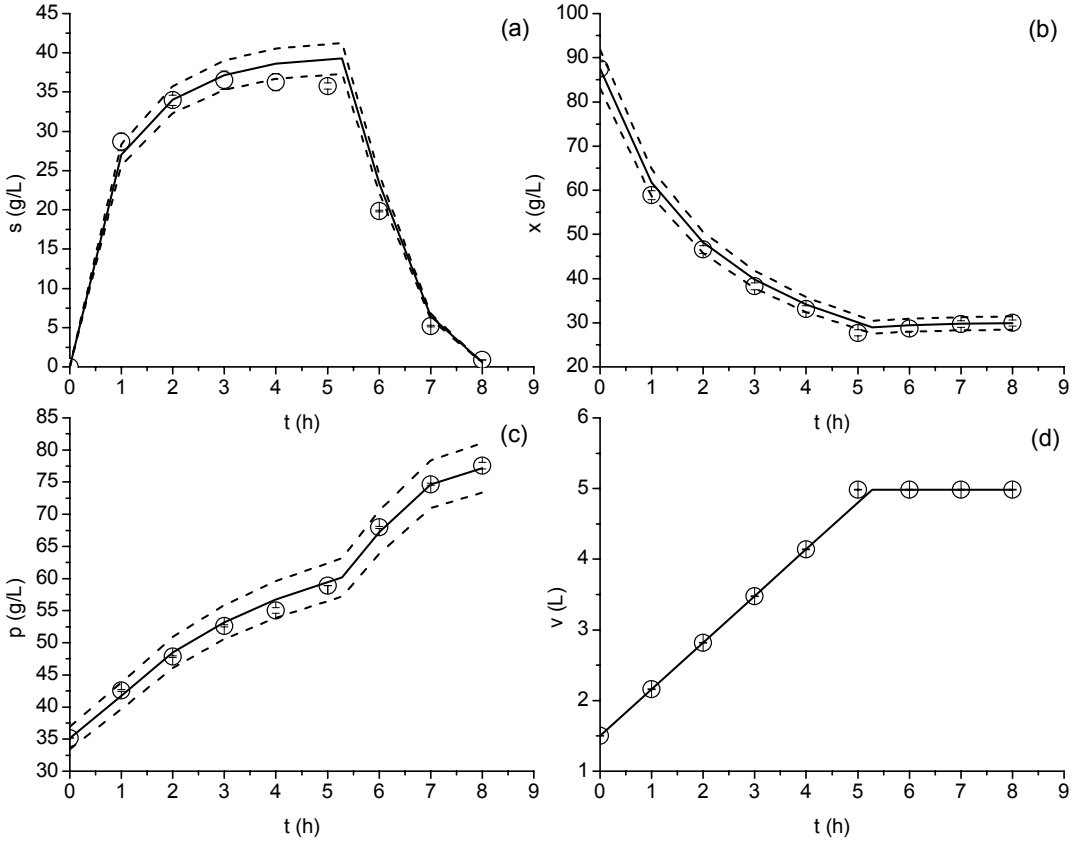


Figura 3.25 – Perfis das variáveis de estado para s_F = 217 g/L e t_e = 5 h. (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado. (a) Sacarose (b) Células (c) Etanol (d) Volume.

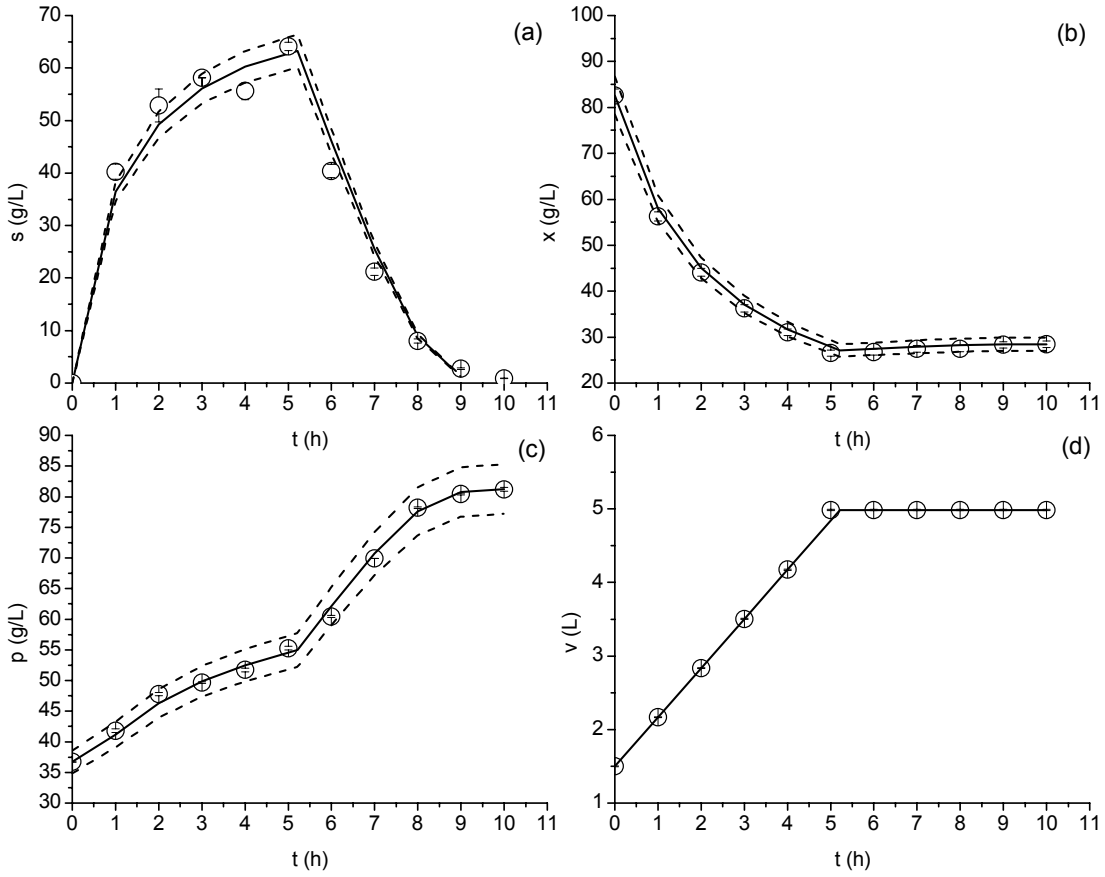


Figura 3.26 – Perfis das variáveis de estado para s_F = 241,4 g/L e t_e = 5 h. (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado. (a) Sacarose (b) Células (c) Etanol (d) Volume.

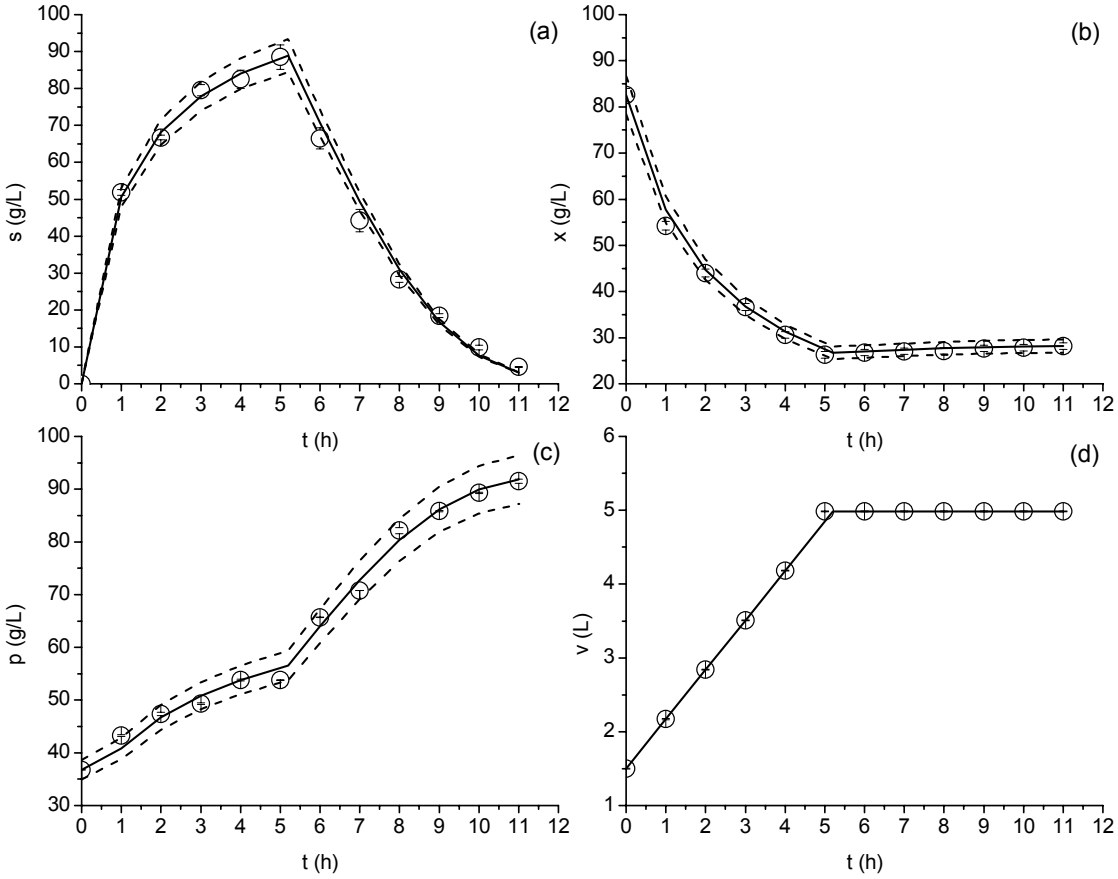


Figura 3.27 – Perfis das variáveis de estado para s_F = 285 g/L e t_e = 5 h. (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado. (a) Sacarose (b) Células (c) Etanol (d) Volume.

Para ilustrar o efeito da inibição pelo produto no crescimento celular, as variações das taxas específicas de crescimento e as concentrações de sacarose em função das concentrações de etanol foram plotadas nas Figs. 3.28-3.30. Para isso, utilizou-se a Eq. 3.21 com os parâmetros estimados da Tab. 3.7 para cada fermentação com tempo de enchimento igual a 5 horas. Foi observado que à medida que a concentração de etanol aumentou até o tempo de enchimento ser alcançado, a taxa específica de crescimento celular aumentou. Após o tempo de enchimento, com o aumento da concentração de álcool, a taxa específica de crescimento diminuiu. Ou seja, o perfil da taxa específica de crescimento celular foi semelhante ao da concentração de sacarose em função do produto formado. Também observou-se que com o aumento da concentração de sacarose na alimentação, o valor da taxa específica de crescimento diminuiu, evidenciando a presença da inibição pelo substrato.

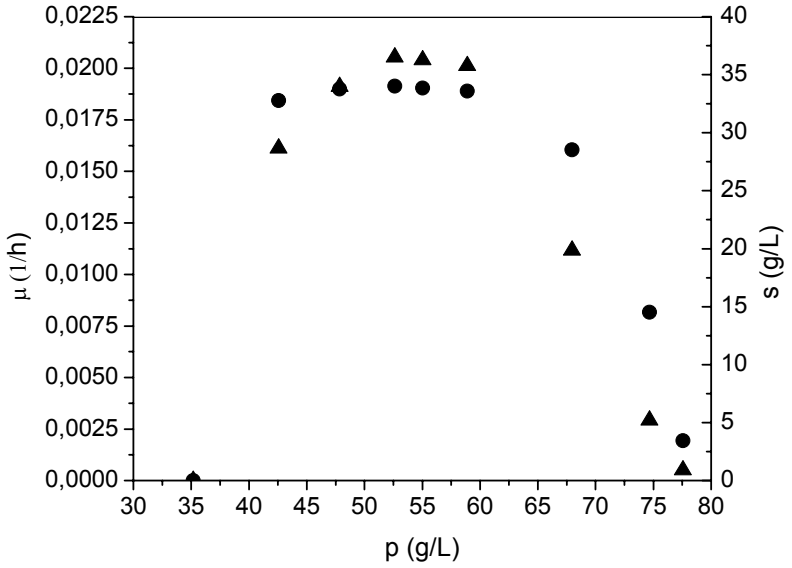


Figura 3.28 - (●) Taxa de crescimento específico e (▲) concentração de sacarose em função da concentração de etanol para a fermentação em batelada alimentada com t_e = 5 h e s_F = 217 g/L.

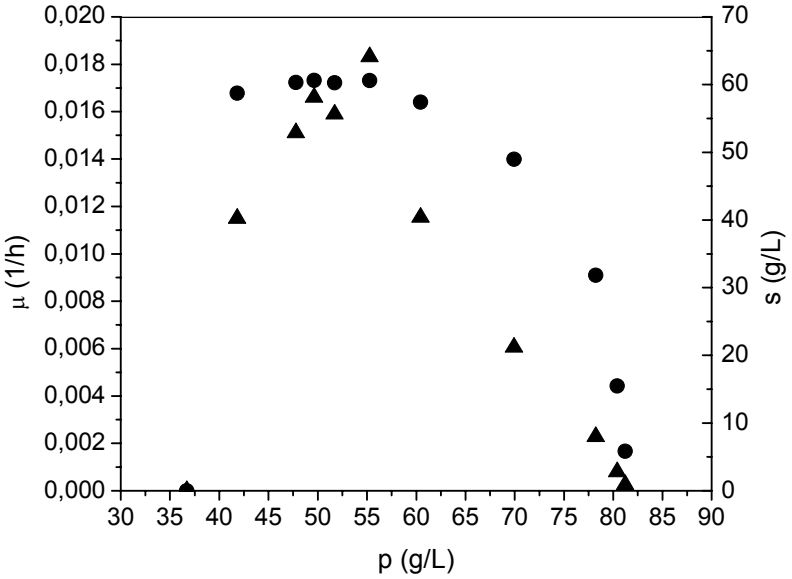


Figura 3.29 - (●) Taxa de crescimento específico e (▲) concentração de sacarose em função da concentração de etanol para a fermentação em batelada alimentada com t_e = 5 h e s_F = 241,4 g/L.

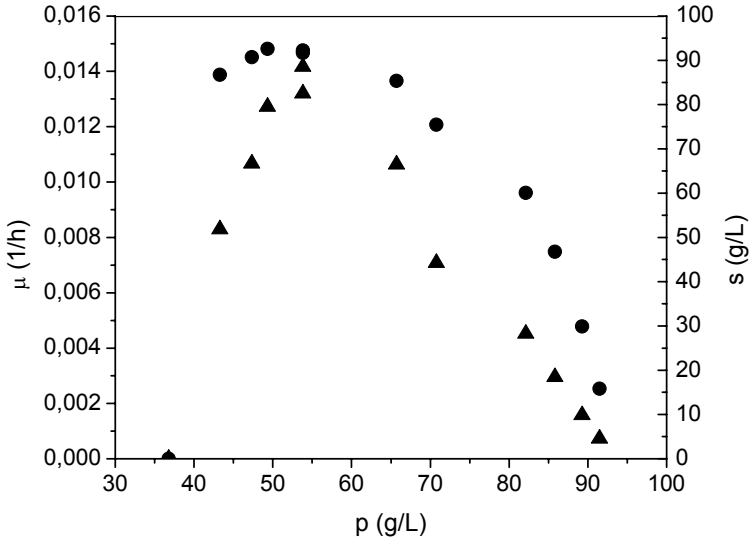


Figura 3.30 - (●) Taxa de crescimento específico e (▲) concentração de sacarose em função da concentração de etanol para a fermentação em batelada alimentada com t_e = 5 h e s_F = 285 g/L.

b) Resultados obtidos considerando a estimação dos parâmetros para cada experimento em batelada alimentada com s_F ≈ 245 g/L.

Com base nos experimentos em batelada alimentada com concentrações de substrato na alimentação próximas a 245 g/L, os parâmetros cinéticos foram determinados para cada fermentação com tempos de enchimento de 3, 4 e 5 horas. As condições iniciais e os parâmetros estimados por ED na forma adimensional são apresentados na Tab. 3.8. E na Tab. 3.9, os mesmos dados são exibidos na forma dimensional.

Pelos dados exibidos na Tab. 3.9, observou-se que os valores dos parâmetros estimados para cada fermentação foram muito semelhantes, com exceção da constante de saturação para o crescimento celular (k_s). Este fato revela que a variação do tempo de enchimento não tem tanta influência na estimativa dos parâmetros, como a variação da concentração de sacarose na alimentação.

No trabalho de Andrietta *et al.* (2003) foi realizada a estimativa dos parâmetros para cada experimento em batelada alimentada com tempos de enchimento iguais a 1, 2 e 3, horas para concentrações de sacarose na alimentação próximas a 245 g/L. Utilizaram o modelo cinético representado na Eq. 2.37 da Tab. 2.1. Também observaram que a variação do tempo de enchimento tem pouca influência na estimativa dos parâmetros cinéticos. O conjunto de parâmetros obtidos para cada experimento foi idêntico, com exceção da máxima concentração

de produto (P_{max}). O modelo proposto se ajustou adequadamente aos dados experimentais, exceto para o perfil de concentração celular, que exibiu um desvio razoável.

Tabela 3.8 – Condições iniciais e parâmetros estimados para os experimentos em batelada alimentada para s_F ≈ 245 g/L na forma adimensional.

	t_e = 0,350	t_e = 0,4	t_e = 0,5217
S_0	0	0	0
X_0	1	1	1
P_0	0,4546	0,4372	0,4520
V_0	0,3003	0,3007	0,3008
Y_{PS}	1,244	1,256	1,242
Y_{XS}	0,05336	0,07495	0,06236
F_a	1,999	1,573	1,340
Parâmetros estimados			
População	20	20	20
Função objetivo	0,01373	0,006555	0,003791
μ_{max} [0,0011; 22]*	0,2037	0,2780	0,2293
K_S [3x10^{-5}; 0,12]	0,07	0,07	0,04272
K_i [0,0006; 4,0]	3,0	3,0	2,872
P_{max} [0,7;1,62]	1,6	1,55	1,6
n [0,1; 4,0]	0,1	0,1	0,1
M_s [1x10^{-7}; 8,0]	0,02872	0,04431	0,02724

* Limites de pesquisa

Tabela 3.9 – Condições iniciais e parâmetros estimados para os experimentos em batelada alimentada para s_F ≈ 245 g/L na forma dimensional.

	t_e = 3,15 (h)	t_e = 4 (h)	t_e = 5,217 (h)
s_0 (g/L)	0	0	0
x_0 (g/L)	84,0 ± 1	84,0 ± 1	83,0 ± 1
p_0 (g/L)	37,2 ± 0,3	36,7 ± 0,1	36,71 ± 0,01
v_0 (L)	1,500 ± 0,003	1,500 ± 0,003	1,500 ± 0,003
y_{ps} (g/g)	0,415 ± 0,008	0,431 ± 0,008	0,418 ± 0,002
y_{xs} (g/g)	0,018 ± 0,005	0,026 ± 0,005	0,021 ± 0,005
F (L/h)	1,110 ± 0,004	0,872 ± 0,004	0,668 ± 0,004
Parâmetros estimados			
μ_m (1/h)	0,02263	0,03088	0,02293
k_s (g/L)	17,16	17,12	10,31
k_i (g/L)	735,6	733,8	693,4
p_m (g/L)	130,8	130,2	129,9
n	0,1	0,1	0,1
m_s (1/h)	0,003191	0,004923	0,002724

As Figs. 3.31, 3.32 e 3.26 apresentam os resultados simulados pelo modelo e os resultados experimentais, para cada tempo de enchimento com s_F próxima a 245 g/L. Destas figuras observou-se que o modelo utilizado representou de forma satisfatória os resultados experimentais. O perfil de concentração de sacarose mostrou um maior desvio do ajuste do

modelo para os tempos de enchimento de 3 e 4 horas (Figs. 3.31-a e 3.32-a), observado também pelos maiores valores das funções objetivo relativas a essas estimativas (Tab. 3.8).

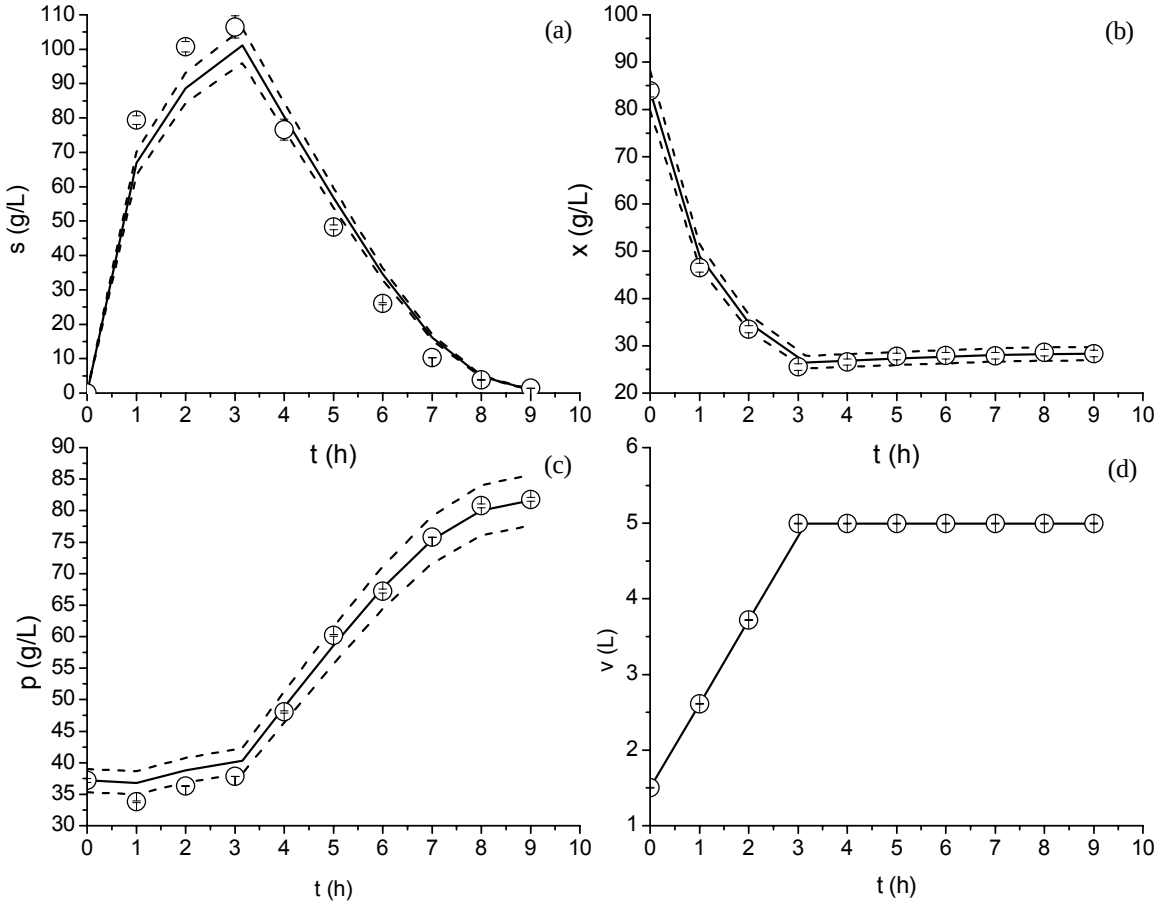


Figura 3.31 – Perfis das variáveis de estado para s_F = 245 g/L e t_e = 3 h. (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado. (a) Sacarose (b) Células (c) Etanol (d) Volume.

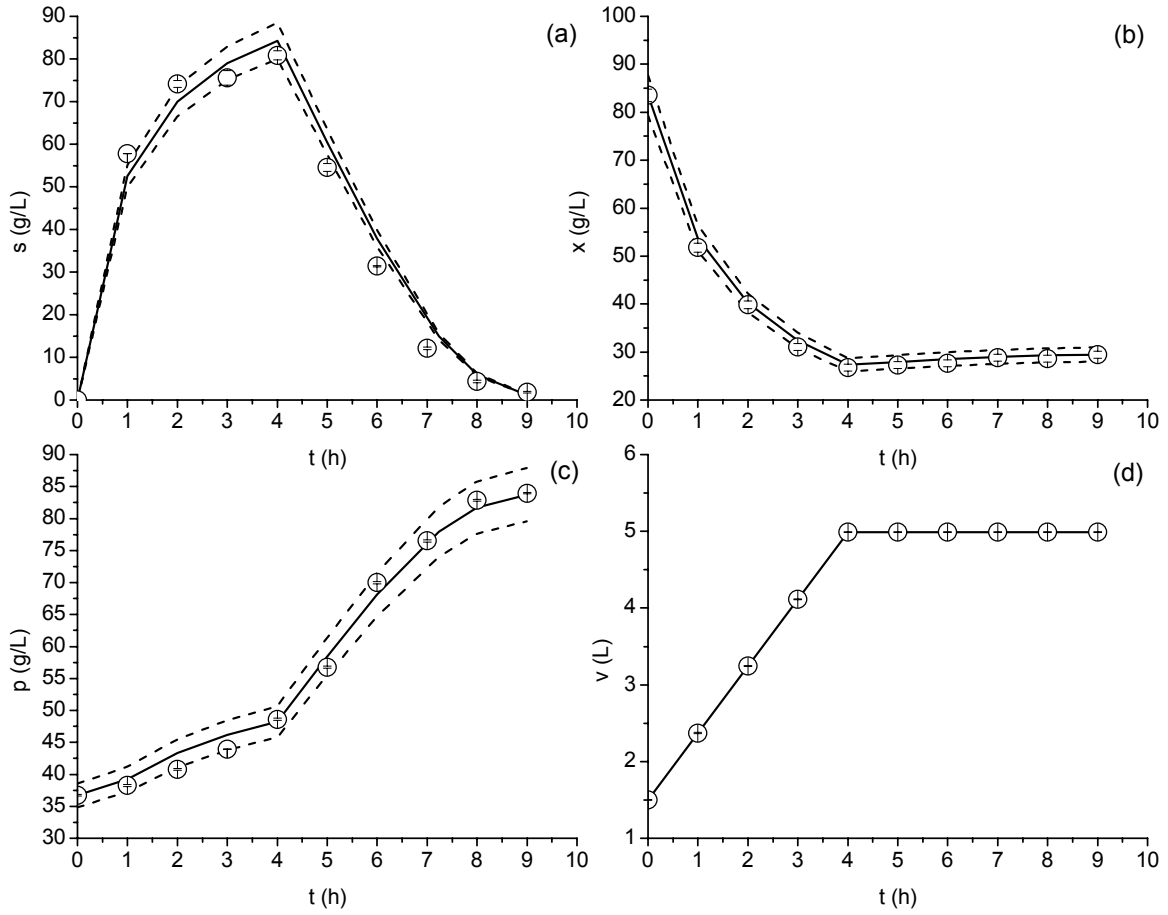


Figura 3.32 – Perfis das variáveis de estado para s_F = 245 g/L e t_e = 4 h. (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado. (a) Sacarose (b) Células (c) Etanol (d) Volume.

c) Resultados obtidos considerando a estimação dos parâmetros para o conjunto de experimentos em batelada alimentada com t_e = 5h.

Com a finalidade de obter um conjunto de parâmetros adimensionais que representasse as fermentações em batelada alimentada para toda a faixa de s_F em t_e igual a 5 horas, a estimativa dos parâmetros foi realizada a partir de todos os três experimentos em batelada alimentada. Na Tab. 3.10 estão os resultados na forma adimensional, obtidos por ED, e na forma dimensional para cada experimento.

Tabela 3.10 – Parâmetros estimados considerando os três experimentos em batelada alimentada para t_e = 5h.

Parâmetros estimados na forma adimensional (200 iterações)			
População	20		
Função objetivo	0,03298		
μ_{max} [0,0011; 22]*	0,3085		
K_S [3x10^{-5}; 0,12]	0,1059		
K_i [0,0006; 4,0]	0,6918		
P_{max} [0,7;1,62]	1,612		
n [0,1; 4,0]	0,1		
M_s [1x10^{-7}; 8,0]	0,04258		
Parâmetros estimados na forma dimensional			
	s_F=217 ± 1 g/L	s_F=241,4 ± 0,1g/L	s_F=285 ± 4 g/L
μ_m (1/h)	0,03856	0,03085	0,02805
k_s (g/L)	22,94	25,56	30,19
k_i (g/L)	149,9	167,0	197,2
p_m (g/L)	125,0	130,9	147,5
n	0,1	0,1	0,1
m_s (1/h)	0,005322	0,004258	0,003871

* Limites de pesquisa

As Figs. 3.33-3.35 mostram o ajuste do modelo aos resultados experimentais para as concentrações de sacarose na alimentação iguais a 217, 241,4 e 285 g/L com tempo de enchimento de 5 horas. Por meio destas figuras verificou-se que o novo modelo proposto representou adequadamente os resultados experimentais. Maiores desvios do ajuste do modelo foram observados nos perfis de concentrações de sacarose e de etanol, para s_F iguais a 241,4 e 285 g/L (Figs. 3.34-a e 3.35-a), que resultou em uma função objetivo maior que as respectivas estimativas dos parâmetros para cada experimento (Tab. 3.6).

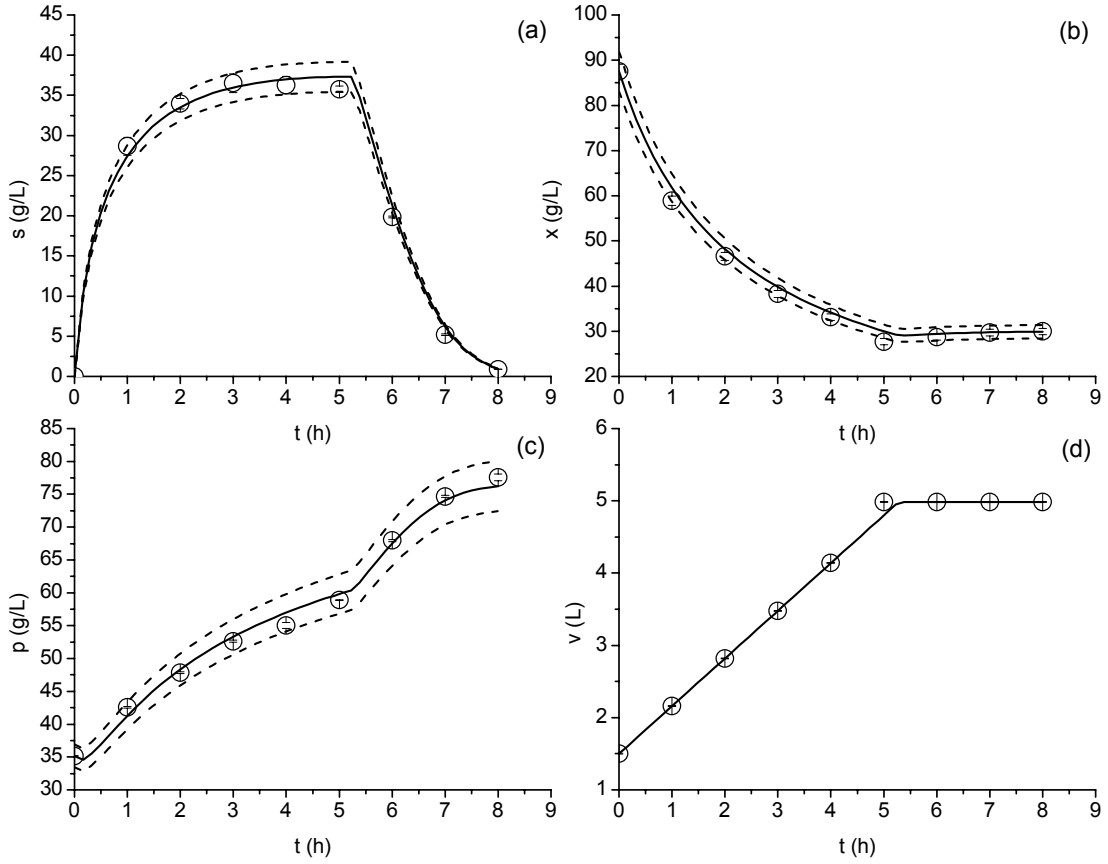


Figura 3.33 – Perfis das variáveis de estado para s_F = 217 g/L e t_e = 5 h. (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED pelos três experimentos em batelada alimentada com t_e = 5h. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado. (a) Sacarose (b) Células (c) Etanol (d) Volume.

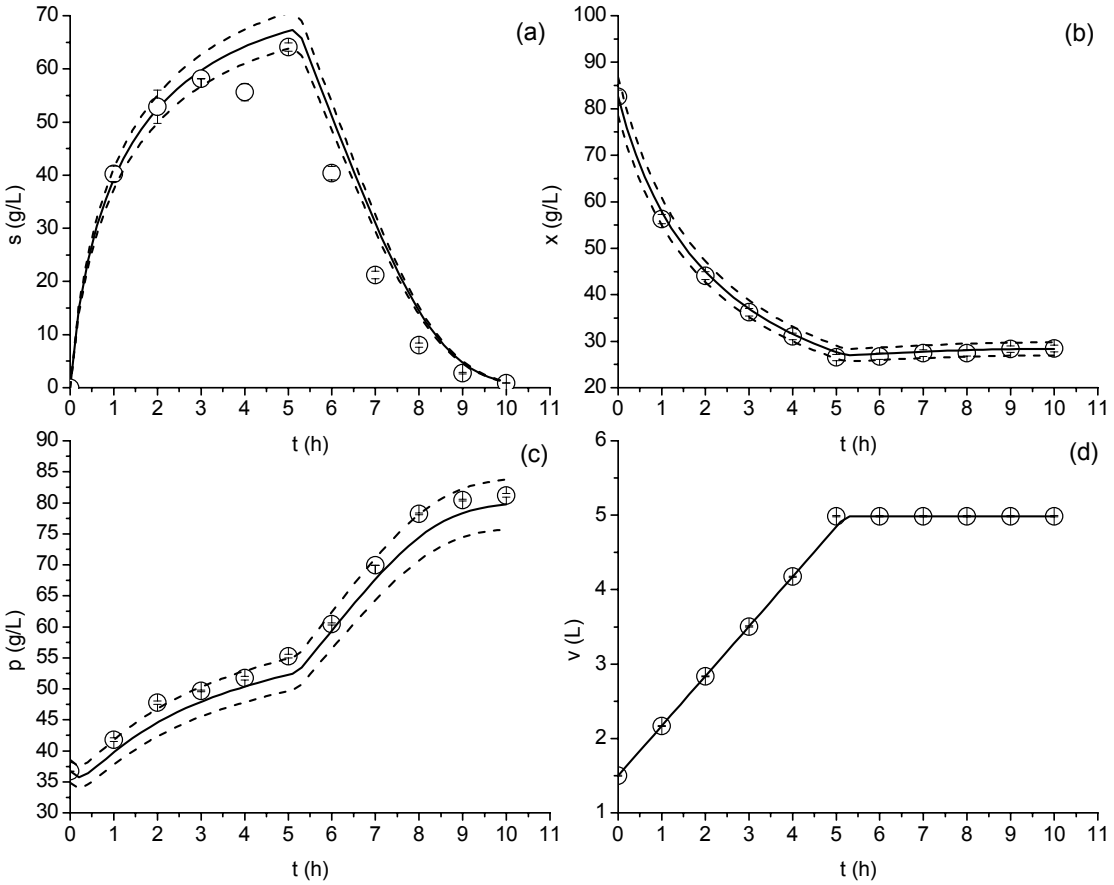


Figura 3.34 – Perfis das variáveis de estado para s_F = 241,4 g/L e t_e = 5 h. (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED pelos três experimentos em batelada alimentada com t_e = 5h. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado. (a) Sacarose (b) Células (c) Etanol (d) Volume.

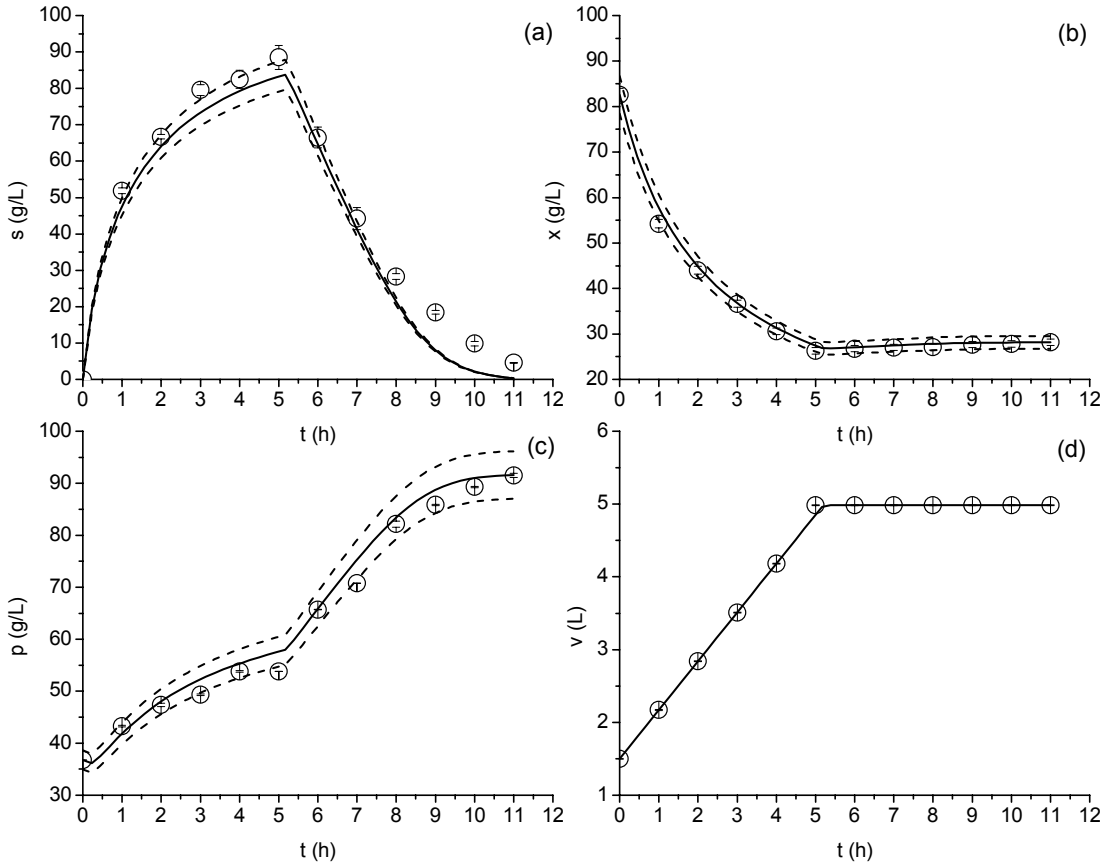


Figura 3.35 – Perfis das variáveis de estado para s_F = 285 g/L e t_e = 5 h. (○) Dados experimentais. (—) Simulado com parâmetros estimados por ED pelos três experimentos em batelada alimentada com t_e = 5h. (---) Perturbação de ± 5% no perfil simulado. (a) Sacarose (b) Células (c) Etanol (d) Volume.

3.4 – Conclusões

Na estimação dos parâmetros do modelo para a fermentação em batelada utilizando os resultados de cada experimento, foram obtidos diferentes conjuntos de parâmetros para cada fermentação, evidenciando a importância das condições iniciais na identificação destes parâmetros. Os valores dos parâmetros k_s e k_i foram coerentes com os seus significados físicos. Os valores estimados para a concentração máxima de etanol foram relativamente próximos do valor obtido experimentalmente. As taxas específicas máximas de crescimento estimadas foram tão baixas quanto às obtidas pelos resultados experimentais. Considerando os erros dos resultados experimentais, o modelo proposto descreveu de forma satisfatória estes resultados.

A estimativa dos parâmetros do modelo para a fermentação em batelada a partir dos dados dos três experimentos em batelada não apresentou bons resultados, ao contrário da estimativa

dos parâmetros a partir dos dois experimentos, com s_0 = 154 e 180,1 g/L. Verificou-se que o modelo proposto com estes novos conjuntos de parâmetros representou de forma satisfatória aos dados experimentais. Os conjuntos de parâmetros obtidos para cada batelada e obtidos para as duas bateladas com s_0 = 154 e 180,1 g/L, foram utilizados para ajustar o modelo para a fermentação em batelada alimentada, mas houve um desvio muito grande em relação aos valores experimentais. Isto pode ter ocorrido pelo fato de no modelo para o processo em batelada alimentada haver o efeito da diluição do meio que provoca alterações no crescimento das células. Por esta razão, foi realizada a estimativa dos parâmetros a partir dos experimentos em batelada alimentada.

Os conjuntos de parâmetros do modelo para a fermentação em batelada alimentada estimados a partir de cada experimento com tempo de enchimento de 5 horas, foram diferentes para cada fermentação, principalmente para a fermentação com s_F igual a 285 g/L. Do mesmo modo que os conjuntos de parâmetros estimados no modelo para o processo em batelada, os valores obtidos de k_s e k_i foram fisicamente significativos. Os valores de k_i foram maiores que os determinados para o modelo da fermentação em batelada, e os valores de n, menores, fato que está de acordo com o processo em batelada alimentada, que diminui os efeitos de inibição pelo substrato e produto. A partir desta observação, seria interessante empregar outro tipo de modelo que não considere os efeitos de inibição pelo substrato e pelo produto, e verificar se ele representa de forma adequada tais experimentos em batelada alimentada. Os valores estimados para a concentração máxima de etanol estiveram relativamente próximos do valor experimental. As taxas específicas máximas de crescimento celular estimadas foram semelhantes às obtidas pelos resultados experimentais. Considerando os erros dos resultados experimentais, o modelo proposto descreveu adequadamente estes resultados, verificado também, pelos baixos valores das funções objetivo.

Os valores dos parâmetros estimados para cada fermentação do processo em batelada alimentada com concentrações de substrato na alimentação próximas a 245 g/L e t_e igual a 3, 4 e 5 horas foram muito semelhantes, com exceção da constante de saturação para o crescimento celular, indicando que a variação do tempo de enchimento não influencia tanto na estimativa dos parâmetros, como a variação da concentração de sacarose na alimentação.

Foi realizada a estimativa dos parâmetros a partir de todos os três experimentos em batelada alimentada, com a finalidade de obter um conjunto de parâmetros adimensionais que representasse as fermentações para toda a faixa de s_F (217-285 g/L) em t_e igual a 5 horas. O novo modelo proposto representou adequadamente os resultados experimentais.

CAPÍTULO 4

ANÁLISE DE SENSIBILIDADE PARAMÉTRICA

4.1 Revisão Bibliográfica

A análise de sensibilidade paramétrica associada à avaliação da correlação entre os parâmetros fornece um procedimento sistemático para estimar a precisão e robustez de um modelo matemático. As matrizes de sensibilidade, que são derivadas parciais das variáveis do processo com relação aos parâmetros do modelo, são de grande importância na análise da incerteza, estimação de parâmetros e otimização, análise de dados experimentais e discriminação de modelos (Wang e Sheu, 2000; Sanz e Voss, 2006). Segundo Shen (2006), para usar um método de otimização com a finalidade de estimar parâmetros de um modelo não linear, é importante saber se os parâmetros do modelo podem ser estimados baseados nas observações disponíveis, a unicidade dos parâmetros, e o quanto o erro está associado com o parâmetro estimado. Estas questões estão relacionadas à identificação paramétrica, a qual pode ser inferida pela análise de sensibilidade paramétrica.

Lee *et al.* (1995), por meio de perturbações nas constantes de Monod para glicose (k_G) e maltose (k_M), e na constante de repressão (k_i) do modelo proposto, observaram que uma mudança da ordem de 10% nestes três parâmetros não causa efeitos significantes no ajuste dos dados. Pelo método de análise de sensibilidade paramétrica, Pertev *et al.* (1997) avaliaram a influência dos parâmetros do modelo com os respectivos valores obtidos da literatura, e apenas os que mais influenciaram na produção de biomassa, foram novamente estimados. A taxa de alimentação ótima para a fermentação em batelada alimentada e a análise de sensibilidade paramétrica foram aplicadas para avaliar o ajuste do modelo estimado por Wang e Sheu (2000). Um método de colocação modificado (Shiue *et al.*, 1995) foi aplicado para resolver as equações da matriz de sensibilidade. As sensibilidades da massa celular, glicose e etanol em relação ao coeficiente da taxa específica de crescimento (μ_{max}) e coeficiente da taxa específica de formação de produto (ν_{max}) foram mais significativas que os outros parâmetros. Além disto, as sensibilidades em relação a μ_{max} para os processos em batelada alimentada foram mais significativas se comparadas aos dos processos em batelada. A análise de sensibilidade paramétrica do modelo utilizado por Goswami e Srivastava (2000) baseada no método de Votruba (1982) apresentou que a taxa de consumo de substrato específica máxima

e a constante de manutenção de energia foram os parâmetros mais sensíveis. Dutta *et al.* (2001) analisaram a sensibilidade dos parâmetros de um sistema bioquímico para determinar *a priori*, um regime parametricamente sensível. Tal análise de sensibilidade, feita durante a fase exponencial do crescimento microbiológico, seguiu o método de Morbidelli e Varma (1989), Chemburkar *et al.* (1986) e Tambe *et al.* (1991). Um reator aeróbico para degradação de fenol sem controle de pH utilizando uma população mista, foi escolhido como o sistema representativo. Sensibilidades normalizadas do pH mínimo foram determinadas com relação a diversas variáveis de entrada. Também determinaram pontos críticos nos quais o sistema se mostrou simultaneamente sensível a todos os parâmetros de entrada.

O trabalho de Stigter e Keesman (2004) incluiu a sensibilidade paramétrica no laço de controle para estimativa de um conjunto de parâmetros em um experimento. O método foi demonstrado para um caso de estudo de um biorreator batelada alimentada para estimativa ótima da constante de saturação k_S e do parâmetro combinado $\mu_{max}x/y$ em que y é o coeficiente de rendimento e x a concentração celular. O controlador de sensibilidade paramétrica resultante para o parâmetro k_S foi utilizado em dois experimentos seqüenciais usando uma estratégia de controle 'bang-bang-singular'. As somas dos pesos das sensibilidades ao quadrado para ambos os parâmetros foram comparadas com os casos individuais onde somente uma sensibilidade de saída paramétrica específica foi controlada. A incerteza paramétrica foi abordada de uma forma completamente determinística como a obtenção de uma lei de controle que maximiza a sensibilidade paramétrica de saída.

Sanz e Voss (2006) avaliaram a habilidade que a modelagem inversa tem de determinar os verdadeiros parâmetros do modelo de Henry para a intrusão da água do mar, pela seleção dos parâmetros independentes a partir da análise de covariância obtida pela matriz de sensibilidade. Para estudar o valor de vários tipos e locais de dados de campo em situações de intrusão da água do mar, foi empregado o cálculo de redes para a estimação dos parâmetros, reduzindo a variância e a correlação dos parâmetros estimados, dependendo da forma de distribuição do erro considerada. Segundo estes autores, problemas inversos podem apresentar pobre convergência de estimação e solução não única, especialmente quando há a tentativa de estimar muitos parâmetros ou parâmetros correlacionados. A redução do número de parâmetros a serem estimados parece ser uma estratégia efetiva desde que forneça cálculos mais práticos, reduzindo o tempo computacional requerido.

Nenhuma aproximação para a seleção de um conjunto de parâmetros a serem estimados é rigorosa. Na verdade, qualquer aproximação é arbitrária. Todas as aproximações podem ser discutidas e discordadas com quem as realiza, do mesmo modo que o conjunto de parâmetros

selecionados para estimação depende das introspecções e das preferências de quem pratica. O uso da lógica baseada na física e das análises de covariância e correlação é recomendado. A análise de covariância e correlação para um conjunto de parâmetros a serem estimados deve ser sempre realizada, independente do processo de estimação, usando os melhores valores dos parâmetros estimados. Esta análise indica quais os parâmetros são independentes e quais são co-dependentes no controle da física do sistema (parâmetros co-dependentes não podem ser calculados simultaneamente). O processo de redução dos parâmetros pode ser aplicado num procedimento passo a passo. Primeiro elimina-se diversos parâmetros, então a re-análise de covariância e correlação é realizada, e possivelmente o conjunto de parâmetros é reduzido novamente. Mesmo quando um modelo inverso converge, a estimativa dos parâmetros pode estar incorreta. Correlações muito altas (próximas a ± 1) podem indicar que isto ocorreu (Sanz e Voss, 2006).

Atenção especial deve ser dada na seleção dos pesos por terem forte influência na estimativa dos parâmetros e suas estatísticas. Os pesos não são apenas selecionados para reduzir a influência das observações com o maior erro da medida, como usualmente feito para dados de campo, mas para equilibrar a contribuição de diferentes tipos de dados (tal como pressão e concentração) na regressão e ao menos em parte, é um processo subjetivo (Sanz e Voss, 2006).

Com base no que foi apresentado, foram realizadas a análise de sensibilidade e a correlação dos parâmetros estimados para ambos os modelos das fermentações, em batelada e em batelada alimentada, por meio das metodologias apresentadas a seguir.

4.2 Análise de Sensibilidade Paramétrica

Segundo Maly e Petzold (1996), considere o sistema geral de Equações Algébrico-Diferenciais (EADs) dado por $F(t, y, y', pa) = 0$, $y(0) = y_0$, onde $y \in \mathbb{R}^{ny}$ e $pa \in \mathbb{R}^{np}$. Aqui, n_y e n_{pa} são a dimensão e o número de parâmetros do sistema de EADs original, respectivamente. A análise de sensibilidade implica encontrar a derivada do sistema acima com relação a cada parâmetro. Isto produz um número adicional de equações de sensibilidade $n_s = n_{pa} n_y$ que, junto com o sistema original resultam em:

$$\begin{aligned} &F(t, y, y', pa) = 0 \\ &\frac{\partial F}{\partial y} se_i + \frac{\partial F}{\partial y'} se_i' + \frac{\partial F}{\partial pa_i} = 0, i = 1, \ldots, n_{pa,} \end{aligned} \tag{4.1}$$

em que $se_i = dy/dpa_i$. Definindo $Y = [y, se_1, ..., se_{n_{pa}}]^T$ e

$$\boldsymbol{F} = \left[F(t,y,pa), \frac{\partial F}{\partial y} se_1 + \frac{\partial F}{\partial y'} se_1' + \frac{\partial F}{\partial pa_1}, ..., \frac{\partial F}{\partial y} se_{n_{pa}} + \frac{\partial F}{\partial y'} se_{n_{pa}}' + \frac{\partial F}{\partial pa_{n_{pa}}} \right]^T, \tag{4.2}$$

o sistema combinado pode ser reescrito como

$$\boldsymbol{F}\left(t, Y, Y', pa\right) = 0, Y(0) = \left[y_0, \frac{dy_0}{dpa_1}, ..., \frac{dy_0}{dpa_{n_{pa}}} \right]^T. \tag{4.3}$$

As condições iniciais para este sistema de EADs devem ser consistentes.

Aproximando a solução do sistema combinado por um método numérico, por exemplo, o método de Euler implícito com passo h, tem-se o sistema não linear:

$$G\left(Y_{n+1}\right) = \boldsymbol{F}\left(t_{n+1}, Y_{n+1}, \frac{Y_{n+1} - Y_n}{h}, pa \right) = 0 \tag{4.4}$$

O método de Newton para o sistema não linear produz a iteração:

$$Y_{n+1}^{(k+1)} = Y_{n+1}^{(k)} - \boldsymbol{J}^{-1} G\left(Y_{n+1}^{(k)}\right), \tag{4.5}$$

em que

$$\boldsymbol{J} = \begin{pmatrix} J & & & & \\ J_1 & J & & & \\ J_2 & 0 & J & & \\ \vdots & \vdots & \ddots & \ddots & \\ J_{n_p} & 0 & \cdots & 0 & J \end{pmatrix} \tag{4.6}$$

e

$$J = \frac{1}{h}\frac{\partial F}{\partial y'} + \frac{\partial F}{\partial y}, J_i = \frac{\partial J}{\partial y} se_i + \frac{\partial J}{\partial pa_i}. \tag{4.7}$$

Um número de códigos de Equações Diferenciais Ordinárias (EDOs) e EADs resolvem o sistema de sensibilidade (Eq. 4.1). Se as matrizes de derivadas parciais não estão disponíveis analiticamente, elas são aproximadas por diferenças finitas. O sistema não linear é usualmente resolvido por um esquema escalonado, onde o primeiro bloco é resolvido para as variáveis de

estado *y* pelo método de Newton, e assim o sistema linear do bloco diagonal para as sensibilidades *se* é resolvido em cada passo de tempo.

O código DDASPK (Petzold *et al*., 2000) calcula a sensibilidade da solução y com relação a perturbações nos parâmetros *pa*, pela resolução de um sistema de EADs da forma *F(t, y, y', pa)* = 0, usando uma combinação de métodos de fórmula de diferenciação a ré (BDF) e uma escolha de dois métodos de solução de sistema linear: direto (denso ou bandado) ou Krylov (iterativo). A classe de problemas que DDASPK pode resolver inclui EADs de índice 0, 1 e índice 2 de Hessenberg. Este código, utilizado para resolver as equações das matrizes de sensibilidade dos parâmetros estimados por Evolução Diferencial, foi executado pelo programa *Compaq Visual Fortran® 6.6.0*.

4.3 Estimativa da Correlação entre os Parâmetros

O método apresentado nesta seção, baseado no trabalho de Sanz e Voss (2006), associa a análise de sensibilidade paramétrica com a análise estatística pela variância e correlação.

A correlação entre os parâmetros é uma medida que indica quanto um parâmetro, da mesma forma (ou de forma oposta) que outro, afeta o valor de uma variável observada. Mesmo parâmetros que são aparentemente independentes em um modelo, podem mudar as variáveis observadas de uma forma similar, e assim, exibir alguma correlação, a qual nunca pode ser maior do que +1 ou menor do que -1.

A correlação entre dois parâmetros b_i e b_J, pode ser definida como:

$$cor(b_i, b_J) = \frac{cov(b)_{iJ}}{[cov(b)_{ii}\, cov(b)_{JJ}]^{1/2}} \tag{4.8}$$

em que *cov(b)* é uma matriz de covariância *N*x*N* originada da matriz de sensibilidade (*se*), e *N* é o número total de parâmetros estimados.

$$cov(b) = \sigma^2 (se^T \omega se)^{-1} \tag{4.9}$$

Nesta relação, *b* é o vetor que contém os valores dos parâmetros cujas sensibilidades são avaliadas, σ^2 é a variância dos erros nas observações e ω é a matriz de pesos. A covariância pode ser calculada a partir da Eq. 4.9, fornecidas as sensibilidades. As variâncias dos parâmetros estimados são os termos ao longo da diagonal, $cov(b)_{ii}$.

A sensibilidade (se_{iJ}) do valor simulado (y_i) associado com a i-ésima observação e em relação a um determinado parâmetro (b_J), é expressa como:

$$se_{iJ} = \frac{\partial y_i}{\partial b_J} \tag{4.10}$$

O par de parâmetros μ_{max} e K_S foi usado como exemplo na matriz de sensibilidade apresentada abaixo.

$$se = \begin{bmatrix} \frac{\partial X_1}{\partial \mu_{max}} & \frac{\partial X_1}{\partial K_S} \\ \frac{\partial X_2}{\partial \mu_{max}} & \frac{\partial X_2}{\partial K_S} \\ \frac{\partial X_3}{\partial \mu_{max}} & \frac{\partial X_3}{\partial K_S} \\ \vdots & \vdots \\ \frac{\partial X_n}{\partial \mu_{max}} & \frac{\partial X_n}{\partial K_S} \end{bmatrix} \tag{4.11}$$

Neste caso, X é o valor simulado. O índice n é o número de observações.

Convém destacar aqui que as sensibilidades de um determinado parâmetro dependem dos valores dos outros parâmetros. Assim, se a correlação de pares de parâmetros for analisada a partir do resultado da matriz de sensibilidade para cada variável observada, quando $cor(b_i,b_J)$ for:

- ✓ igual a zero → os parâmetros não estão correlacionados;
- ✓ positiva → os parâmetros estão correlacionados de forma semelhante (se ocorre um aumento no valor de um parâmetro, o outro também irá aumentar), e afetam o valor das variáveis observadas de forma contrária;
- ✓ negativa → os parâmetros estão correlacionados de forma contrária (se ocorre um aumento no valor de um parâmetro, o outro irá diminuir), e afetam de forma semelhante o valor das variáveis observadas;
- ✓ igual a +1 → os parâmetros têm o mesmo efeito um sobre o outro de forma proporcional (se ocorre um aumento no valor de um parâmetro, o outro também irá aumentar na mesma proporção);
- ✓ igual a -1 → os parâmetros têm efeitos diferentes um sobre o outro de forma proporcional (se ocorre um aumento no valor de um parâmetro, o outro irá diminuir na mesma proporção);

Segundo Sanz e Voss (2006), o par de parâmetros altamente correlacionados devem ser combinados em um mesmo parâmetro, o qual posteriormente será estimado.

4.4. Resultados e Discussões

4.4.1. Análise de Sensibilidade Paramétrica

Nesta seção, as matrizes de sensibilidade paramétrica foram avaliadas, baseadas nos parâmetros adimensionais μ_{max}, K_S, K_i, P_{max}, n e M_S estimados anteriormente para os experimentos em batelada e batelada alimentada (t_e = 5 h), com a finalidade de comparar o efeito da variação destes parâmetros sobre os diferentes modelos. No programa principal do código DDASPK foram definidas:

as dimensões:

n_y = 3 → número de variáveis de estado no modelo para a fermentação em batelada dadas por concentrações de células (y_1), sacarose (y_2) e etanol (y_3);

n_y = 4 → número de variáveis de estado no modelo para a fermentação em batelada alimentada, dadas por concentrações de células (y_1), sacarose (y_2) e etanol (y_3) e do volume (y_4);

n_{pa} = 6 (número de parâmetros).

o número de equações do sistema:

($NEQ = n_y * (n_{pa}+1)$) = 21 (modelo para a fermentação em batelada);

($NEQ = n_y * (n_{pa}+1)$) = 28 (modelo para a fermentação em batelada alimentada);

as tolerâncias ao erro:

absoluta (ATOL) = 10^{-6}

relativa (RTOL) = 10^{-6}, as quais definem a precisão da solução.

Também foram definidos as equações adimensionais dos modelos, o valor estimado de seus parâmetros, as condições iniciais das variáveis de estado e o intervalo de tempo.

Os perfis de sensibilidade das concentrações de células, sacarose e etanol, relacionados aos parâmetros dos modelos, são apresentados nas Figs. 4.1-4.9. As sensibilidades das concentrações de células, sacarose e etanol com relação à constante de saturação para o crescimento celular (K_S) e a taxa específica máxima de crescimento celular (μ_{max}) foram mais significantes que os demais parâmetros, principalmente no modelo para o processo em batelada alimentada para os perfis de sacarose (Figs. 4.1, 4.4 e 4.7) e etanol (Figs. 4.3, 4.6 e

4.9). Isto quer dizer que uma mínima perturbação no valor destes parâmetros causa uma grande alteração no valor destas variáveis de estado.

A influência de K_S aumentou à medida que o substrato foi consumido. Pela equação de Monod ($\mu = \mu_m s/(k_s+s)$, dimensional) para altas concentrações de substrato, tem-se $s \cong k_s + s$ e, portanto, esta relação se aproxima de $\mu = \mu_m$. O fato de K_S ter tido maior influência no modelo com a diminuição da concentração de substrato, mostrou que este parâmetro pode ser interpretado como uma limitação à taxa de crescimento celular pela baixa concentração de substrato disponível às células.

O efeito da taxa específica máxima de crescimento celular (μ_{max}) foi acentuado porque este parâmetro estabelece um limite para a velocidade do processo fermentativo. Logo, quando este parâmetro foi variado, ocorreram alterações significativas nos perfis de concentrações ao longo do tempo de fermentação. Nos trabalhos de Aboutboul (1988), Ferreira (1998), Wang e Sheu (2000) e Goswami e Srivastava (2000), a taxa específica máxima de crescimento celular (μ_{max}) foi o parâmetro que teve mais influência nos perfis das variáveis de estado dos modelos propostos.

A constante de manutenção celular (M_S) teve maior significância, principalmente quando a concentração de sacarose diminuiu, para os perfis das concentrações de células e etanol no modelo batelada, o que refletiu a necessidade de mais nutrientes pelas células. Goswami e Srivastava (2000) apresentaram que M_S também foi um dos parâmetros mais sensíveis do modelo estudado por eles.

A potência do termo de inibição pelo produto (n) teve maior influência no tempo final, onde a concentração de produto foi mais acentuada. O efeito deste parâmetro nas variáveis de estado foi semelhante nos dois modelos para as fermentações em batelada e batelada alimentada, com exceção do perfil de concentração celular, que apresentou ser mais sensível no modelo para a fermentação em batelada.

A sensibilidade da solução y com relação a perturbações na concentração de produto onde cessa o crescimento microbiano (P_{max}) foi relativamente pequena ao longo do tempo. Além disso, P_{max} teve maior influência no final, quando a concentração de etanol foi mais acentuada.

A constante de inibição do crescimento celular por substrato K_i influiu mais acentuadamente quando a concentração de substrato esteve alta, ou seja, no início da fermentação e para maiores valores de concentração inicial de substrato (S_0) no modelo batelada, como pode ser visto na Figs. 4.7-4.9. Aboutboul (1988) supôs que a sensibilidade do modelo frente a este parâmetro fosse maior, num momento em que nenhum outro efeito de inibição ou saturação estivesse atuando.

Os parâmetros P_{max} e K_i praticamente não tiveram efeito sobre os perfis de concentrações de sacarose, células e etanol no modelo para o processo em batelada alimentada.

A sensibilidade para a concentração de células para todos os casos, com relação às perturbações nos parâmetros foi bem menor se comparada às concentrações de sacarose e etanol. O perfil de sacarose foi mais influenciado pelas alterações nos parâmetros do modelo para o processo em batelada. Por outro lado, o perfil de etanol apresentou ser mais sensível aos parâmetros do modelo para o processo em batelada alimentada.

Outra observação a ser feita a partir das figuras de sensibilidade, são as descontinuidades apresentadas nos perfis de sensibilidade para o modelo da fermentação em batelada alimentada, principalmente para μ_{max} e K_S, no momento em que cessa a alimentação do meio ao fermentador (processo passa a ser em batelada).

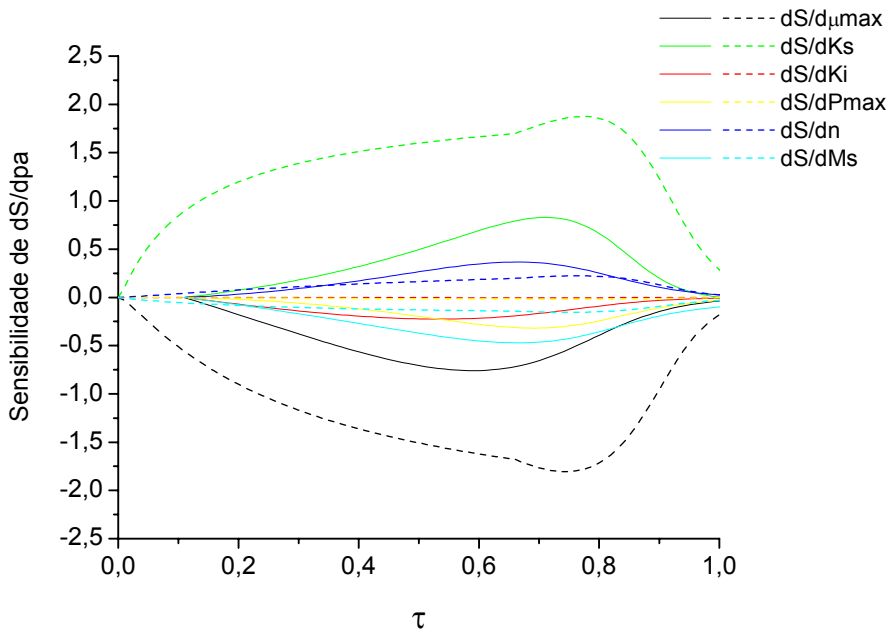


Figura 4.1 - Perfil de sensibilidade da concentração de sacarose em relação aos parâmetros do modelo para as fermentações (—) em batelada com s_0 = 154 g/L e (---) em batelada alimentada com s_F = 217 g/L e t_e = 5h.

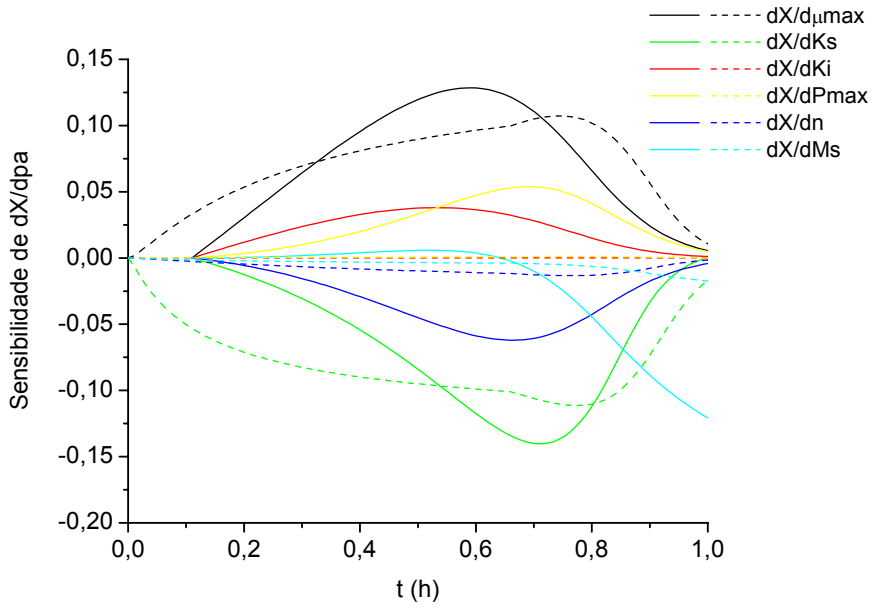


Figura 4.2 - Perfil de sensibilidade da concentração de células em relação aos parâmetros do modelo para as fermentações (—) em batelada com s_0 = 154 g/L e (---) em batelada alimentada com s_F = 217 g/L e t_e = 5h.

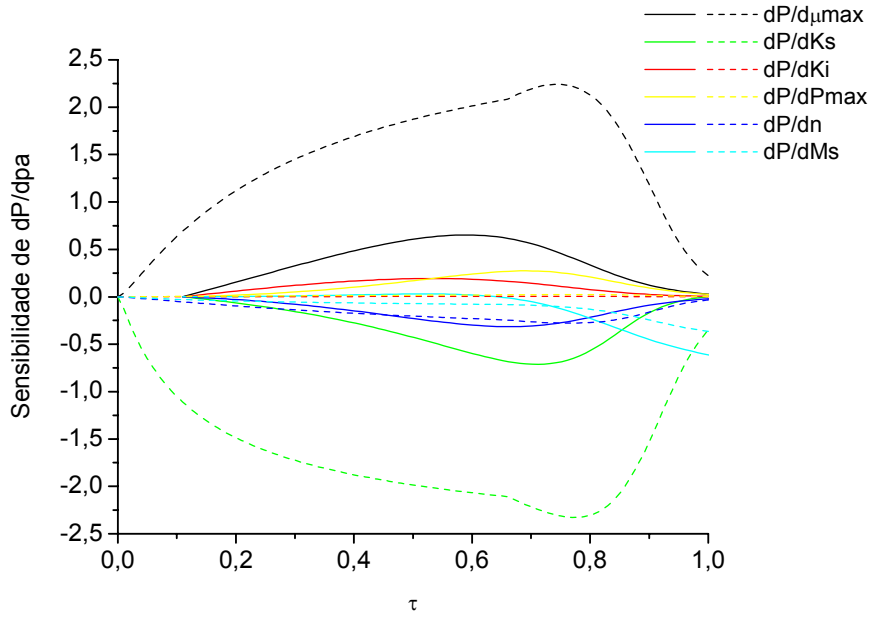


Figura 4.3 - Perfil de sensibilidade da concentração de etanol em relação aos parâmetros do modelo para as fermentações (—) em batelada com s_0 = 154 g/L e (---) em batelada alimentada com s_F = 217 g/L e t_e = 5h.

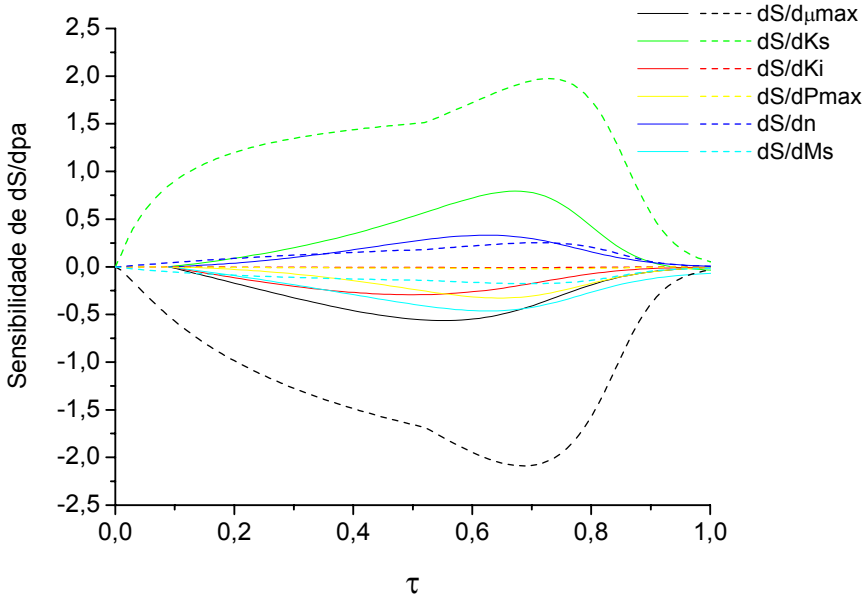


Figura 4.4 - Perfil de sensibilidade da concentração de sacarose em relação aos parâmetros do modelo para as fermentações (—) em batelada com s_0 = 180,1 g/L e (---) em batelada alimentada com s_F = 241,4 g/L e t_e = 5h.

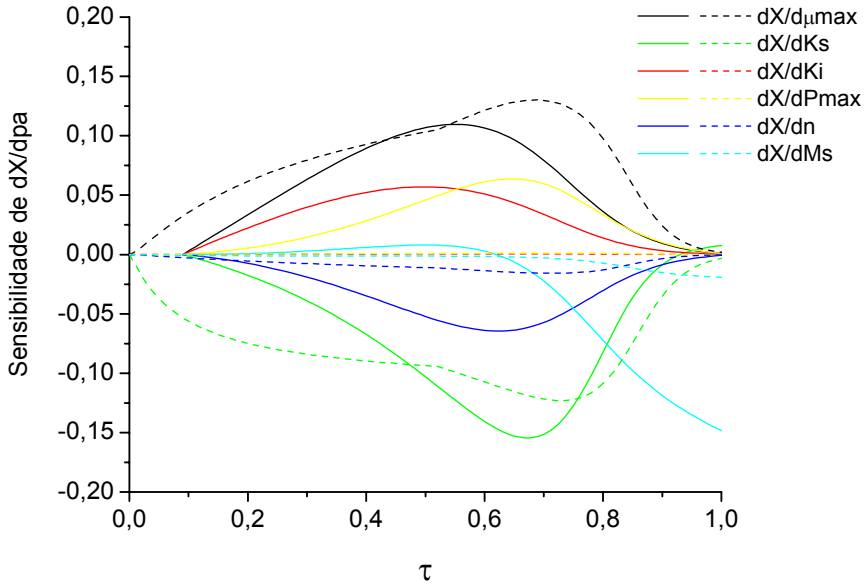


Figura 4.5 - Perfil de sensibilidade da concentração de células em relação aos parâmetros do modelo para as fermentações (—) em batelada com s_0 = 180,1 g/L e (---) em batelada alimentada com s_F = 241,4 g/L e t_e = 5h.

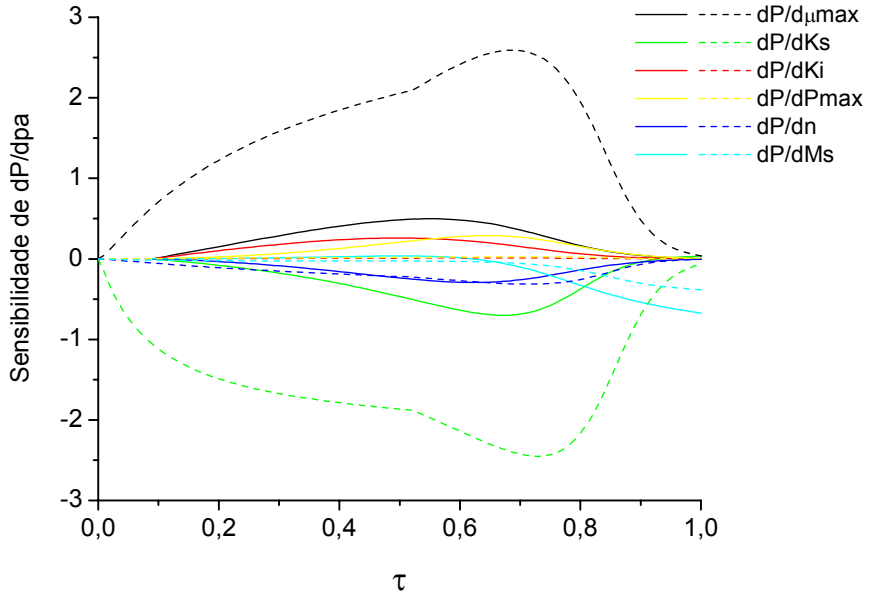


Figura 4.6 - Perfil de sensibilidade da concentração de etanol em relação aos parâmetros do modelo para as fermentações (—) em batelada com s_0 = 180,1 g/L e (---) em batelada alimentada com s_F = 241,4 g/L e t_e = 5h.

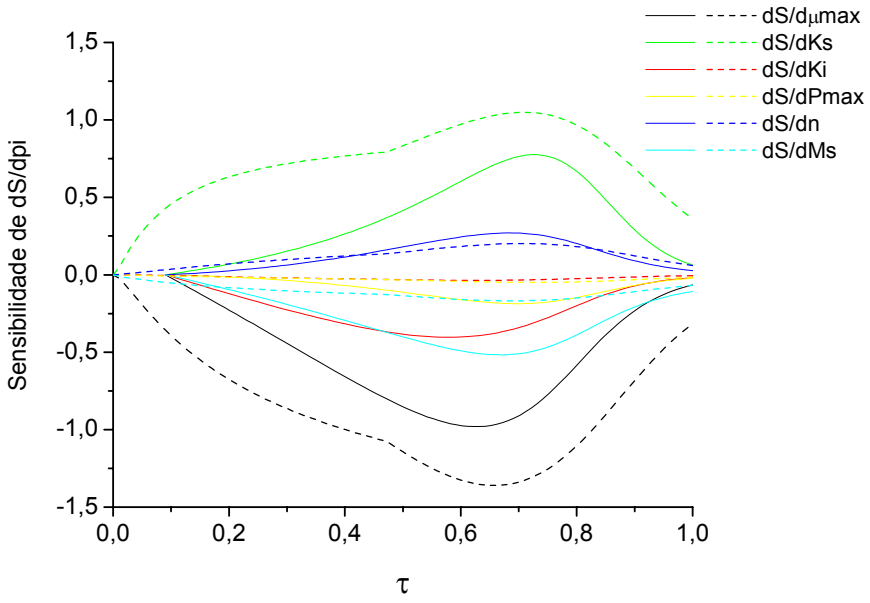


Figura 4.7 - Perfil de sensibilidade da concentração de sacarose em relação aos parâmetros do modelo para as fermentações (—) em batelada com s_0 = 195,6 g/L e (---) em batelada alimentada com s_F = 285 g/L e t_e = 5h.

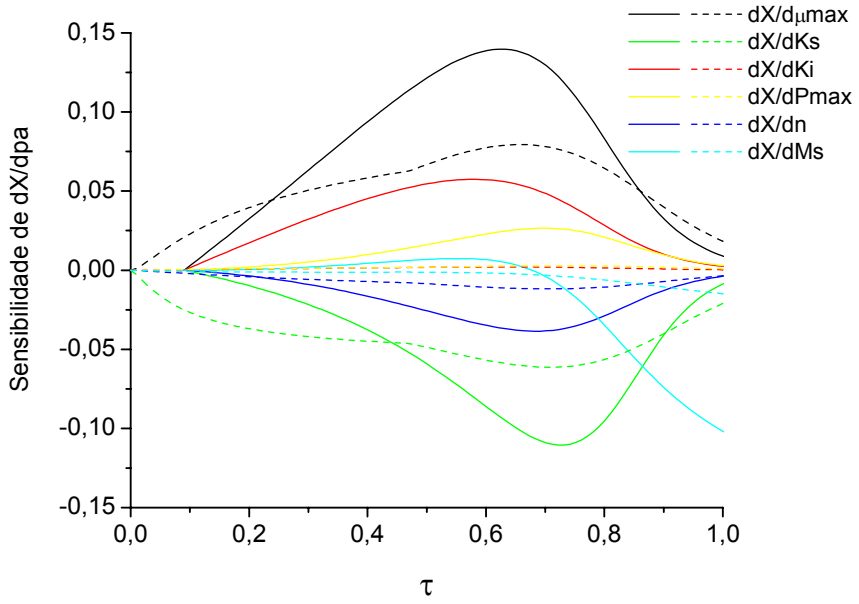


Figura 4.8 - Perfil de sensibilidade da concentração de células em relação aos parâmetros do modelo para as fermentações (—) em batelada com s_0 = 195,6 g/L e (---) em batelada alimentada com s_F = 285 g/L e t_e = 5h.

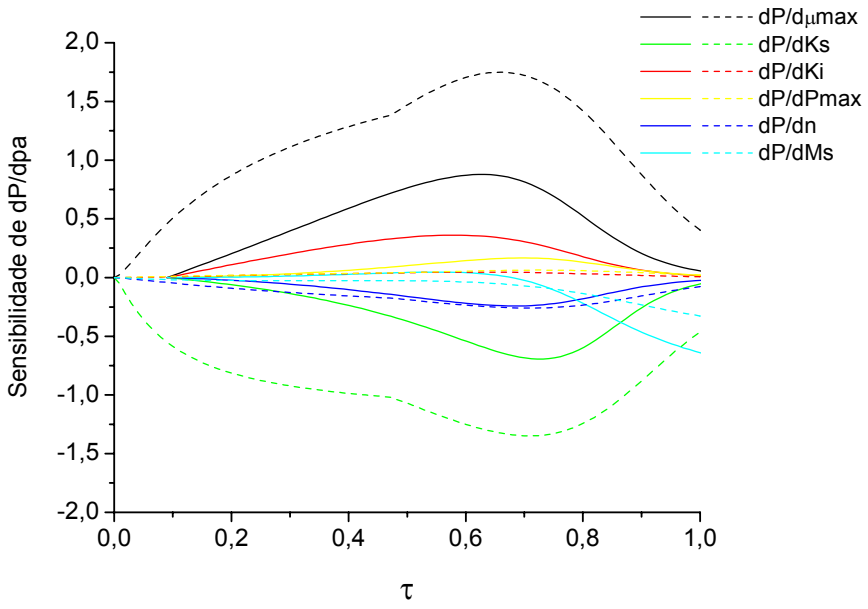


Figura 4.9 - Perfil de sensibilidade da concentração de etanol em relação aos parâmetros do modelo para as fermentações (—) em batelada com s_0 = 195,6 g/L e (---) em batelada alimentada com s_F = 285 g/L e t_e = 5h.

Como pode ser observado a partir das Figs. 4.1-4.9, o sinal de sensibilidade pode ser positivo ou negativo. Quando um coeficiente de sensibilidade é positivo um aumento no parâmetro do modelo conduz a um aumento na variável de estado correspondente, e quando é negativo, ocorre o contrário (Zanfir e Gavriilidis, 2002). Por exemplo, considerando a sensibilidade da concentração de células (Figs. 4.2, 4.5 e 4.8), um aumento apenas nos valores dos parâmetros K_S e n, provoca uma diminuição na concentração de células, pois um alto valor de K_S indica que há pouco substrato disponível às células, e um alto valor de n indica que há maior inibição do crescimento pela formação de produto. Ao contrário, um aumento nos valores dos parâmetros μ_{max}, K_i e P_{max} causa um aumento na concentração de células, pois valores altos destes parâmetros indicam respectivamente, maior crescimento celular, menor inibição pelo substrato e, menor inibição pelo produto.

4.4.2 Correlação dos Parâmetros

Pela análise de todos os casos estudados no item anterior, observou-se que a sensibilidade paramétrica teve comportamento semelhante para cada modelo, para as fermentações em batelada e em batelada alimentada. Por esta razão, os modelos para as fermentações em batelada com s_0 = 154 g/L e em batelada alimentada com s_F = 217 g/L foram selecionados para estudar as correlações entre seus parâmetros e compará-las.

As correlações dos parâmetros foram obtidas diretamente das matrizes de covariância de acordo com a Eq. 4.8, considerando a variância (σ^2) igual a um, pois este dado não interfere no cálculo da correlação especificamente. Os pesos (ω) também foram considerados iguais a um.

Os resultados são apresentados nas Tabs. 4.1 e 4.2 considerando a combinação dos pares de parâmetros dos modelos para os processos em batelada e em batelada alimentada para cada variável observada (concentrações de sacarose, células e etanol). As correlações obtidas foram consistentes, no valor e sinal, com a posição dos parâmetros nas Eqs. 3.2, 3.9 e 3.17 dos modelos. As Figuras de sensibilidade 4.1-4.3 explicam as correlações entre os parâmetros.

A maioria dos pares de parâmetros, tanto os do modelo para o processo em batelada quanto os do modelo para o processo em batelada alimentada, exibiram altas correlações. Os pares de parâmetros do modelo para o processo em batelada alimentada exibiram correlações ainda maiores, com exceção apenas para K_S e P_{max}, K_S e n, e P_{max} e M_S (para a variável observada S), que tiveram correlações um pouco menores.

Os parâmetros μ_{max} e K_S nas Figs. 4.1-4.3, por exemplo, apresentaram perfis semelhantes e sinais opostos para todas as variáveis S, X e P e tipos de modelo (indicando uma correlação

positiva), e K_i e P_{max} apresentaram perfis semelhantes e sinais iguais (indicando uma correlação negativa).

Os pares de parâmetros μ_{max}, K_S, K_i, P_{max} e n com M_S exibiram menores correlações para as concentrações de células e etanol (Tabs. 4.1 e 4.2). Para a concentração de sacarose, as correlações foram muito maiores. Este fato foi consistente com as Figs. 4.2 e 4.3 em relação à X e P, nas quais o par μ_{max} e M_S por exemplo, exibiram perfis diferentes, indicando baixa correlação. Já na Fig. 4.1, em relação à concentração de sacarose, estes parâmetros apresentaram perfis muito semelhantes, indicando alta correlação. Isto também pôde ser explicado pela localização destes parâmetros nas equações do modelo. A constante de manutenção celular (M_S) esteve presente apenas na equação relacionada ao consumo de substrato (Eqs. 3.3 e 3.17), por isso os parâmetros da expressão da taxa específica de crescimento celular (Eq. 3.2 e 3.21) apresentam maior correlação com M_s para a variável S.

Tabela 4.1 – Correlações dos pares de parâmetros do modelo batelada com s_0 = 154 g/L.

S	μ_{max}	K_S	K_i	P_{max}	n	M_s
μ_{max}	1,0	0,94	-0,99	-0,93	0,97	-0,97
K_S		1,0	0,88	1,0	-0,99	0,98
K_i			1,0	-0,88	0,92	-0,93
P_{max}				1,0	0,99	-0,99
n					1,0	0,99
M_s						1,0

X	μ_{max}	K_S	K_i	P_{max}	n	M_s
μ_{max}	1,0	0,94	-0,99	-0,93	0,96	0,15
K_S		1,0	0,88	1,0	-0,99	-0,24
K_i			1,0	-0,88	0,92	0,097
P_{max}				1,0	0,99	0,31
n					1,0	-0,25
M_s						1,0

P	μ_{max}	K_S	K_i	P_{max}	n	M_s
μ_{max}	1,0	0,94	-0,99	-0,93	0,96	0,15
K_S		1,0	0,88	1,0	-0,99	-0,24
K_i			1,0	-0,88	0,92	0,097
P_{max}				1,0	0,99	0,31
n					1,0	-0,25
M_s						1,0

Tabela 4.2 – Correlações dos pares de parâmetros do modelo batelada alimentada com s_F = 217 g/L.

S	μ_{max}	K_S	K_i	P_{max}	n	M_s
μ_{max}	1,0	0,99	-0,99	-0,99	0,99	-1,0
K_S		1,0	0,98	0,98	-0,98	1,0
K_i			1,0	-0,99	0,99	-0,99
P_{max}				1,0	1,0	-0,98
n					1,0	0,99
M_s						1,0

X	μ_{max}	K_S	K_i	P_{max}	n	M_s
μ_{max}	1,0	0,99	-0,99	-0,99	0,99	0,55
K_S		1,0	0,98	0,98	-0,98	-0,58
K_i			1,0	-0,99	0,99	0,53
P_{max}				1,0	1,0	0,59
n					1,0	-0,58
M_s						1,0

P	μ_{max}	K_S	K_i	P_{max}	n	M_s
μ_{max}	1,0	0,99	-0,99	-0,99	0,99	0,55
K_S		1,0	0,98	0,98	-0,98	-0,58
K_i			1,0	-0,99	0,99	0,53
P_{max}				1,0	1,0	0,59
n					1,0	-0,58
M_s						1,0

A partir do que foi discutido no início do Capítulo, observa-se que os parâmetros estimados dos modelos para as fermentações em batelada e em batelada alimentada, precisam ser reavaliados devido às altas correlações e sensibilidades apresentadas. Esta reavaliação pode ser feita primeiro, considerando pesos adequados nos dados observados, e posteriormente fazendo uma nova análise de sensibilidade e correlação. Caso os novos resultados não tenham apresentado menores correlações e menores sensibilidades com relação às variáveis de estado, deve-se estudar uma forma de reduzir os parâmetros do modelo, ou até mesmo, substituir o modelo cinético. Uma outra alternativa seria considerar $\mu = \mu_{max}$, já que os valores obtidos para as taxas de crescimento específicas experimentais foram muito baixos, provavelmente devido às condições iniciais empregadas: altas concentrações de células.

4.5 Conclusões

As sensibilidades das concentrações de células, sacarose e etanol com relação à constante de saturação para o crescimento e a taxa específica máxima de crescimento celular foram mais significantes que os demais parâmetros, principalmente no modelo para o processo em batelada alimentada para os perfis de sacarose e etanol. Ou seja, uma mínima perturbação no valor destes parâmetros causa uma grande alteração no valor destas variáveis de estado. A ordem decrescente de influência dos parâmetros nos modelos considerados é a seguinte: K_S, μ_{max}, M_S, n, P_{max} e K_i. O parâmetro M_s teve maior influência nos perfis das concentrações de células e etanol do modelo para o processo em batelada e, n afetou mais o perfil de

concentração celular, também, do modelo para o processo em batelada. Os parâmetros P_{max} e K_i quase não afetaram os perfis de concentrações de sacarose, células e etanol no modelo batelada alimentada. A sensibilidade da concentração de células para os dois modelos, foi bem menor comparada às concentrações de sacarose e etanol. O perfil de sacarose foi mais afetado pelas alterações nos parâmetros do modelo para as fermentações em batelada, e o de etanol, pelas alterações nos parâmetros do modelo para as fermentações em batelada alimentada.

As correlações obtidas entre os pares de parâmetros foram consistentes, no valor e sinal, com a suas posições nas equações dos modelos. Estes pares de parâmetros exibiram altas correlações nos dois modelos considerados, sendo que para o modelo do processo em batelada alimentada as correlações foram ainda maiores, com exceção apenas para K_S e P_{max}, K_S e n, e P_{max} e M_S com relação à concentração de sacarose, que tiveram correlações um pouco menores. Os pares de parâmetros μ_{max}, K_S, K_i, P_{max} e n com M_S exibiram menores correlações para as concentrações de células e etanol, e maiores correlações para a concentração de sacarose.

Deve-se atentar para uma reavaliação dos modelos para as fermentações em batelada e em batelada alimentada devido às altas correlações e sensibilidades dos parâmetros obtidas. Entretanto, a aproximação para a seleção de um conjunto de parâmetros a serem estimados, como qualquer outra aproximação, é arbitrária. E considerando que o modelo matemático proposto para a fermentação em batelada alimentada descreveu adequadamente os resultados experimentais, este modelo será utilizado na otimização dinâmica do processo, tendo como variável de controle a vazão de alimentação do substrato.

CAPÍTULO 5

OTIMIZAÇÃO DINÂMICA DA FERMENTAÇÃO EM BATELADA ALIMENTADA

5.1 Revisão Bibliográfica

A otimização matemática busca responder à pergunta "O que é melhor?" para problemas em que a qualidade de uma resposta pode ser medida por um número. Estes problemas aparecem em praticamente todas as áreas do conhecimento: negócios, ciências físicas, químicas e biológicas, engenharia, arquitetura, economia e administração. A quantidade de ferramentas disponíveis para auxiliar nesta tarefa é quase tão grande quanto o número de aplicações (Biscaia Jr., 2007).

O Problema de Otimização Dinâmica (POD) consiste na determinação dos perfis de variáveis de controle que maximizam ou minimizam uma função objetivo ou função custo, sujeita ou não a restrições algébricas de igualdade e desigualdade, equações diferenciais ordinárias e parciais e a restrições laterais (domínio ou espaço de busca das variáveis de projeto). O aumento significativo de sua aplicação nas indústrias, ocorrido na última década, foi devido à popularidade das ferramentas de simulação dinâmica e dos mercados competitivos associados a especificações de desempenho do processo cada vez mais exigentes e sujeitas a mais restrições. À medida que a otimização dinâmica automatiza a tomada de decisões, ela se estabelece como uma tecnologia útil e confiável para a análise de processos e fomenta novas aplicações: o tratamento de problemas com restrição e não suaves, a síntese de redes de reatores químicos, o tratamento de incertezas em problemas em períodos múltiplos e a avaliação de ferramentas como a diferenciação automática. Estas aplicações estabelecem novos desafios que, uma vez ultrapassados, tornam as estratégias de decisão mais refinadas (Biegler, 1984; Pfeifer, 2007).

As estimações de estratégias de alimentação ótimas têm sido realizadas de várias formas para melhorar os bioprocessos em batelada alimentada. Algumas destas estratégias resolvem o problema de otimização por meio da Teoria do Controle Ótimo, por Programação Dinâmica Iterativa (IDP), por Métodos do Tipo Gradiente Conjugado de Primeira Ordem, Seleção de Malha Adaptativa, Redes Neuronais, Aproximações Não Singulares e Estratégias Evolutivas baseadas nos Algoritmos Genéticos. Com exceção do método que utiliza Redes Neuronais, todos os outros métodos fazem uso de modelos matemáticos detalhados para as cinéticas e balanços de massa do sistema sob consideração.

Teoricamente, todos estes biossistemas podem ser otimizados com o método de Pontryagin. Entretanto, deve ser destacado que, mesmo quando o método gera uma solução analítica, sua utilização é restringida pela complexidade do modelo e restrições impostas por ele. Portanto, quando biossistemas com cinéticas altamente não lineares são considerados, sua aplicação é especialmente complicada (Franco-Lara e Weuster-Botz, 2005). A seguir, alguns trabalhos que utilizaram das metodologias citadas anteriormente, são apresentados.

Modak *et al.* (1986) desenvolveram perfis ótimos da taxa de alimentação volumétrica para processos fermentativos em batelada alimentada utilizando o princípio de Pontryagin e a Teoria do Controle Singular. Eles propuseram que a taxa de alimentação deveria ser manipulada primeiro para favorecer o crescimento das células e só então para propiciar a formação de produto. Assim, os autores classificaram os processos fermentativos segundo a forma, por apresentar ou não um ponto de máximo, das taxas específicas de crescimento de células e de formação de produto. A seqüência ótima dos períodos de taxa de alimentação mínima, máxima e singular foi determinada em função das taxas específicas de crescimento e formação do produto e das condições iniciais do processo. Conforme as seqüências ótimas citadas no trabalho anterior, Lim *et al.* (1986) desenvolveram algoritmos computacionais para determinação dos perfis ótimos e dos tempos de troca entre os diferentes valores da taxa de alimentação. Modak e Lim (1987) desenvolveram um esquema de otimização *feedback* no qual a taxa de alimentação foi definida como uma função não linear das variáveis de estado (concentrações de substrato, produto, massa celular e o volume do fermentador). Kurtanjek (1991) descreveu um método para otimização multidimensional de fermentações em batelada alimentada baseado na técnica de colocação ortogonal. As variáveis de controle e de estado foram reformuladas para obter uma forma não singular do problema de otimização e a concentração de substrato no fermentador foi usada como uma variável de decisão auxiliar.

Uma outra alternativa proposta pela literatura para lidar com dificuldades computacionais foi a transformação do problema singular original em um problema não singular. Isso pôde ser feito por uma transformação proposta por Kelley (1965). Esta transformação, além de evitar o problema singular, reduziu a dimensão do problema original por meio de uma transformação de variáveis de estado (Costa, 1996). No trabalho de Chen e Hwang (1990) o problema de controle liga-desliga ótimo de um processo geral foi descrito por equações algébrico-diferenciais. Este problema com parametrização nas variáveis de controle se caracterizou como um problema de seleção de parâmetros de dimensão finita. Um algoritmo unificado, no qual se utilizaram a transformação de Kelley foi proposto para calcular os gradientes da função custo e as restrições.

Fu e Barford (1993) descreveram os processos de fermentação por uma modelagem algébrico-diferencial e utilizaram a transformação de Kelley para transformar o problema da determinação da taxa volumétrica de alimentação do substrato em um problema não singular, derivado da aplicação do princípio máximo de Pontryagin.

Wang e Shyu (1997) propuseram um algoritmo modificado de programação dinâmica iterativa (PDI) para resolver um problema de otimização dinâmica com restrições e empregaram a programação quadrática seqüencial para comparar os resultados. O mesmo algoritmo foi utilizado por Chiou e Wang (1999) para resolver um PCO simplificado do processo de fermentação em batelada alimentada. Neste caso, a vazão de alimentação foi primeiro discretizada em um conjunto de 20 partições de ações de controle constantes. O método de Evolução Diferencial Híbrida (HDE) aliado ao método de atualização dos multiplicadores foi usado para resolver o problema aproximado.

Costa *et al.* (1998) desenvolveram um esquema de controle ótimo adaptativo no qual o perfil pré-otimizado da variável de controle foi corrigido *online* em cada tempo de amostragem. Para lidar com a estimação dos parâmetros cinéticos, um modelo neuronal híbrido foi proposto.

Um problema de otimização dinâmica da fermentação em batelada alimentada foi resolvido por Wang *et al*. (2001) utilizando o modelo cinético de Monod, a fim de determinar os perfis de taxas de alimentação ótimos. Consideraram uma estratégia de controle *bang-bang* para cada modelo, além de um perfil de taxa de alimentação constante. Eles introduziram um método do tipo lagrangeano para o HDE lidar com o problema de otimização com restrições de desigualdade. As soluções ótimas foram então comparadas com os experimentos em batelada alimentada para validar o modelo cinético. Nestes experimentos, além de utilizarem os perfis de taxa de alimentação ótima e o de taxa de alimentação constante, também variaram as concentrações de glicose alimentada. Pela comparação dos resultados experimentais, concluíram que o perfil de taxa de alimentação ótimo, considerando o modelo cinético proposto, é mais adequado que os outros dois perfis, o de taxa de alimentação constante e o de Monod. Diversos métodos também foram empregados para resolver tanto o problema da estimativa dos parâmetros quanto o problema de otimização para comparação.

Franco-Lara e Weuster-Botz (2005) apresentaram um método que gerou perfis de alimentação ótimos para fermentações em batelada alimentada. Tal método se baseou em redes neuronais artificiais e criação de trajetórias contínuas não lineares suaves da taxa de alimentação. Os perfis calculados não se restringiram a um dado padrão, devido principalmente à capacidade dos sistemas de redes neuronais reproduzirem qualquer função não linear após um procedimento de treinamento próprio.

Técnicas de controle ótimo foram utilizadas no trabalho de Ribeiro e Giordano (2005) para otimizar a alimentação de reagentes na síntese enzimática de ampicilina em reator operando em batelada alimentada. Os resultados simulados mostraram que em reator integrado operado em batelada alimentada, pode-se alcançar maiores conversões, rendimentos e produtividades do produto de interesse considerado.

Lobato *et al.* (2006) introduziram uma metodologia sistemática para a eliminação da dependência das variáveis adjuntas do sistema de equações algébrico-diferenciais resultante do Princípio de Pontryagin, com a transformação do problema original em um problema de identificação de fases com índice diferencial flutuante e dos respectivos tempos de troca. Esta estratégia consistiu da transformação do problema de valor no contorno original em uma seqüência de problemas de valor inicial definidos por fases, cujas características foram definidas pelos respectivos índices e pela seqüência de eventos. A metodologia proposta foi baseada nas condições de operação do processo, metas de otimização para definir a seqüência de eventos e características das equações do modelo, que em sua formulação final deveria ser necessariamente bem posta. A metodologia desenvolvida apresentou bons resultados quando comparados aos da literatura.

No presente trabalho, o POD é aplicado no estudo da fermentação alcoólica em modo de operação batelada alimentada, para determinar o perfil ótimo de alimentação de substrato que maximiza a produção de etanol. Este POD é naturalmente um problema de difícil resolução devido à flutuação do índice diferencial que ocorre ao longo da integração do sistema. Dessa forma, a resolução deste problema consiste na determinação da seqüência de arcos não singulares e singulares e os tempos nos quais ocorre a transição entre eles (eventos ou *switching times*). Para resolver esse tipo de POD, existe a necessidade da obtenção da Função Identificadora de Fases (FIF), cujo monitoramento permitirá a identificação dos eventos e do controle singular que será aplicado ao sistema (Lobato, 2006).

Alguns conceitos fundamentais são descritos a seguir, para melhor compreensão da metodologia empregada na otimização dinâmica da fermentação em batelada alimentada utilizando a estratégia de Lobato *et al.* (2006), que utiliza a abordagem algébrico-diferencial.

<u>Sistemas de Equações Algébrico-Diferenciais (EADs)</u> – é um sistema de equações que pode ser escrito como:

$$f(\dot{z}, z, u, t) = 0 \tag{5.1}$$

Nas EADs existem restrições algébricas na variável de estado *z*, que podem aparecer explicitamente como em

$$g(\dot{z}, z, y, t) = 0 \quad (5.2)$$
$$h(w, y, t) = 0 \quad (5.3)$$

em que z = (w,y), ou podem aparecer implicitamente devido à singularidade de $\frac{df}{dz}$ quando existem linhas não nulas.

Índice Diferencial de EADs – é o número mínimo de vezes que o sistema de EADs ou parte dele deve ser diferenciado em relação a *t* para determinar $\dot{z}$ como uma função contínua de *z* (Pantelides, 1988).

EADs de Índice Superior e Redução de Índice – EADs de índice superior são as equações com índice maior do que 1. Do ponto de vista da solução numérica é desejável que o índice das EADs seja o menor possível devido à dificuldade associada à solução dessas EADs, que pode ser comparada à solução de EDOs com rigidez numérica (Pfeifer, 2007).

Princípio do Mínimo de Pontryagin (PMP) – é decorrente da imposição de que o *Hamiltoniano* de um sistema contínuo sujeito a restrições de desigualdade nas variáveis de controle deve ser minimizado para qualquer conjunto possível destas variáveis de controle. É aplicável a problemas com variações fortes e restrições de fim e foi estabelecido por Pontryagin em 1962 (Bryson e Ho, 1975).

Arcos Singulares – arcos onde a matriz de derivadas segundas do *Hamiltoniano* com relação às variáveis de controle é singular. Os problemas de otimização lineares podem apresentar impulsos nas variáveis de controle se elas não forem submetidas a limites. Quando estes limites são impostos, a solução apresenta períodos com a variável de controle nos limites de restrição e arcos singulares. As variáveis de controle freqüentemente apresentam descontinuidades quando passam do arco restrito para o arco singular ou vice-versa (Bryson e Ho, 1975). Devido a estes arcos singulares, o perfil de controle não tem influência direta sobre as condições de otimalidade do *Hamiltoniano* e, portanto, a determinação da variável de controle exige condições adicionais que podem ser de difícil manuseio (Cuthrel e Biegler, 1989). Os problemas de reatores batelada alimentada, a manipulação de vazões em reatores químicos, colunas de destilação, extratores e trocadores de calor são casos típicos de problemas com controle singular (Modak *et al.*, 1986).

Eventos – são pontos isolados no tempo onde os comportamentos contínuos e discretos interagem entre si. Nesses pontos podem ocorrer mudanças na forma funcional das EADs e nas trajetórias das variáveis de controle em cada fase decorrentes de descontinuidades nas

trajetórias de estado e das variáveis adjuntas. Do ponto de vista algébrico-diferencial, estas mudanças causam a flutuação do Índice Diferencial ao longo das fases (Lobato, 2004; Pfeifer, 2007).

Função Identificadora de Fases (FIF) – são funções que indicam quando uma restrição que está ativa torna-se inativa e vice-versa. Um caso particular de grande interesse é quando a variável de controle aparece linearmente na função *Hamiltoniano*. Em geral, nenhum mínimo existirá para tais problemas a menos que restrições de desigualdade nas variáveis de estado e de controle sejam especificadas. Se as restrições de desigualdade são lineares na variável de controle, é razoável esperar que a solução mínima, se existir, sempre exigirá que a variável de controle esteja localizada em um ponto ou outro do limite da região viável de controle (Bryson e Ho, 1975). Seja o seguinte sistema de equações:

$$\dot{z} = f(z) + g(z)u \tag{5.4}$$
$$z(0) = z_0 \tag{5.5}$$

com a variável de controle escalar dada por

$$u_{min} \leq u \leq u_{max} \tag{5.6}$$

A função *Hamiltoniano* é definida como

$$H = \lambda^T (f(z) + g(z)u) \tag{5.7}$$

Para essa classe de controle tem-se

$$u(t) = \begin{cases} u_{max} & se \quad \lambda^T g < 0 \\ FIF & se \quad \lambda^T g = 0 \\ u_{min} & se \quad \lambda^T g > 0 \end{cases} \tag{5.8}$$

No trabalho de Seywald *et al.* (*apud* Pfeifer, 2007), obtiveram trajetórias ótimas de um foguete em um plano vertical aplicando o Princípio do Mínimo de Pontryagin. Para obter estes resultados, formularam FIFs associadas a doze possíveis lógicas de controle baseadas na ativação/desativação de restrições e nos sinais das variáveis adjuntas que necessariamente tivessem significado do ponto de vista da engenharia e não somente significado matemático.

Santos *et al.* (2005) determinaram a FIF para um PCO da fermentação alcoólica em reator batelada alimentada para maximização do produto com restrições no rendimento em etanol, na variável de controle e no volume do fermentador, considerando operação com

tempo final livre e que apresentou arcos singulares. A estratégia de controle foi definida em 5 fases (2 com controle singular e 3 com controle *bang-bang*) baseada em aspectos físicos do problema. O índice diferencial flutuou entre 1 e 3 ao longo destas fases e o PCO foi resolvido por fase como um sistema de EDOs de valor inicial.

Na próxima Seção é apresentada uma definição geral do Problema de Controle Ótimo ou Otimização Dinâmica.

5.1.1 O Problema Geral de Otimização

A Função Objetivo é uma função que associa cada ponto no espaço de soluções a um número real. Este número permite medir a qualidade de uma resposta: no problema de minimização, quanto menor este valor, melhor a resposta. No problema de maximização, o inverso ocorre. O tratamento matemático de problemas de maximização e minimização é análogo (Biscaia Jr., 2007).

Segundo Logsdon e Biegler (1989), o Problema de Controle Ótimo Algébrico-Diferencial (PCOAD) é definido de modo geral pela Função Objetivo definida pela Eq. (5.9):

$$\min_{u(t),z(t)} \psi(z(t_f),t_f) + \int_{t_0}^{t_f} L(z(t),u(t),t)dt \tag{5.9}$$

sujeito às restrições:

$$g(\dot{z}(t),z(t),u(t),t) \leq 0 \tag{5.10}$$

$$h(\dot{z}(t),z(t),u(t),t) = 0 \tag{5.11}$$

$$z_{min} \leq z(t) \leq z_{max} \tag{5.12}$$

$$u_{min} \leq u(t) \leq u_{max} \tag{5.13}$$

definidas nos domínios

$$\psi : \mathbb{R}^{n_z} \rightarrow \mathbb{R}^1 \qquad g : \mathbb{R}^{n_z+n_u+1} \rightarrow \mathbb{R}^{n_g}$$

$$L : \mathbb{R}^{n_z+n_u+1} \rightarrow \mathbb{R}^1 \qquad h : \mathbb{R}^{n_z+n_u+1} \rightarrow \mathbb{R}^{n_h}$$

em que *z(t)* e *u(t)* são, respectivamente, os vetores das variáveis de estado e de controle, $\psi(z(t_f),t_f)$ é o primeiro termo da Função Objetivo avaliado em $t=t_f$, *L(z(t), u(t), t)* um funcional dos vetores de controle e estado e o segundo termo da Função Objetivo, *g(z(t), u(t), t)* e *h(z(t), u(t), t)* são os vetores de restrições de desigualdade e igualdade, respectivamente. Os subscritos *min* e *max* identificam os limites inferior e superior das variáveis.

Na formulação de um POD do processo de fermentação em batelada alimentada, tem-se como exemplo de variáveis de controle, Funções Objetivo e restrições de igualdade e desigualdade:

Variáveis de controle: as variáveis de controle principais são a taxa de alimentação de substrato, a velocidade de agitação, a taxa de adição de ácido e base e a taxa de fluxo de

água num reator com camisa de aquecimento, por ser a temperatura, a concentração de substrato e o pH, as variáveis que mais se relacionam com o estado da fermentação (Kurtanjek, 1991).

Funções Objetivo: na Tab. 5.1 são exibidas algumas Funções Objetivo e seus respectivos autores.

Tabela 5.1 – Funções Objetivo empregadas no POD envolvendo o processo de fermentação em batelada alimentada.

Autores	Função Objetivo	Nº da Equação
Modak *et al.* (1986)	$J = min\left(-\frac{p(t_f)}{t_f}\right)$	5.14
Modak *et al.* (1986)	$J = min(t_f)$	5.15
Chen e Hwang (1990) e Fu e Barford (1993)	$min\ J = -[exp(y_2(t_f))]$	5.16*
Wang e Shyu (1997)	$J = \min_{u(t)}(-p(t_f)v(t_f)) = \max_{u(t)}(p(t_f)v(t_f))$	5.17
Wang *et al.* (2001)	$\max_{u(t),t_f} J = [p(t_f)v(t_f) - p_0v_0]/t_f$	5.18

* $y_2 = \ln(pv)$.

Restrições de igualdade e desigualdade: Dependendo da variável de controle escolhida para o problema de otimização, algumas restrições devem ser impostas para evitar resultados não realísticos. Algumas restrições estão apresentadas na Tab. 5.2.

Tabela 5.2 – Restrições impostas no POD envolvendo o processo de fermentação em batelada alimentada.

Autores	Função Objetivo	Nº da Equação
Fu e Barford (1993)	$\varepsilon \le \frac{y_{p/s}}{x}\frac{ds}{dt} \doteq \frac{y_{p/s}}{x}\frac{\Delta s}{\Delta t}$	5.19*
Costa (1996)	$0 \le D(t) \le \frac{u_{max}}{v(t)}$	5.20
Wang e Shyu (1997)	$0 \le u(t) \le u_{max}$	5.21
	$g_1 = v(t) - v_f \le 0$	5.22
	$g_2 = -s(t) \le 0$	5.23
	$g_3 = \frac{p(t)v(t) - p_0v_0}{[v(t) - v_0]s_F + v_0s_0 - v(t)s(t)} - y_{p/s} \le 0$	5.24
	$g_4 = p(t_f) - p_f = 0$	5.25
Wang *et al.* (2001)	$g_5 = s(t) - s_r \le 0$	5.26

* ε é a produtividade específica

- Condições Necessárias para a Otimização Dinâmica de Equações Agébrico-Diferenciais

As condições necessárias para o ótimo para problemas nos quais o sistema dinâmico é descrito somente através de equações diferenciais ordinárias são bem estabelecidos na literatura (Bryson,1975; Ray, 1981; Renfro, 1986; Feehery, 1998).

Para o problema de otimização dinâmica considerado nesta Seção, o vetor inicial das variáveis de estado é conhecido (isto é, o vetor inicial não é determinado pela otimização), as trajetórias de controle não estão sujeitas a restrições e as trajetórias de estado são restritas por EADs. Este problema pode ser expresso matematicamente como:

$$\min_{u(t),z(t)} \psi(z(t_f),t_f) + \int_{t_0}^{t_f} L(z(t),u(t),t)dt \tag{5.27}$$

sujeito ao sistema de EADs:

$$f(\dot{z}(t),z(t),u(t),t) = 0 \tag{5.28}$$

com condições iniciais dadas por:

$$\varphi(\dot{z}(t_0),z(t_0),t_0) = 0 \tag{5.29}$$

Admitindo que o tempo inicial (t_o) e a condição $z(t_o)$ são fixos, a função objetivo pode ser reescrita como:

$$J = \int_{t_0}^{t_f} \overline{L}(\dot{z}(t),z(t),u(t),t)dt \tag{5.30}$$

em que:

$$\overline{L}(\dot{z}(t),z(t),u(t),t) = \frac{d\psi}{dt} + L = \frac{\partial\psi}{\partial t} + \left[\frac{\partial\psi}{\partial z}\right]^T \dot{z} + L \tag{5.31}$$

A função objetivo aumentada é obtida pela junção das restrições à Função Objetivo por meio do uso de variáveis adjuntas λ(t):

$$\overline{J} = \int_{t_0}^{t_f} (\overline{L}(\dot{z}(t),z(t),u(t),t) + \lambda^T(t) f(\dot{z}(t),z(t),u(t),t))dt \tag{5.32}$$

Por conveniência o *Hamiltoniano* é definido como:

$$H = \bar{L}(\dot{z}(t), z(t), u(t), t) + \lambda^T(t) f(\dot{z}(t), z(t), u(t), t) \tag{5.33}$$

As condições necessárias de primeira ordem para o ótimo podem ser determinadas fixando a variação de $\bar{J}$ igual a zero. As condições então são:

$$\left[\frac{\partial H}{\partial z} - \frac{d}{dt}\left[\frac{\partial H}{\partial \dot{z}}\right]\right] = 0 \tag{5.34}$$

$$\frac{\partial H}{\partial u} = 0 \tag{5.35}$$

$$\frac{\partial H}{\partial \lambda} = 0 \tag{5.36}$$

$$\left[\frac{\partial H}{\partial \dot{z}}\right]_{t=t_f} + \left[H - \frac{\partial H}{\partial \dot{z}}\dot{z}\right]_{t-t_f} = 0 \tag{5.37}$$

Admitindo que as derivadas parciais de segunda ordem são contínuas, a ordem de diferenciação pode ser mudada obtendo-se as seguintes expressões:

$$\frac{\partial L}{\partial z} + \lambda^T \frac{\partial f}{\partial z} - \dot{\lambda}^T \frac{\partial f}{\partial \dot{z}} - \lambda^T \frac{d}{dt}\left[\frac{\partial f}{\partial \dot{z}}\right] = 0 \tag{5.38}$$

$$\frac{\partial L}{\partial z} + \lambda^T \frac{\partial f}{\partial u} = 0 \tag{5.39}$$

$$f(\dot{z}, z, u, t) = 0 \tag{5.40}$$

$$\left[\lambda^T \frac{\partial f}{\partial \dot{z}} + \frac{\partial \psi}{\partial z}\right]_{t-t_f} \delta z_f + \left[\frac{\partial \psi}{\partial t} + L + \lambda^T f - \lambda^T \left[\frac{\partial f}{\partial \dot{z}}\right]\dot{z}\right]\delta t_f = 0 \tag{5.41}$$

Estas condições são uma generalização das condições necessárias, também chamadas de equações de Euler-Lagrange, para a otimização dinâmica de sistemas de EADs. Casos particulares que envolvem problemas com tempos fixos finais ou livres são mostrados na sequência.

- <u>Problemas com o Tempo Final Fixo</u>

Se t_f é fixo então δt_f é igual a zero na Eq.(5.41). Se a variável de estado não for especificada no tempo final, as condições no ponto final têm que satisfazer a:

$$\left[\lambda^T \frac{\partial f}{\partial \dot{z}} + \frac{\partial \psi}{\partial z}\right]_{t-t_f} \delta z_f = 0 \tag{5.42}$$

Como δz_f é arbitrário, isso implica que $\delta z_f \neq 0$, portanto tem-se neste caso:

$$\left[\lambda^T \frac{\partial \boldsymbol{f}}{\partial \dot{\boldsymbol{z}}} + \frac{\partial \psi}{\partial \boldsymbol{z}}\right]_{t-t_f} = 0 \tag{5.43}$$

- Problemas com o Tempo Final Livre

Como t_f é livre, a suposição de que δt_f =0 não pode ser feita. Neste caso além das condições já discutidas, para o caso em que se têm as variáveis de estado fixas no tempo final ou variáveis de estado livres, o sistema deverá atender a seguinte condição:

$$\left[\frac{\partial \psi}{\partial \boldsymbol{z}} + L + \lambda^T \boldsymbol{f} - \lambda^T \left[\frac{\partial \boldsymbol{f}}{\partial \dot{\boldsymbol{z}}}\right] \dot{\boldsymbol{z}}\right]_{t=t_f} = 0 \tag{5.44}$$

As equações de Euler-Lagrange foram demonstradas para um problema de otimização simples e sem restrições na trajetória. Alguns casos especiais de problemas de controle ótimo e as variações que ocorrem na obtenção dessas equações, para sistemas com restrições de igualdade e desigualdade, são encontrados em Bryson e Ho (1975).

Os métodos de resolução de PODs são apresentados a seguir.

5.1.2 Métodos Numéricos de Solução de Problemas de Otimização Dinâmica

a) Métodos Indiretos:

Os Métodos Indiretos surgiram com o desenvolvimento do cálculo variacional, permitindo a dedução das condições necessárias e suficientes para a solução de problemas de otimização dinâmica (Bryson e Ho, 1975). Trabalhos como os de Bryson e Ho (1975), Lynn *et al.* (1970), Lynn e Zahradnik (1987), aplicaram o princípio de Pontryagin com a geração das equações diferenciais adjuntas e da condição necessária para a minimização da função *Hamiltoniano*, transformando o problema original em um problema de valor no contorno algébrico-diferencial (PVCAD). Estes problemas podem ser resolvidos por métodos de discretização como colocação em elementos finitos e diferenças finitas, “chute” simples e múltiplo.

Segundo Chudej e Günther (1999) os métodos indiretos podem ser utilizados de modo eficiente devido ao desenvolvimento de programas de álgebra computacional, que permite a obtenção automática das equações diferenciais adjuntas e demais condições de

otimalidade. Desta forma, podem ser obtidas soluções altamente precisas e testes feitos *a posteriori* podem excluir as soluções subótimas.

Estes métodos têm como vantagem a geração das condições ótimas (conjunto de EADs) para a otimização dinâmica de problemas de controle pela aplicação do princípio de Pontryagin. E como desvantagem tem-se a geração das equações adjuntas que é tediosa e complicada para sistemas de grande dimensão, a dificuldade na convergência dos problemas de valor no contorno e a falta de garantia da unicidade da solução.

b) Métodos Diretos:

Os Métodos Diretos transformam o problema de controle ótimo num problema de Programação Não Linear (NLP). Eles podem utilizar as abordagens seqüencial e simultânea. A seqüencial consiste na parametrização da variável de controle. Neste caso as condições iniciais e o conjunto de parâmetros de controle são conhecidos e os sistema de EADs é discretizado por uma aproximação polinomial e em seguida é resolvido por um NLP. Esse procedimento determina o valor da função objetivo e das restrições encontrando valores ótimos de coeficientes na parametrização do controle. A abordagem simultânea consiste na parametrização tanto da variável de controle quanto da variável de estado. Como resultado dessa parametrização as EADs são resolvidas somente uma vez, no ponto ótimo, o que evita soluções intermediárias que não existem ou esforço computacional excessivo. Tem como vantagem a solução rápida, e como desvantagem a dificuldade na determinação da otimalidade.

b) Métodos Mistos:

Os Métodos Mistos ou Híbridos são uma combinação dos métodos diretos e indiretos. Nesse método, os métodos diretos são aplicados a problemas mais simplificados e os resultados servem de estimativas para os métodos indiretos, com refinamento da solução.

Lobato (2004) resolveu PODs inicialmente pelo método direto utilizando o código Dircol - Método de Colocação Direta (Stryk, 1999), buscando a melhor solução possível fornecida pelo código, que forneceu também a estimativa dos eventos e do perfil das variáveis adjuntas. Com a estimativa dos eventos e análise dos resultados obtidos, foram construídas as FIFs. Os problemas de valor no contorno de índice 1 de cada fase, foram resolvidos seqüencialmente pelo código Coldae - Método de Colocação da Equação Algébrico-Diferencial (Ascher e Spiteri, 1994). O autor demonstrou que este método possui

aplicabilidade a problemas com restrições nas variáveis de estado e com controle linear nas restrições, que provocam flutuações no índice dos PODADs.

5.2 Metodologia da Otimização Dinâmica da Fermentação em Batelada Alimentada

A seguir será descrito o procedimento utilizado neste trabalho para a determinação da FIF (Costa, 1996; Santos *et al.*, 2005; Lobato *et al.*, 2006) o qual foi implementado no Maple® 9.5. O POD foi resolvido no programa Matlab®.

A estratégia de controle é aplicada na maximização da produção de etanol (Eq. 5.45), sujeita às Eqs. (5.46-5.50), com tempo final livre, volume final (v_f) do fermentador igual a 4,985 L, com a variável de controle limitada por u_{min} = 0 L/h e u_{max} = 2 L/h (Santos *et al.*, 2005).

$$J = \min_{u(t)}\left[-\left(p(t)v(t) - p_0 v_0\right)\right] = \max_{u(t)}\left(p(t)v(t) - p_0 v_0\right) \tag{5.45}$$

Admite-se que as densidades do meio de alimentação e do meio em fermentação são iguais e constantes e que a operação é isotérmica.

$$\dot{x} = -\frac{u}{v}x + \mu x \qquad x(0) = x_0 \tag{5.46}$$

$$\dot{s} = \frac{u}{v}\left(s_F - s\right) - \sigma x \qquad s(0) = s_0 \tag{5.47}$$

$$\dot{p} = -\frac{u}{v}p + \pi x \qquad p(0) = p_0 \tag{5.48}$$

$$\dot{v} = u \qquad \begin{array}{l} v(0) = v_0 \\ v(t_f) = v_{max} \end{array} \qquad \begin{array}{r} (5.49) \\ (5.50) \end{array}$$

As variáveis x, s e p são respectivamente, as concentrações de células, sacarose e etanol, v é o volume do fermentador, u é a vazão de alimentação de substrato (variável de controle), s_F a concentração de sacarose no meio de alimentação, μ, σ e π são as taxas específicas de crescimento de células, consumo de substrato e formação de produto, respectivamente.

Os modelos cinéticos não-estruturados utilizados considerando os efeitos de inibição (Eqs. 5.51-5.53) são os seguintes:

$$\mu = \mu_m \left(\frac{s}{k_s + s + \frac{s^2}{k_i}} \right) \left(1 - \frac{p}{p_m} \right)^n \tag{5.51}$$

$$\sigma = \left(\frac{1}{y_{xs}} \mu + m_s \right) \tag{5.52}$$

$$\pi = \frac{y_{ps}}{y_{xs}} \mu \tag{5.53}$$

A taxa de diluição (D ≡ u/v) foi definida como variável de controle do sistema formado pelas Eqs. (5.46-5.50), que ficaram da seguinte forma:

$$\dot{x} = -Dx + \mu x \tag{5.54}$$

$$\dot{s} = D(s_F - s) - \sigma x \tag{5.55}$$

$$\dot{p} = -Dp + \pi x \tag{5.56}$$

$$\longrightarrow \qquad f = \begin{bmatrix} f_1 \\ f_2 \\ f_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \dot{x} \\ \dot{s} \\ \dot{p} \end{bmatrix}$$

Assim, o número de variáveis de estado é reduzido estrategicamente levando à redução do número de variáveis adjuntas desse novo sistema.

A implementação da estratégia de controle é feita da seguinte forma:

- ✓ Primeira fase ($t_o < t \leq t_{s1}$): no início do processo *s(0)* = 0, assim, *u* deve ser igual a u_{max} para propiciar o crescimento das células com o aumento da concentração de substrato no meio de fermentação (segundo Modak *et al.* (1986), uma vez que a concentração inicial de substrato é baixa, a vazão de alimentação deve começar com o valor máximo até que o arco singular seja alcançado, onde o controle singular assume. Desde que π, da mesma forma que μ, seja não monotônica, este controle singular muda a concentração de substrato de forma a favorecer maiores taxas específicas de crescimento celular no início da fase singular e maiores taxas de formação de produto mais adiante);

- ✓ Segunda fase ($t_{s1} < t \leq t_{s2}$): inicia-se tão logo que a primeira fase é encerrada quando a FIF é nula, então o controle singular é obtido a partir da diferenciação da FIF com relação ao tempo (tem-se $u = u_{singular}$);

- ✓ Terceira fase ($t_{s2} < t \leq t_f$): quando a restrição no volume do fermentador é satisfeita ($v = v_f$), o controle singular chega ao fim e *u* passa a ser igual a u_{min} ($u_{min} = 0$). O processo continua até que a concentração de substrato seja bem pequena (na ordem de 10^{-7}), o que determina o tempo final da fermentação.

Esta estratégia de controle é resumida na Tab. 5.3, com o índice diferencial associado a cada fase.

Tabela 5.3 - Estratégia de controle e índice diferencial definido por fase.

	$t_o < t \leq t_{s1}$	$t_{s1} < t \leq t_{s2}$	$t_{s2} < t \leq t_f$
Controle Ótimo	u_{max}	$u_{singular}$	u_{min}
Índice Diferencial	1	3	1

A seguir, é apresentado o desenvolvimento para a obtenção do perfil da variável de controle no arco singular ($u_{singular}$).

Para este caso estudado L=0 e a função *Hamiltoniano* é expressa pela Eq. 5.57 (Bryson e Ho, 1975).

$$H \equiv \lambda^T f \tag{5.57}$$

A função *Hamiltoniano* é redefinida como:

$$H = (-x\lambda_1 + (s_f - s)\lambda_2 - p\lambda_3)D + \mu x\lambda_1 - \sigma x\lambda_2 + \pi x\lambda_3 \tag{5.58}$$

A Eq. 5.59 define as variáveis adjuntas λ_i,

$$\dot{\lambda}_i = \frac{\partial H}{\partial z_i}; \quad \text{sendo } z = \{x, s, p\} \tag{5.59}$$

$$\dot{\lambda}_1 = -(-\lambda_1 D + \mu\lambda_1 - \sigma\lambda_2 + \pi\lambda_3) \tag{5.60}$$

$$\dot{\lambda}_2 = -(-\lambda_2 D + x\lambda_1 \frac{\partial \mu}{\partial s} - x\lambda_2 \frac{\partial \sigma}{\partial s} + x\lambda_3 \frac{\partial \pi}{\partial s}) \tag{5.61}$$

$$\dot{\lambda}_3 = -(-\lambda_3 D + x\lambda_1 \frac{\partial \mu}{\partial p} - x\lambda_2 \frac{\partial \sigma}{\partial p} + x\lambda_3 \frac{\partial \pi}{\partial p}) \tag{5.62}$$

sendo que as condições terminais específicas são dadas pela Eq. 5.63.

$$\lambda_i(t_f) = \left.\frac{\partial \varphi}{\partial z_i}\right|_{t=t_f}; \quad \text{com } \varphi = -(pv - p_0 v_0) \tag{5.63}$$

$$\begin{cases} \lambda_1(t_f) = 0 \\ \lambda_2(t_f) = 0 \\ \lambda_3(t_f) = -v \end{cases} \tag{5.64}$$

A Eq. 5.65 define a condição estacionária.

$$\frac{\partial H}{\partial D} = 0 \tag{5.65}$$

ou

$$(-x\lambda_1 + (s_f - s)\lambda_2 - p\lambda_3) = 0 \tag{5.66}$$

Para problemas em que o tempo final é livre, onde H = 0 (Bryson, 1975; Costa, 1996):

$$\mu x\lambda_1 - \sigma x\lambda_2 + \pi x\lambda_3 = 0 \tag{5.67}$$

As duas equações algébricas (Eq. 5.66 e Eq. 5.67) são usadas para determinar as duas variáveis adjuntas λ_1 e λ_2, em função de λ_3, por exemplo.

Resolvendo as Eqs. 5.66 e 5.67 para λ_1 e λ_2, tem-se:

$$\begin{aligned} \lambda_1 &= a\lambda_3 \\ \lambda_2 &= b\lambda_3 \end{aligned} \tag{5.68}$$

onde *a* e *b* são funções apenas das variáveis de estado *x*, *s* e *p*.

Para determinar a variável adjunta λ_3, mais uma equação é necessária. Pela diferenciação da Eq. 5.66 com relação ao tempo tem-se:

$$-\dot{x}\lambda_1 - \dot{\lambda}_1 x + (s_f - s)\dot{\lambda}_2 - \dot{s}\lambda_2 - \dot{p}\lambda_3 - \dot{\lambda}_3 p = 0 \tag{5.69}$$

Substituindo $\dot{x}, \dot{s}$ e $\dot{p}$ por f_1, f_2 e f_3, e $\dot{\lambda}_1, \dot{\lambda}_2$ e $\dot{\lambda}_3$ pelas Eqs. 5.60, 5.61 e 5.62 respectivamente, uma expressão simplificada é obtida:

$$A\lambda_1 + B\lambda_2 + C\lambda_3 = 0 \tag{5.70}$$

onde *A*, *B* e *C* são funções apenas das variáveis de estado. Pela substituição da Eq. 5.68 na Eq. 5.70 e posterior rearranjo, obtém-se a Eq. 5.71. Isto é possível devido à linearidade das variáveis adjuntas.

$$c\lambda_3 = 0 \tag{5.71}$$

Como λ_3 não necessariamente é nulo,

$$c = 0 \tag{5.72}$$

onde *c* é função apenas das variáveis de estado. A Eq. 5.72 é conhecida como Função Identificadora de Fases (Lobato, 2006).

Por fim, é possível obter a expressão para o controle *D* a partir da diferenciação da Eq. 5.72 com relação ao tempo, e posteriormente, obter a variável de controle original *u* durante o arco singular, onde o índice diferencial é igual a 3.

$$D \equiv \frac{u}{v}; \text{ logo, } u_{singular} = D_{singular} v \tag{5.73}$$

Assim, a variável de controle também é obtida em função apenas das variáveis de estado, resultando agora não mais em um problema de controle singular, e sim em um problema de valor inicial de identificação de eventos.

5.3 Resultados e Discussões

Neste estudo, o modelo estimado a partir de todos os experimentos em batelada alimentada com tempo de enchimento de 5 horas (Tab. 3.10), foi utilizado para calcular a vazão de alimentação ótima para o processo em batelada alimentada com concentração de substrato na alimentação igual a 285 g/L, pela determinação da seqüência de arcos não singulares e singulares e os tempos nos quais ocorre a transição entre eles. Este processo específico foi escolhido por ter fornecido uma produção maior de etanol no final das fermentações realizadas e discutidas no Capítulo 2, além de estar próximo das condições industriais.

São apresentados a seguir a identificação dos eventos e os resultados obtidos devido ao novo perfil da variável de controle *u*, com a utilização das condições operacionais exibidas na Tab. 5.4.

Tabela 5.4 – Dados operacionais do processo em batelada alimentada utilizados no experimento, simulação e otimização.

s_F (g/L)	v_0 (L)	v_f (L)	s_0 (g/L)	x_0 (g/L)	p_0 (g/L)	y_{xs} (g/g)	y_{ps} (g/g)
285	1,5	4,985	0	83	36,78	0,017	0,413

A Tab. 5.5 apresenta os eventos calculados na otimização, além dos dados experimentais e simulados para comparação. Estes eventos podem ser conferidos a partir das Figs. 5.1-5.5 pelas divisões destacadas em azul.

O perfil experimental e o simulado iniciam com a vazão máxima de alimentação de substrato (u_{max} = 0,6702 L/h) até o volume total do meio fermentativo ser alcançado (v_{max} = 4,985 L) num tempo de fermentação próximo a 5 horas. Posteriormente, a vazão de alimentação é mínima (u_{min} = 0), até a parada da fermentação no tempo de 11 horas, onde ainda há uma razoável concentração residual de sacarose (s_r). Isto é diferente do que ocorre no perfil otimizado, que inicia com uma vazão máxima de alimentação de substrato (u_{max} = 2,0 L/h) até alcançar o arco singular, onde o volume do meio fermentativo é igual a 2,25 L, num tempo de fermentação igual a 0,376 horas (22,5 min). O perfil é então definido pelo controle singular até o volume máximo do meio ser alcançado (v_{max} = 5,0 L) também num tempo de fermentação próximo a 5 horas. A partir desse instante a vazão de alimentação é mínima (u_{min} = 0) até alcançar uma concentração residual de sacarose na ordem de 10^{-7} g/L, num tempo final de fermentação igual a 12,38 horas. Esta estratégia de

alimentação ótima de substrato foi determinada pela Função Identificadora de Fases (Fig. 5.6). No início a FIF teve valor negativo (-511,6 em t = 0 h) indicando que o processo deveria operar com vazão máxima. Quando a FIF foi nula (em t = 0,376 h), o processo foi regido pelo controle singular, e a partir de t = 5,12 horas a FIF assumiu valores maiores que zero indicando que o processo deveria operar com vazão mínima. No final da fermentação, a FIF teve altos valores (143 em t = 12,38 h). Apesar do valor máximo da vazão do meio alimentado ser igual a 2 L/h, o tempo de fermentação gasto utilizando esta vazão foi bem pequeno, cerca de 22,5 minutos. Os perfis da variável de controle otimizado, experimental e simulado podem ser vistos na Fig. 5.5. Nesta figura, apesar de parecer que a vazão de alimentação tem valor constante na fase referente ao controle singular, existe uma variação que não é evidenciada pela escala utilizada na geração do gráfico.

Tabela 5.5 – Resultados da fermentação, eventos e função objetivo dos perfis estudados.

Perfil	u_{max} (L/h)	t_{s1} (h)	t_{s2} (h)	t_f (h)	p_f (g/L)	s_r (g/L)	pv (g)
Experimental	0,6702	5,2	----	11	91,49	4,574	400,92
Simulado	0,6702	5,2	----	11	91,80	3,038	402,44
Otimizado	2,000	0,376	5,117	*10,99 12,38	*92,79 92,92	*0,4634 10^{-7}	*408,78 409,42

*Resultados da Otimização truncado no tempo de fermentação próximo a 11 horas.

Nos resultados apresentados na Tab. 5.5 e na Fig. 5.9, observa-se que o perfil ótimo obtido da variável de controle realmente fornece maior produção em etanol em todo o tempo do processo fermentativo. O fato de o tempo final da fermentação obtido na otimização ser maior que o tempo final no experimento e na simulação, não quer dizer que os resultados ótimos estejam duvidosos, pois como pode ser visto na Tab. 5.5, mesmo truncando o tempo de fermentação em 10,99 horas, a produção de etanol obtida com o perfil ótimo é maior (pv = 408, 78 g). Por outro lado, o critério de parada usado na otimização foi a concentração residual de substrato igual a 10^{-7} g/L, que é muito menor que as concentrações residuais de substrato obtidas no experimento e simulação. Por isso, o tempo final obtido na otimização foi maior.

A derivada do produto com relação ao tempo igual a zero também foi considerada como uma forma de parar o processo na otimização, o que implica que não é produzido mais produto. Mas essa condição também é alcançada quando a concentração de substrato residual é próxima de zero, portanto o resultado final independe da condição de parada adotada (s_r= 10^{-7} g/L ou $dp/dt = 0$).

Nas Figs. 5.1-5.4 considerando o perfil otimizado, no início do processo ($t_o < t \leq t_{s1}$), nota-se um ligeiro decréscimo da concentração de etanol com o aumento da concentração de sacarose no meio fermentativo. Ou seja, a diluição do meio afetou mais o valor da concentração de etanol que a conversão do substrato em produto. Na fase singular ($t_{s1} < t \leq$

t_{s2}), a concentração de etanol aumenta exponencialmente com o aumento da concentração de sacarose, diferente da concentração de células que continua a diminuir devido ao efeito da diluição do meio. Na fase final ($t_{s2} < t \leq t_f$), como a vazão de alimentação é mínima, a concentração de substrato diminui exponencialmente e uma formação de produto ainda maior é observada. Já a concentração de células é praticamente constante nesta fase. Pelas Figs. 5.1 e 5.3, observa-se que o consumo de substrato foi maior no perfil ótimo havendo maior conversão em etanol, se comparado ao menor consumo de substrato no experimento e na simulação havendo menor conversão em produto.

O rendimento ótimo foi próximo ao experimental e simulado após a fase inicial ($u = u_{max}$), não ultrapassando o valor estequiométrico igual a 0,538 g/g (Fig. 5.7). A taxa específica ótima de crescimento celular atingiu o seu valor máximo logo no início da fermentação, ficando quase constante ao longo da fase singular, e apresentando uma queda expressiva no final da fermentação, onde é evidente a limitação do crescimento pela baixa quantidade de substrato no meio. Esta queda foi maior que a ocorrida no experimento e na simulação. Ou seja, no processo otimizado o substrato foi mais utilizado para produção de etanol que para o crescimento celular.

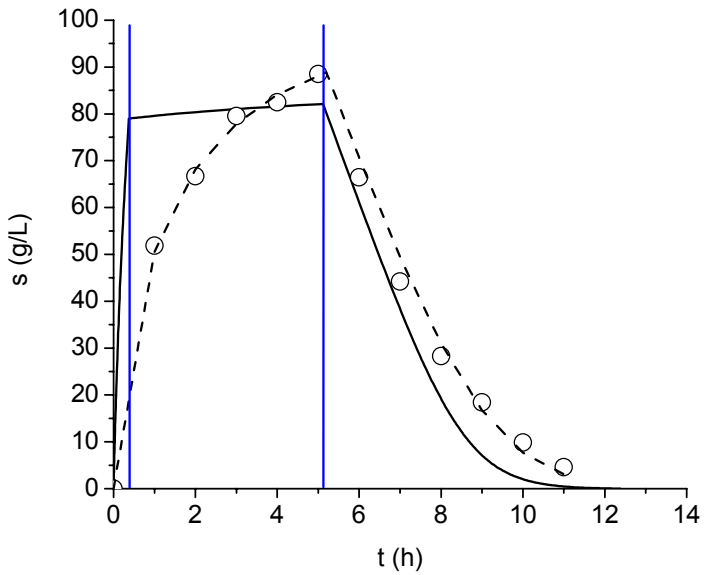


Figura 5.1 – (—) Perfil ótimo da concentração de sacarose. (---) Perfil simulado a partir do modelo estimado. (○) Dados experimentais para batelada alimentada com s_F = 285 g/L e t_e = 5 h. As linhas em azul representam os eventos t_{s1} e t_{s2}.

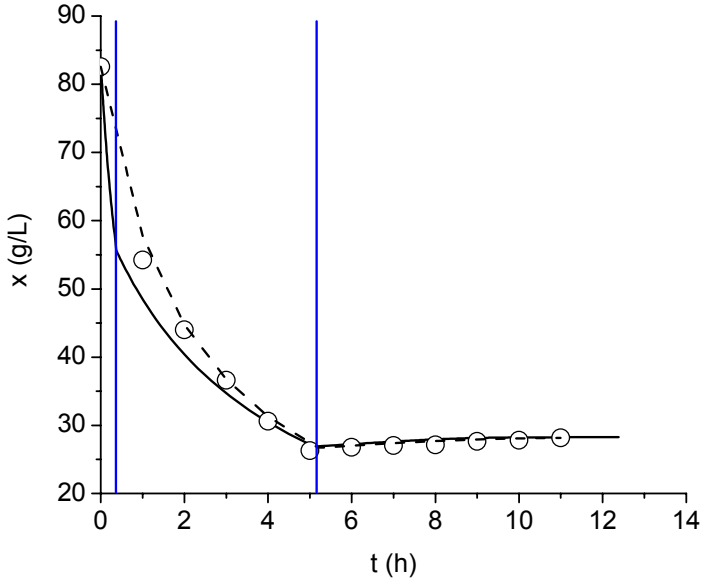


Figura 5.2 - (—) Perfil ótimo da concentração de células. (---) Perfil simulado a partir do modelo estimado. (○) Dados experimentais para batelada alimentada com s_F = 285 g/L e t_e = 5 h. As linhas em azul representam os eventos t_{s1} e t_{s2}.

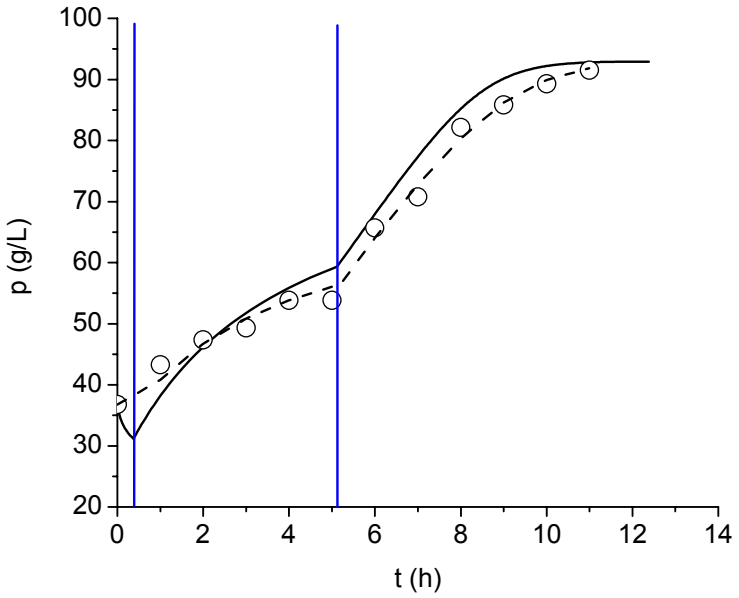


Figura 5.3 - (—) Perfil ótimo da concentração de etanol. (---) Perfil simulado a partir do modelo estimado. (○) Dados experimentais para batelada alimentada com s_F = 285 g/L e t_e = 5 h. As linhas em azul representam os eventos t_{s1} e t_{s2}.

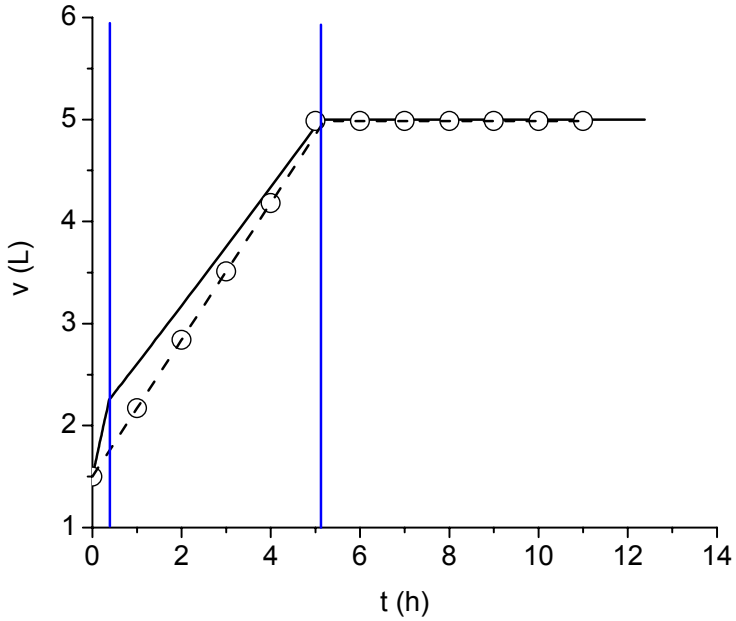


Figura 5.4 - (—) Perfil ótimo do volume do fermentador. (---) Perfil simulado. (○) Dados experimentais para batelada alimentada com s_F = 285 g/L e t_e = 5 h. As linhas em azul representam os eventos t_{s1} e t_{s2}.

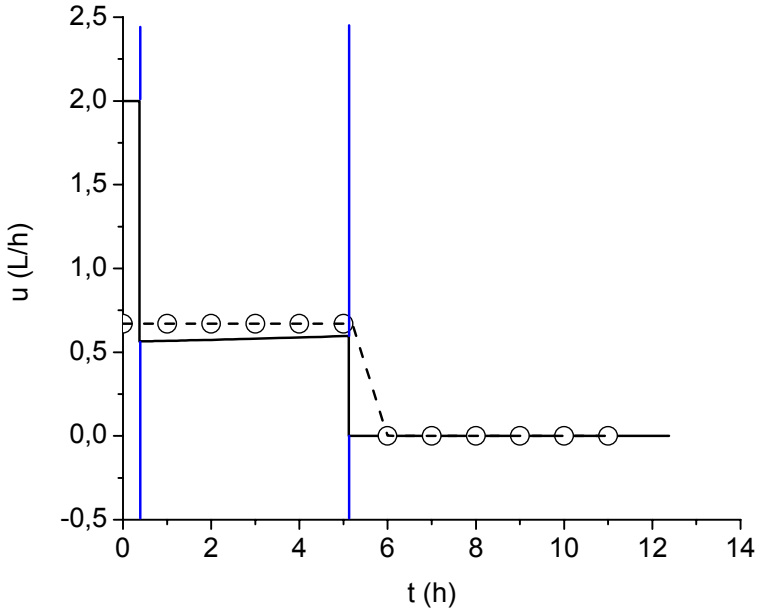


Figura 5.5 - (—) Perfil ótimo da vazão de alimentação de substrato – variável de controle. (---) e (○) Vazão de alimentação utilizada no experimento e na simulação em batelada alimentada com s_F = 285 g/L e t_e = 5 h. As linhas em azul representam os eventos t_{s1} e t_{s2}.

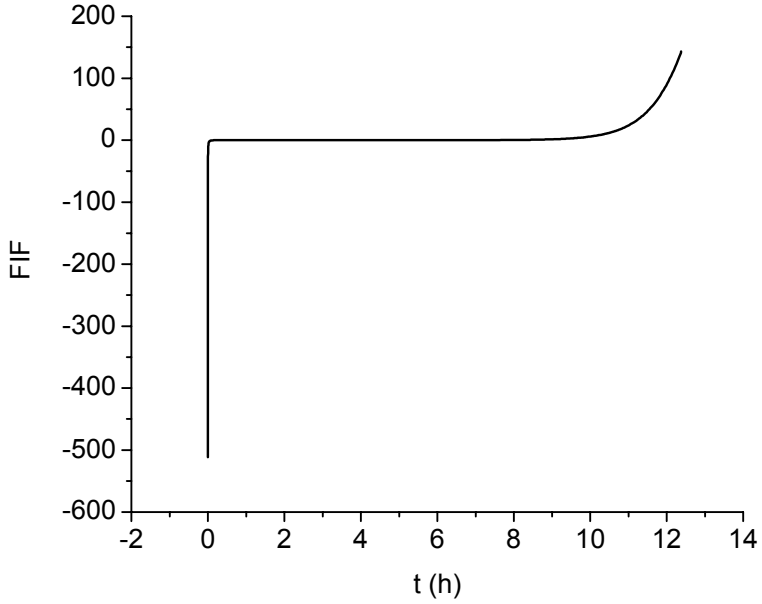


Figura 5.6 – Função Identificadora de Fase.

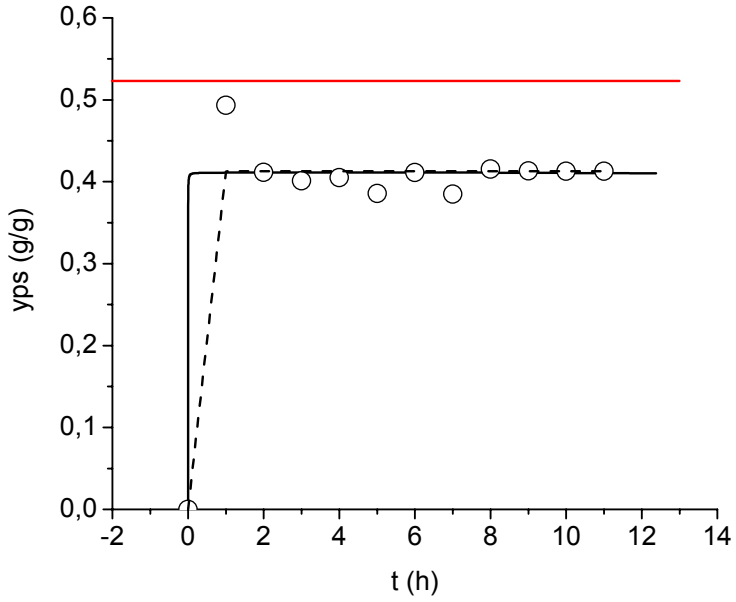


Figura 5.7 - (—) Rendimento ótimo em etanol. (---) e (○) Rendimento final em etanol obtido experimentalmente.

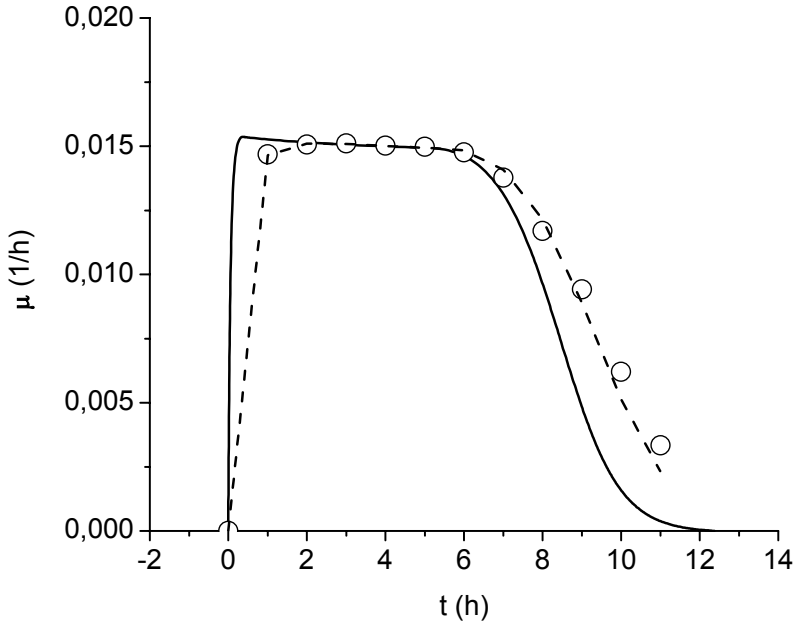


Figura 5.8 - (—) Taxa ótima de crescimento celular específica. (---) Taxa de crescimento celular específica a partir do modelo estimado. (○) Taxa de crescimento celular específica obtida pelos dados experimentais.

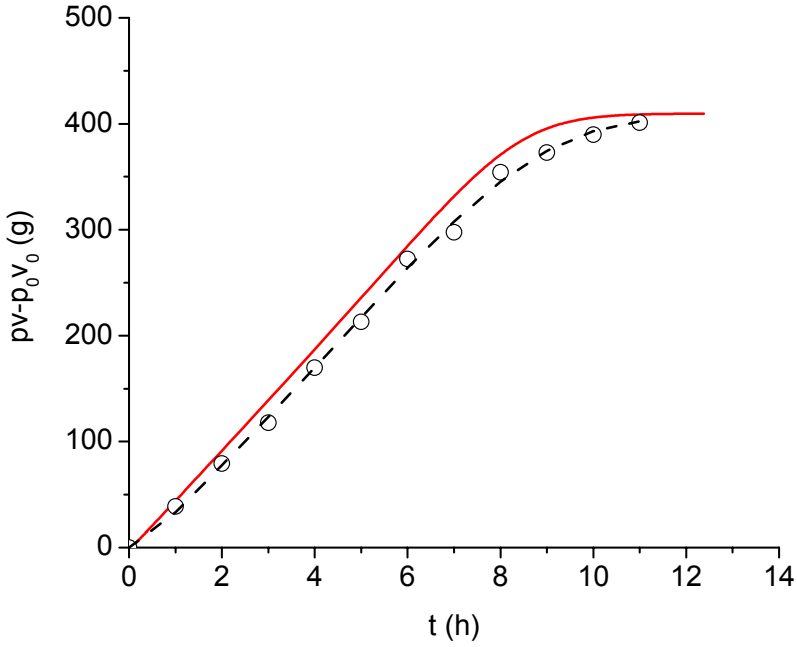


Figura 5.9 – (—) Perfil da produção de etanol (Função Objetivo) alcançada pela otimização. (---) Produção de etanol obtida pelo modelo estimado. (○) Produção de etanol obtida dos dados experimentais.

Os resultados obtidos pela estratégia ótima da variável de controle foram muito bons, visto que a produção de etanol aumentou ao longo do processo fermentativo. Estes resultados não foram comparados com os da literatura pelo fato de não haver tantos trabalhos que estudam a otimização de processos fermentativos em condições reais de operação, como as utilizadas neste estudo. Hong (1986), por exemplo, obteve um rendimento em produto igual a 0,73 g/g, superior ao rendimento teórico da formação de etanol a partir de glicose por *S. cerevisae* que é igual a 0,51g/g. Isto ocorreu porque não foi considerada a restrição no rendimento. Chen e Hwang (1990), Fu e Barford (1993), Xiong e Zhang (2004) e Santos *et al.* (2005) também utilizaram as mesmas condições de operação do trabalho citado anteriormente. Mesmo considerando restrições na produtividade específica (Fu e Barford, 1993) e no rendimento (Santos *et al.* 2005) para estar de acordo com a estequiometria da reação, todos estes trabalhos apresentaram um tempo de fermentação excessivo. Na Tab. 5.6 são exibidos os resultados obtidos nos respectivos trabalhos, com tempos fixos ou livres.

Tabela 5.6 – Comparação entre soluções ótimas obtidas com e sem restrição na produtividade

Referência	Tempo (h)	x (g/L)	p (g/L)	pv (g)
Hong (1986)	59,05	14,8	105,00	21000,0
Chen e Hwang (1990)	50,00*	15,0	99,98	19996,2
Fu e Barford (1993)	50,67	15,0	75,68	15132,0
Xiong e Zhang (2004)	63,00*	----	101,7767	20355,0
Santos *et al.* (2005)	54,71	----	76,14	15229,0

* Tempo fixo

5.4 Conclusões

A Função Identificadora de Fases foi determinada para o Problema de Otimização Dinâmica da fermentação em batelada alimentada para maximizar a produção de etanol com a ativação/desativação de restrições na variável de controle, no volume do fermentador, e na concentração residual de substrato, considerando operação com tempo final livre e que apresentou arcos singulares. A estratégia de controle foi definida em 3 fases (1 com controle singular e 2 com controle *bang-bang*) baseada na literatura e no valor da FIF. O índice diferencial flutuou entre 1 e 3 ao longo destas fases e o PCO foi resolvido por fase como um sistema de EDOs de valor inicial.

O modelo estimado a partir de todos os experimentos em batelada alimentada com tempo de enchimento de 5 horas foi utilizado para o PCO do processo específico com concentração de substrato na alimentação igual a 285 g/L pelo fato de ter fornecido uma

produção maior de etanol nas fermentações realizadas e estar próximo das condições industriais.

O perfil de vazão de alimentação ótimo, considerando o modelo cinético proposto, foi mais adequado que os outros dois perfis, o experimental e o simulado. O perfil ótimo forneceu a maior produção de etanol em todo o tempo do processo fermentativo, mesmo obtendo um tempo de fermentação maior, devido ao critério de parada que foi a concentração residual de substrato igual a 10^{-7} g/L, muito menor que a experimental e simulada. Por outro lado, o resultado final não dependeu do critério de parada usado: a concentração residual de substrato ou a derivada do produto com relação ao tempo iguais a zero.

No processo otimizado o consumo de substrato foi maior e mais utilizado para produção de etanol que para o crescimento celular se comparado ao experimento e à simulação.

A metodologia desenvolvida apresentou bons resultados considerando os da literatura, pois a otimização apresentada neste trabalho foi aplicada em um processo com condições próximas das operadas industrialmente.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÃO GERAL E SUGESTÕES

O processo de fermentação alcoólica em batelada alimentada utilizando a levedura *S. cerevisiae* foi estudado com o objetivo de otimizá-lo ao final deste trabalho.

Pela análise dos resultados dos experimentos em batelada alimentada observou-se que as fermentações realizadas considerando o tempo de enchimento igual a 5 horas, foram as que forneceram os maiores rendimentos em etanol ao longo do tempo de fermentação. Sendo que a fermentação com concentração de sacarose na alimentação igual a 285 g/L forneceu a maior produção em etanol (11,8%, v/v). Observou-se também, a influência dos tempos de enchimento sobre os rendimentos em etanol, dependendo da concentração de substrato no meio alimentado.

As fermentações em batelada alimentada com tempos de enchimento iguais a 5 horas, foram então utilizadas na estimativa dos parâmetros do modelo não estruturado, que considera a inibição pelo substrato e pelo produto. Os valores dos parâmetros obtidos tiveram significados físicos, sendo que o valor de k_i elevado indica pouca inibição pelo substrato e o baixo valor de n indica pouca inibição pelo produto. O modelo cinético obtido com os experimentos em batelada não representou os experimentos em batelada alimentada. Os parâmetros que mais influenciaram as concentrações de células, de sacarose e de etanol foram a constante de saturação para o crescimento e a taxa específica máxima de crescimento celular. A ordem decrescente de influência dos parâmetros nos modelos foi a seguinte: K_S, μ_{max}, M_S, n, P_{max} e K_i. A concentração de células apresentou menor sensibilidade aos parâmetros se comparada às concentrações de sacarose e de etanol. As correlações obtidas entre os pares de parâmetros dos modelos para as fermentações em batelada e em batelada alimentada foram consistentes, no valor e sinal, com as suas posições nas equações dos modelos e exibiram altas correlações.

Entretanto, se for considerado que qualquer aproximação é arbitrária, e que o modelo cinético obtido a partir do conjunto de experimentos em batelada alimentada representou satisfatoriamente os resultados da fermentação em batelada alimentada com concentração de sacarose no meio alimentado igual a 285 g/L e tempo de enchimento igual a 5 horas, este modelo foi utilizado na otimização dinâmica da fermentação.

A estratégia de controle simulada, definida em 3 fases (vazão máxima – vazão singular – vazão mínima), forneceu uma maior produção de etanol, em condições de concentrações de substrato, células e etanol, temperatura e pH, próximas às utilizadas nos processos industriais.

A partir das conclusões obtidas e de observações feitas ao longo do desenvolvimento deste trabalho, são apresentadas as seguintes sugestões para trabalhos futuros:

Considerar como escalas características para a adimensionalização dos modelos, os valores iniciais das variáveis de estado, ou valores máximos destas variáveis encontrados na literatura, para que a dimensionalização dos modelos a serem aplicados em simulações de processos fermentativos não seja dependente de dados que ainda não são conhecidos, como os valores máximos das concentrações de etanol e células numa fermentação em batelada, por exemplo;

Propor e avaliar modelos cinéticos mais simplificados, que não considerem os efeitos de inibição pelo substrato e pelo produto para o ajuste dos resultados das fermentações em batelada alimentada, já que a constante de inibição pelo substrato foi elevada e a potência do termo de inibição pelo produto foi pequena, além da taxa específica de crescimento celular experimental ter sido muito baixa, e cujos parâmetros não apresentem correlações significativas;

Validar experimentalmente os resultados obtidos pela otimização dinâmica;

Determinar experimentalmente as máximas concentrações de sacarose, de células e de produto em que ocorre a completa inibição do crescimento celular, já que os dados encontrados na literatura referentes a essas medidas podem não estar de acordo com as cepas de leveduras atuais, mais resistentes às condições de estresse;

Estudar a viabilidade celular ao longo do tempo de fermentação, para considerar no modelo matemático a variação das concentrações de células viáveis e de células não viáveis;

Estudar o processo de fermentação em batelada alimentada com maiores faixas de concentração de substrato na alimentação e tempos de enchimento;

Estudar o efeito da temperatura na produção de etanol nos processos em batelada alimentada;

Otimizar e realizar o *scale-up* de fermentadores em batelada alimentada para a produção de etanol a partir de cana-de-açúcar.

APÊNDICE A

DADOS DOS EXPERIMENTOS

Apêndice A.1 - Resultados dos Experimentos em Batelada

Tabela A.1 - Resultados do experimento em Batelada com s_0 = 154 g/L.

Tempo (h)	s (g/l)	x (g/l)	p (g/l)
0	154 ± 2	24,8 ± 0,7	10,56 ± 0,01
1	148 ± 2	24,3 ± 0,7	15,06 ± 0,01
2	117,6 ± 0,3	25,1 ± 0,7	23,38 ± 0,01
3	90,5 ± 0,6	25,5 ± 0,7	34,8 ± 0,2
4	63,7 ± 0,8	27,4 ± 0,7	44,3 ± 0,2
5	39,48 ± 0,01	28,0 ± 0,7	55,2 ± 0,1
6	20,3 ± 0,2	28,8 ± 0,7	65,2 ± 0,1
7	8,7 ± 0,2	29,1 ± 0,7	71,1 ± 0,6
8	4,1 ± 0,1	29,5 ± 0,7	73,0 ± 0,2
9	0,763 ± 0,001	29,9 ± 0,7	74,4 ± 0,2

Tabela A.2 - Resultados do experimento em Batelada com s_0 = 180,1 g/L.

Tempo (h)	s (g/l)	x (g/l)	p (g/l)
0	180,1 ± 0,9	24,9 ± 0,7	9,506 ± 0,001
1	176,8 ± 0,4	24,8 ± 0,7	13,1 ± 0,3
2	148,6 ± 0,4	25,8 ± 0,7	23,1 ± 0,1
3	123 ± 3	26,6 ± 0,7	32,2 ± 0,1
4	89,46 ± 0,01	27,8 ± 0,7	41,4 ± 0,3
5	61,8 ± 1	28,9 ± 0,7	53,3 ± 0,1
6	38,4 ± 0,2	29,4 ± 0,7	58,8 ± 0,4
7	19,42 ± 0,09	29,5 ± 0,7	67,7 ± 0,2
8	8,59 ± 0,09	30,0 ± 0,7	76,7 ± 0,3
9	4,23 ± 0,06	31,2 ± 0,7	79,4 ± 0,1
10	1,57 ± 0,05	31,3 ± 0,7	80,4 ± 0,6
11	0,75 ± 0,04	30,9 ± 0,7	80,8 ± 1,0

Tabela A.3 - Resultados do experimento em Batelada com s_0 = 195,6 g/L.

Tempo (h)	s (g/l)	x (g/l)	p (g/l)
0	195,6 ± 0,1	25,3 ± 0,7	9,506 ± 0,001
1	182 ± 5	24,2 ± 0,7	15,2 ± 0,2
2	165,9 ± 0,4	24,6 ± 0,7	21,7 ± 0,3
3	150,0 ± 0,4	25,9 ± 0,7	30,8 ± 0,6
4	110 ± 2	26,3 ± 0,7	39,78 ± 0,01
5	79,5 ± 1,0	27,1 ± 0,7	51,6 ± 0,2
6	58 ± 0,9	28,3 ± 0,7	60,4 ± 0,3
7	35,7 ± 0,6	28,4 ± 0,7	67,90 ± 0,01
8	21,40 ± 0,09	28,6 ± 0,7	75,64 ± 0,01
9	11,96 ± 0,09	29,4 ± 0,7	77,5 ± 0,3
10	7,2 ± 0,1	29,3 ± 0,7	80,4 ± 0,1
11	2,80 ± 0,05	29,4 ± 0,7	82,1 ± 0,7

Apêndice A.2 - Resultados dos Experimentos em Batelada Alimentada

Tabela A.4 - Resultados do experimento em Batelada Alimentada com s_F = 218,4 ± 0,1 g/L, t_e = 3 h.

Tempo (h)	s (g/L)	x (g/L)	p (g/L)	v (L)
0	0	96,0 ± 2	37,42 ± 0,01	1,500 ± 0,003
1	66,0 ± 2	45,8 ± 0,9	34,15 ± 0,01	2,655 ± 0,006
2	82,0 ± 1	33,6 ± 0,7	37,53 ± 0,01	3,811 ± 0,006
3	77,0 ± 1	26,5 ± 0,7	38,87 ± 0,01	4,966 ± 0,006
4	49,0 ± 1	27,8 ± 0,7	51,6 ± 0,2	4,966 ± 0,006
5	23,0 ± 1	28,7 ± 0,7	61,4 ± 0,2	4,966 ± 0,006
6	7,38 ± 0,09	29,1 ± 0,7	71,4 ± 0,3	4,966 ± 0,006
7	1,74 ± 0,02	30,2 ± 0,7	73,8 ± 0,1	4,966 ± 0,006
8	0,57 ± 0,09	30,2 ± 0,7	74,3± 0,7	4,966 ± 0,006

Tabela A.5 - Resultados do experimento em Batelada Alimentada com s_F = 218,0 ± 2 g/L, t_e = 4 h.

Tempo (h)	s (g/L)	x (g/L)	p (g/L)	v (L)
0	0	84,0 ± 2	34,2 ± 0,1	1,500 ± 0,003
1	47,0 ± 2	53,0 ± 1	38,02 ± 0,01	2,371 ± 0,006
2	57,4 ± 0,6	38,2 ± 0,8	39,92 ± 0,01	3,242 ± 0,006
3	62,0 ± 2	31,3 ± 0,7	43,2 ± 0,1	4,112 ± 0,006
4	62,0 ± 2	27,4 ± 0,7	46,4 ± 0,2	4,983 ± 0,006
5	34,3 ± 0,5	27,6 ± 0,7	57,95 ± 0,01	4,983 ± 0,006
6	11,6 ± 0,4	28,1 ± 0,7	70,9 ± 0,4	4,983 ± 0,006
7	2,6 ± 0,1	29,2 ± 0,7	77,4 ± 0,2	4,983 ± 0,006

Tabela A.6 - Resultados do experimento em Batelada Alimentada com s_F = 217 ± 1 g/L, t_e = 5 h.

Tempo (h)	s (g/L)	x (g/L)	p (g/L)	v (L)
0	0	88,0 ± 2	35,17 ± 0,01	1,500 ± 0,003
1	29,0 ± 1	59,0 ± 1	42,6 ± 0,1	2,116 ± 0,006
2	34,0 ± 0,6	46,6 ± 0,9	47,8 ± 0,1	2,820 ± 0,006
3	36,0 ± 1	38,2 ± 0,8	52,6 ± 0,2	3,479 ± 0,006
4	36,0 ± 1	33,1 ± 0,7	55,0 ± 0,4	4,139 ± 0,006
5,283	35,8 ± 0,4	27,7 ± 0,7	58,89 ± 0,01	4,986 ± 0,006
6	19,85 ± 0,08	28,7 ± 0,7	68,0 ± 0,2	4,986 ± 0,006
7	5,2 ± 0,1	29,7 ± 0,7	74,7 ± 0,2	4,986 ± 0,006
8	0,894 ± 0,001	29,9 ± 0,7	77,6 ± 0,5	4,986 ± 0,006

Tabela A.7 - Resultados do experimento em Batelada Alimentada com s_F = 245,0 ± 4 g/L, t_e = 3 h.

Tempo (h)	s (g/L)	x (g/L)	p (g/L)	v (L)
0	0	84,0 ± 1	37,2 ± 0,3	1,500 ± 0,003
1	79,0 ± 1	46,5 ± 0,9	33,8 ± 0,2	2,610 ± 0,006
2	101,0 ± 2	33,5 ± 0,7	36,30 ± 0,01	3,719 ± 0,006
3,15	106,0 ± 3	25,5 ± 0,7	37,84 ± 0,01	4,995 ± 0,006
4	76,0 ± 3	26,6 ± 0,7	48,0 ± 0,1	4,995 ± 0,006
5	48,2 ± 0,7	27,7 ± 0,7	60,2 ± 0,2	4,995 ± 0,006
6	26,0 ± 0,3	27,9 ± 0,7	67,2 ± 0,3	4,995 ± 0,006
7	10,31 ± 0,01	27,9 ± 0,7	75,77 ± 0,01	4,995 ± 0,006
8	3,79 ± 0,09	28,6 ± 0,7	80,8 ± 0,3	4,995 ± 0,006
9	1,37 ± 0,03	28,3 ± 0,7	81,8 ± 0,3	4,995 ± 0,006

Tabela A.8 - Resultados do experimento em Batelada Alimentada com s_F = 245,0 ± 3 g/L, t_e = 4 h.

Tempo (h)	s (g/L)	x (g/L)	p (g/L)	v (L)
0	0	84,0 ± 1	36,7 ± 0,1	1,500 ± 0,003
1	57,81 ± 0,01	51,7 ± 0,9	38,2 ± 0,2	2,372 ± 0,006
2	74,1 ± 0,8	39,8 ± 0,8	40,8 ± 0,1	3,244 ± 0,006
3	76,0 ± 2	31,0 ± 0,7	43,93 ± 0,01	4,116 ± 0,006
4	81,0 ± 1	26,7 ± 0,7	48,6 ± 0,2	4,988 ± 0,006
5	54,6 ± 0,9	27,3 ± 0,7	56,8 ± 0,2	4,988 ± 0,006
6	31,4 ± 0,2	27,7 ± 0,7	70,0 ± 0,2	4,988 ± 0,006
7,233	12,1 ± 0,3	28,8 ± 0,7	76,5 ± 0,2	4,988 ± 0,006
8	4,3 ± 0,3	28,6 ± 0,7	82,9 ± 0,1	4,988 ± 0,006
9	1,8 ± 0,2	29,4 ± 0,7	84,0 ± 0,1	4,988 ± 0,006

Tabela A.9 - Resultados do experimento em Batelada Alimentada com s_F = 241,4 ± 0,1 g/L, t_e = 5 h.

Tempo (h)	s (g/L)	x (g/L)	p (g/L)	v (L)
0	0	83,0 ± 1	36,71 ± 0,01	1,500 ± 0,003
1	40,0 ± 1	56,0 ± 1	41,8 ± 0,3	2,168 ± 0,006
2	53,0 ± 3	44,1 ± 0,9	47,8 ± 0,3	2,837 ± 0,006
3	58,11 ± 0,01	36,3 ± 0,8	49,6 ± 0,1	3,505 ± 0,006
4	56,0 ± 2	31,0 ± 0,7	51,7 ± 0,3	4,174 ± 0,006
5,217	64,1 ± 0,8	26,5 ± 0,7	55,3 ± 0,3	4,987 ± 0,006
6	40,0 ± 1	26,8 ± 0,7	60,4 ± 0,2	4,987 ± 0,006
7	21,2 ± 0,7	27,4 ± 0,7	69,94 ± 0,01	4,987 ± 0,006
8	8,0 ± 0,4	27,5 ± 0,7	78,2 ± 0,1	4,987 ± 0,006
9	2,8 ± 0,2	28,3 ± 0,7	80,4 ± 0,1	4,987 ± 0,006
10	0,899 ± 0,001	28,4 ± 0,7	81,2 ± 0,3	4,987 ± 0,006

Tabela A.10 - Resultados do experimento em Batelada Alimentada com s_F = 277,0 ± 3 g/L, t_e = 3 h.

Tempo (h)	s (g/L)	x (g/L)	p (g/L)	v (L)
0	0	86,0 ± 1	36,39 ± 0,01	1,500 ± 0,003
1	97,0 ± 1	47,3 ± 0,9	33,1 ± 0,2	2,666 ± 0,006
2	117,0 ± 2	33,8 ± 0,8	35,4 ± 0,1	3,832 ± 0,006
3	127,0 ± 4	26,0 ± 0,7	37,8 ± 0,2	4,998 ± 0,006
4	101,0 ± 4	26,8 ± 0,7	46,9 ± 0,3	4,998 ± 0,006
5	72,0 ± 4	28,3 ± 0,7	58,1 ± 0,5	4,998 ± 0,006
6	46,0 ± 2	28,7 ± 0,7	61,31 ± 0,01	4,998 ± 0,006
7	28,0 ± 1	28,6 ± 0,7	75,8 ± 0,1	4,998 ± 0,006
8	15,7 ± 0,2	29,0 ± 0,7	81,0 ± 0,6	4,998 ± 0,006
9	7,6 ± 0,4	30,0 ± 0,7	87,0 ± 0,1	4,998 ± 0,006
10	4,8 ± 0,2	29,1 ± 0,7	88,2 ± 0,3	4,998 ± 0,006
11	2,4 ± 0,2	29,4 ± 0,7	89,2 ± 0,4	4,998 ± 0,006

Tabela A.11 - Resultados do experimento em Batelada Alimentada com s_F = 285,0 ± 4 g/L, t_e = 4 h.

Tempo (h)	s (g/L)	x (g/L)	p (g/L)	v (L)
0	0	85,0 ± 1	35,81 ± 0,01	1,500 ± 0,003
1	76,0 ± 2	51,6 ± 0,9	38,67 ± 0,01	2,372 ± 0,006
2	98,0 ± 3	38,2 ± 0,8	39,6 ± 0,3	3,244 ± 0,006
3	109,0 ± 1	31,0 ± 0,7	44,0 ± 0,3	4,116 ± 0,006
4	108,0 ± 0,8	25,7 ± 0,7	46,7 ± 0,3	4,988 ± 0,006
5	84,0 ± 2	26,8 ± 0,7	52,1 ± 0,5	4,988 ± 0,006
6	60,0 ± 1	27,5 ± 0,7	62,06 ± 0,01	4,988 ± 0,006
7	42,0 ± 3	28,1 ± 0,7	68,8 ± 0,2	4,988 ± 0,006
8	24,7 ± 0,8	28,1 ± 0,7	77,5 ± 0,8	4,988 ± 0,006
9	16,6 ± 0,3	27,9 ± 0,7	82,49 ± 0,01	4,988 ± 0,006
10	7,7 ± 0,3	28,5 ± 0,7	88,1 ± 0,1	4,988 ± 0,006
11	5,1 ± 0,2	28,7 ± 0,7	89,20 ± 0,01	4,988 ± 0,006

Tabela A.12 - Resultados do experimento em Batelada Alimentada com s_F = 285,0 ± 4 g/L, t_e = 5 h.

Tempo (h)	s (g/L)	x (g/L)	p (g/L)	v (L)
0	0	83,0 ± 1	36,78 ± 0,01	1,500 ± 0,003
1	51,8 ± 0,7	54,0 ± 1	43,3 ± 0,1	2,170 ± 0,006
2	66,7 ± 0,6	44,0 ± 0,8	47,3 ± 0,3	2,840 ± 0,006
3	80,0 ± 1	36,6 ± 0,8	49,3 ± 0,1	3,510 ± 0,006
4	82,0 ± 2	30,6 ± 0,7	53,8 ± 0,2	4,181 ± 0,006
5,2	88,0 ± 3	26,3 ± 0,7	53,82 ± 0,01	4,985 ± 0,006
6	66,0 ± 3	26,8 ± 0,7	65,70 ± 0,01	4,985 ± 0,006
7	44,0 ± 3	27,0 ± 0,7	70,77 ± 0,01	4,985 ± 0,006
8	28,3 ± 0,8	27,1 ± 0,7	82,1 ± 0,6	4,985 ± 0,006
9	18,4 ± 0,5	27,7 ± 0,7	85,8 ± 0,1	4,985 ± 0,006
10	9,8 ± 0,6	27,8 ± 0,7	89,3 ± 0,2	4,985 ± 0,006
11	4,57 ± 0,04	28,1 ± 0,7	91,5 ± 0,4	4,985 ± 0,006

APÊNDICE B

CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Apêndice B.1 – Curvas de Calibração para a Determinação da Concentração de Sacarose.

A concentração de sacarose foi calculada da seguinte forma, considerando a Fig. B.1:

$$s\ (g/L) = 3{,}0905 * Abs * 1{,}9 * diluição$$

em que *Abs* é a média das absorbâncias lidas para cada ponto experimental, e 1,9 é o fator estequiométrico.

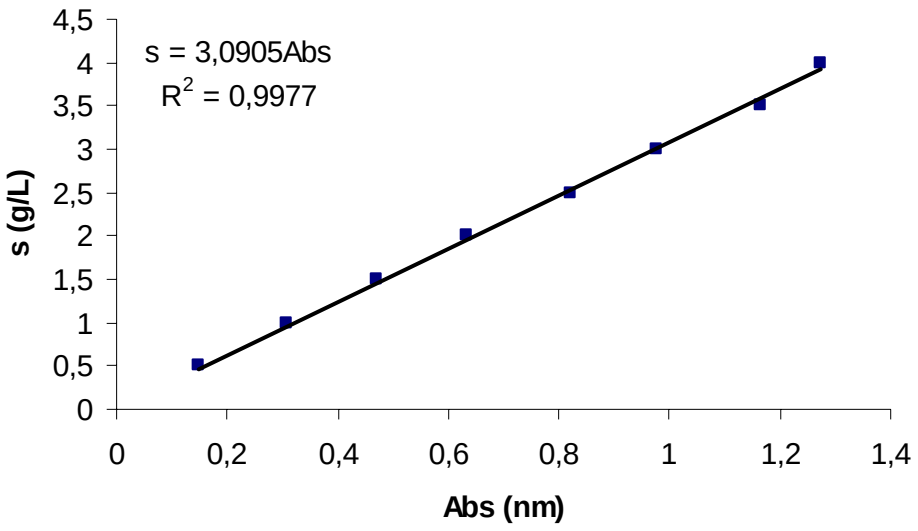


Figura B.1 – Curva de calibração utilizada nos experimentos em batelada com s_0 = 154 g/L, e batelada alimentada com s_F = 218 g/L e t_e = 3h.

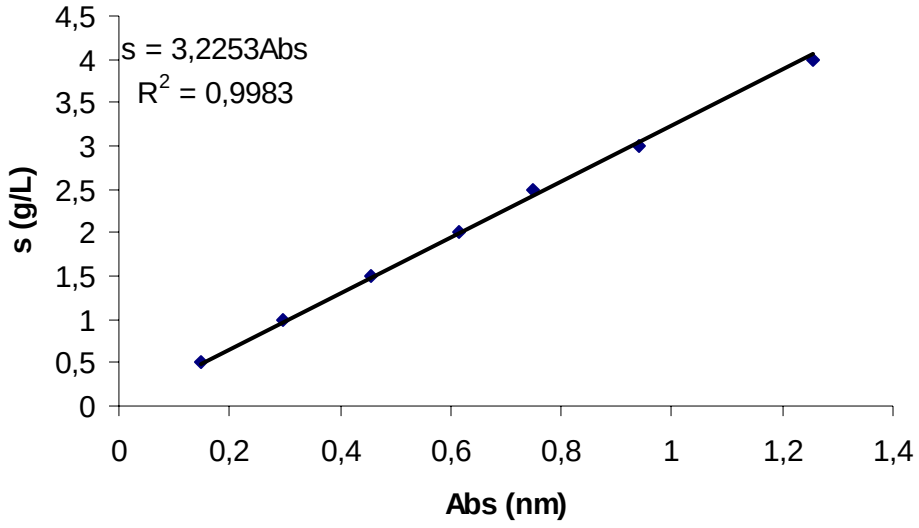


Figura B.2 – Curva de calibração utilizada no experimento em batelada com s_0 = 180,1 g/L.

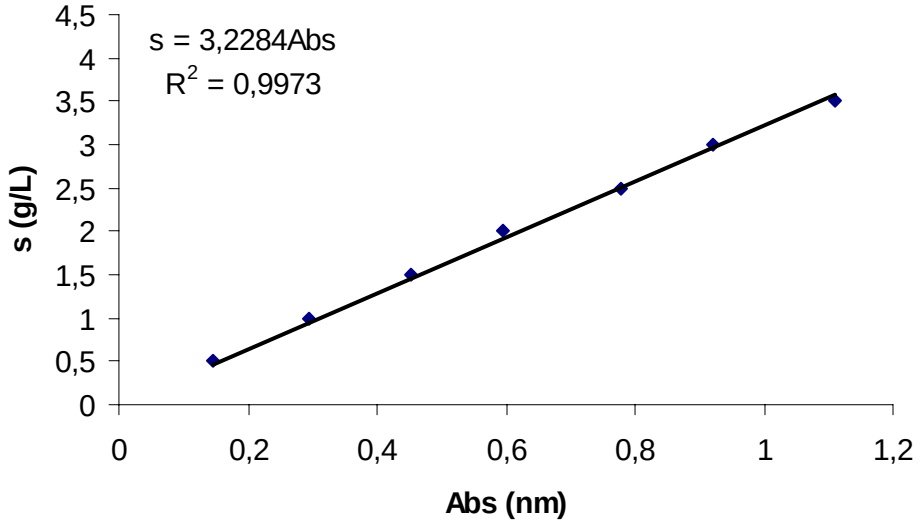


Figura B.3 – Curva de calibração utilizada no experimento em batelada com s_0 = 195,6 g/L.

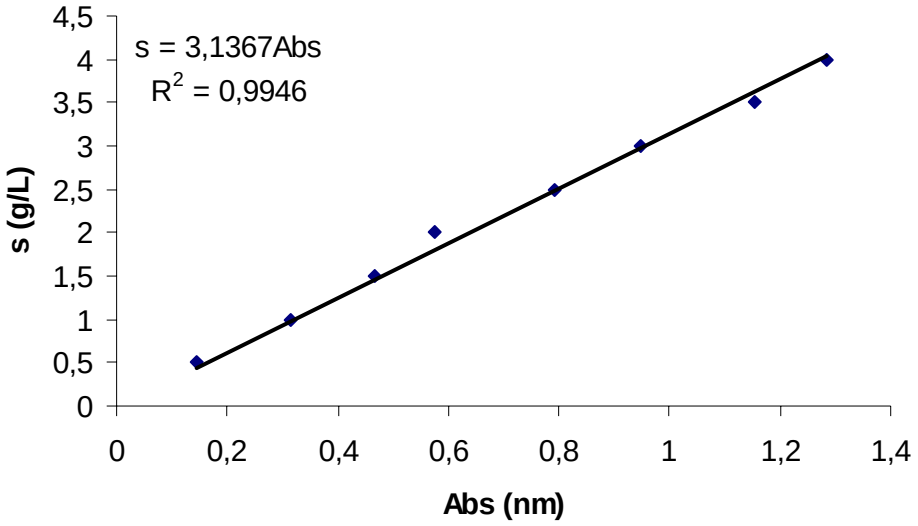


Figura B.4 – Curva de calibração utilizada nos experimentos em batelada alimentada com s_F = 218 g/L e t_e = 4 e 5 h; s_F = 245 g/L e t_e = 3 h.

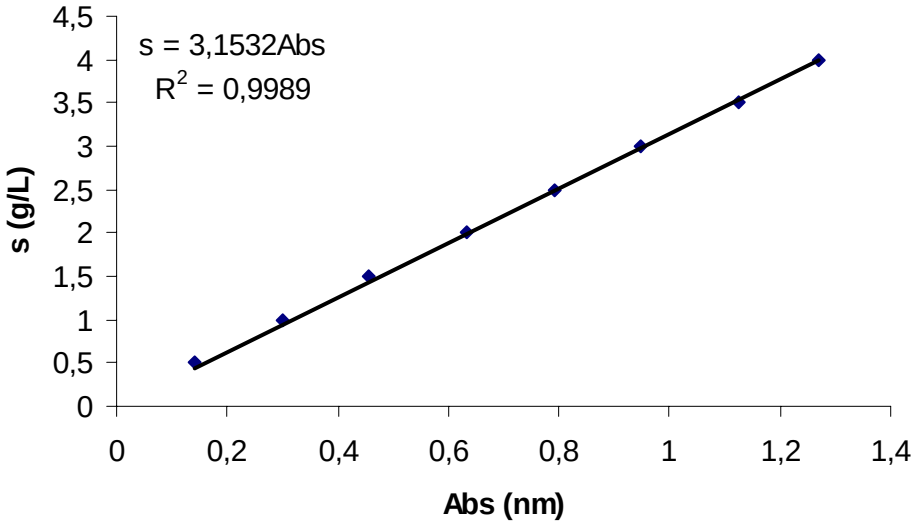


Figura B.5 – Curva de calibração utilizada nos experimentos em batelada alimentada com s_F = 245 g/L e t_e = 4 e 5 h; s_F = 285 g/L e t_e = 3 h.

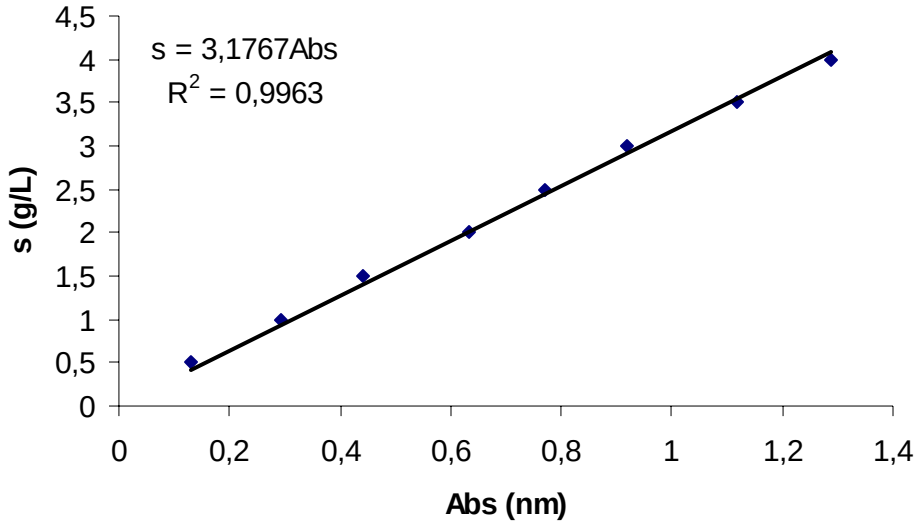


Figura B.6 – Curva de calibração utilizada no experimento em batelada alimentada com s_F = 285 g/L e t_e = 4 e 5 h.

Apêndice B.2 – Curvas de Calibração para a Determinação da Concentração de Etanol.

A concentração de etanol foi calculada da seguinte forma, considerando a Fig. B.7:

$$p\ (g/L) = 13{,}367 * Abs * densidade * diluição$$

em que *Abs* é a média das absorbâncias lidas para cada ponto experimental.

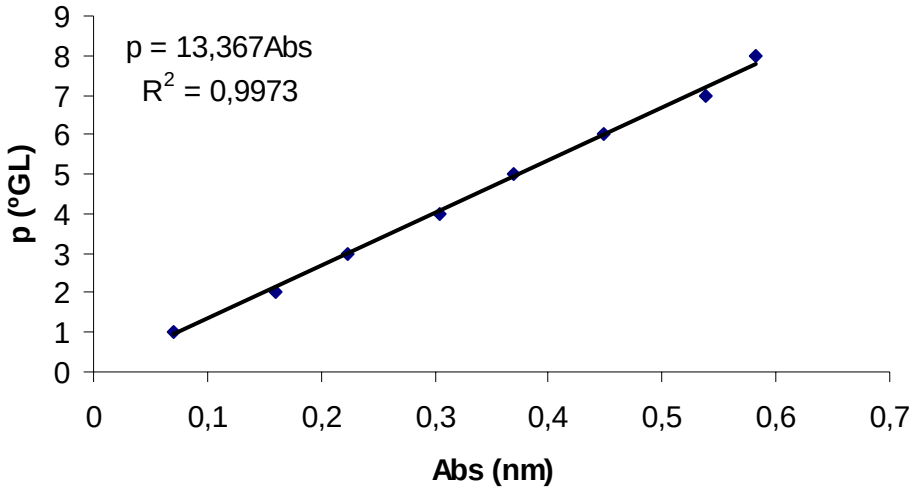


Figura B.7 – Curva de calibração utilizada em todos os experimentos em batelada e nos experimentos em batelada alimentada com s_F = 218 g/L e t_e = 3, 4 e 5 h; s_F = 245 g/L e t_e = 3h.

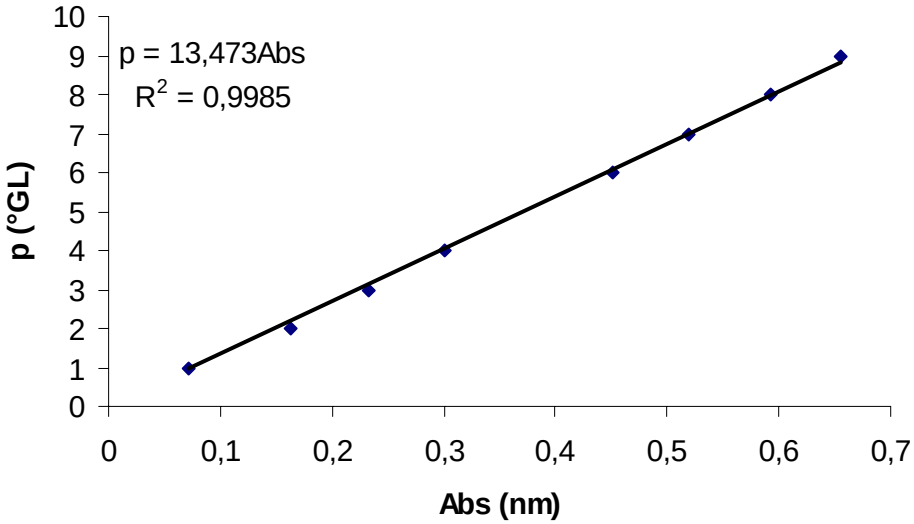


Figura B.8 – Curva de calibração utilizada nos experimentos em batelada alimentada com s_F = 245 g/L e t_e = 4 e 5 h; s_F = 285 g/L e t_e = 3, 4 e 5h.

ANEXO

MÉTODO DE ESTIMAÇÃO DOS PARÂMETROS DO MODELO CINÉTICO: EVOLUÇÃO DIFERENCIAL

O procedimento geral do método de Evolução Diferencial é dado pelas seguintes etapas (Storn & Price, 1995) (Fig. 1):

- ✓ gera-se uma população inicial ($\vec{x}_1, \vec{x}_2$ e $\vec{x}_3$) com soluções factíveis para o problema em questão, onde garante-se por "*regras de reparo*" que os valores atribuídos às variáveis estão dentro das fronteiras delimitadas pelo projetista;
- ✓ seleciona-se um indivíduo ($\vec{x}_3$), de forma aleatória, para ser substituído. Três diferentes indivíduos são selecionados como genitores ($\vec{x}_1, \vec{x}_2$ e $\vec{x}_3$), sendo que um destes é selecionado como genitor principal ($\vec{x}_3$);
- ✓ modifica-se cada variável do genitor principal com alguma probabilidade;
- ✓ adiciona-se ao valor atual da variável (genitor principal) a diferença entre duas outras variáveis (genitores secundários) ponderada por uma taxa de perturbação *TP* ($TP\vec{x}_4 = TP(\vec{x}_1 - \vec{x}_2)$). Este procedimento representa o operador de cruzamento na Evolução Diferencial;
- ✓ se o vetor resultante ($\vec{x}_5 = \vec{x}_3 + TP\vec{x}_4$) apresenta uma função de aptidão melhor que o escolhido, ele o substitui; caso contrário, o vetor escolhido para ser eventualmente substituído é mantido na população.

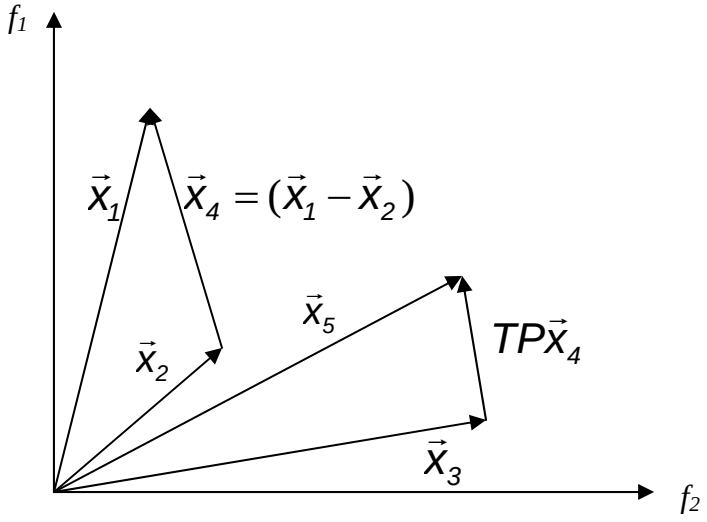


Figura 1 – Geração dos indivíduos da população representados por vetores no método de Evolução Diferencial.

Através da formulação matemática, uma solução *I* na ED, para a geração *w*, é um vetor multidimensional $x^I_{G=NP} = \left(x^I_1, x^I_2, ..., x^I_n\right)^T$. Uma população $P_{G=k}$ na geração $G = k$ é um vetor de *NP* soluções, onde *NP* > 4. A população inicial $P^I_{G=0} = \left(x^I_0, x^I_0, ..., x^I_0\right)^T$, é gerada inicialmente, com distribuição uniforme, adotando-se:

$$x^I_{G=0} = L_{inf}\left(x_i\right) + rand_i\left(L_{sup}\left(x_i\right) - L_{inf}\left(x_i\right)\right) \tag{1}$$

em que $L_{inf}\left(x_i\right)$ e $L_{sup}\left(x_i\right)$ são os limites inferior e superior de valores admissíveis para a variável x_i, respectivamente; *NP* é o tamanho da população; *N* é a dimensão da solução e $rand_i$ gera um número aleatório, com distribuição uniforme, no intervalo entre 0 e 1. A seleção é realizada para selecionar quatro diferentes índices de solução r_1, r_2, r_3 e $j \in$ [1;*NP*]. Os valores de cada variável, na solução descendente (filha), são modificados com uma mesma probabilidade de cruzamento, *CR*, para $\forall i \in N$:

$$x^I_{G=k} = \begin{cases} x^{r_3}_{i,G=k-1} + TP\left(x^{r_1}_{i,G=k-1} - x^{r_2}_{i,G=k-1}\right) & se\ \ rand_i \le CR \\ x^{r_j}_{i,G=k-1} \end{cases} \tag{2}$$

sendo *TP* $\in$ (0; 2) é uma taxa de "*perturbação*" a ser adicionada a uma solução escolhida aleatoriamente denominada genitor (ancestral) principal. A nova solução substitui a solução

anterior (antiga) caso seja melhor, e pelo menos uma das variáveis é modificada, esta solução é representada na evolução diferencial pela seleção aleatória de uma variável [1*;N*].

O algoritmo implementado por Storn e Price (Storn e Price, 1995) possibilita ao usuário a escolha do tipo de estratégia de cruzamento que será utilizada durante a sua execução. A Tab. 1 mostra as possíveis estratégias que podem ser adotadas.

Tabela 1 - Estratégias de cruzamento propostas por Storn e Price (1995).

1 - DE/best/1/exp	6 - DE/best/1/bin
2 - DE/rand/1/exp	7 - DE/rand/1/bin
3 - DE/rand-to-best/1/exp	8 - DE/rand-to-best/1/bin
4 - DE/best/2/exp	9 - DE/best/2/bin
5 - DE/rand/2/exp	10 - DE/rand/2/bin

A convenção geral usada é DE/x/y/z. DE representa o método, Evolução Diferencial (*Differential Evolution*), x é o vetor que será perturbado, y é o número de vetores que são utilizados para a perturbação de x, e z representa o tipo de cruzamento que será utilizado (exp=exponencial; bin=binomial).

A escolha dos valores dos parâmetros *NP*, *TP*, *CR* não é uma tarefa trivial e depende de cada problema. Normalmente, *NP* é em torno de 5 a 10 vezes o número de variáveis do problema. *TP* é tomado como sendo um valor entre 0,4 a 2,0. Uma boa escolha para *CR* é 0,1, mas em geral, *CR* pode ser tão grande quanto possível (Storn e Price, 1995).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUTBOUL, H., KERZNER, A. L., SCHMIDELL, W. (1988). Modelo matemático para fermentação alcoólica – Análise de parâmetros. Revista Brasileira de Engenharia Química, Brasil, v. 11, nº 1, p. 35-42.

AIBA, S., SHODA, M., NAGATANI, M. (1968). Kinetics of Product Inhibition in Alcohol Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 10, 845-864.

AIBA, S. e SHODA, M. (1969). Reassessment of the Product Inhibition in Alcohol Fermentation. *Journal of Fermentation Technology*, 47, nº12, 790-794.

ALFENORE, S., CAMELEYRE, X., BENBADIS, L., BIDEAUX, C., URIBELERREA, J.L., GOMA, G., MOLINA-JOUVE, C., GUILLOUET, S.E. (2004). Aeration strategy: a need for very high ethanol performance. *Appl Microbiol Biotechnol*., 63, 537–542.

AMORIM, H. V. (2005). Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia. Piracicaba - SP, Fermentec, 448p.

ANDRIETTA, S. R. (1994). Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua em escala Industrial. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 178p.

ANDRIETTA, S. R., FERREIRA, E., ANDRIETTA, M. G. (2003). Avaliação da Influência da Velocidade de Alimentação sobre o Rendimento e Produtividade dos Processos de Produção de etanol Operando em Batelada Alimentada. *Anais do Sinaferm 2003*. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 7 p.

ARRUDA, E.B. (2008). Comparação do Desempenho do Secador Roto-Fluidizado com o Secador Rotatório Convencional: Secagem de Fertilizantes. Uberlândia, 176p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia.

ASCHER, U., SPITERI, R. (1994). Collocation software for boundary-value differential-algebric equations. *SIAM J. Scient. Comput*., 15, 938-952.

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

AUGUSTO, E. F. P., BONOMI, A., GIUDICI, R. (1994).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.

BABU, B. V., CHAKOLE, P. G., MUBEEN, J. H. S. (2005). Multi-objective Differential Evolution (MODE) for Optimization of Adiabatic Styrene Reactor. *Chemical Engineering Science*, 60, 4822-4837.

BAI, F.W., ANDERSON, W.A., MOO-YOUNG, M. (2008). Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, 26, 89–105.

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

BALTES, M., SCHNEIDER, R., STURM, C., REUSS, M. (1994). Optimal Experimental Design for Parameter Estimation in Unstructured Growth Models. *Biotechnology Progress*, 10, 480-488.

BARBA, D., BEOLGHINI, F., DEL RE, G., DI GIACOMO, G., VEGLIO, F. (2001). Kinetic analysis of *Kluyeromyces lactis* fermentation on whey: batch and fed-batch operations. *Process Biochemistry*, 36, 531–536.

BARD, Y. (1974). Nonlinear Parameter Estimation, Dynamic Models. *Academic Press*, New York, Chapter 8, 219-233.

BESLI, N., TURKER, M., GUL, E. (1995). Design and simulation of a fuzzy controller for fed-batch yeast fermentation. *Bioprocess Engineering*, 13, 141-148.

BIEGLER, L. T. (1984). Solution of dynamic optimization problems by sucessive quadratic programming and orthogonal collocation. *Computers and Chemical Engineering*, 8, 243-248.

BIRCH, R. M., WALKER, G. M. (2000). Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 678-687.

BISCAIA Jr., E. C. (2007). Apostila do mini-curso de Métodos de Otimização ministrado na XIII Jorneq e II Sepeq – Faculdade de Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia.

BORZANI, W. (2003). Calculation of fermentation parameters from the results of a batch test taking account of the volume of biomass in the fermenting medium. *Biotechnology Letters*, 25, 1953–1956.

BRYSON, A. E., HO, Y. C. (1975). Applied Optimal Control. S.I.: Hemisphere Publishing Washington.

CABRINI, M. F., MARJOTTA-MAISTRO, M. C. (2007). Mercado internacional de álcool: os recentes programas de uso do produto como combustível. Revista Agroanalysis, São Paulo, p. 36, fev. 2007.

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

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

CASTRO, R. E. (2001). Otimização de Estruturas com Multi-objetivos Via Algoritmos Genéticos. Rio de Janeiro, 206p. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

CHALHOUB, E. S., CAMPOS VELHO, H. F., SILVA-NETO, A. J. (2007). A Comparison of the One-dimensional Radiative Transfer Problem Solutions obtained with the Monte Carlo Method and Three Variations of the Discrete Ordinates Method, Proceedings of 19o International Congress of Mechanical Engineering, ABCM, Brasília, Brazil.

CHEMBURKAR, R. M., MORBIDELLI, M., VARMA, A. (1986). Parametric sensitivity of a CSTR. *Chemical Engineering Science,* 41, 1647-1654.

CHEN, C., HWANG, C. (1990). Optimal On-Off Control for Fed-Batch Fermentation Processes. *Ind. Eng. Chem. Res*., 29, 1869-1875.

CHIOU, J., WANG, F. (1999). Hybrid method of evolutionary algorithms for static and dynamic optimization problems with application to a fed-batch fermentation process. *Computers and Chemical Engineering*, 23, 1277–1291.

CHUDEJ, K., GÜNTHER, M. (1999). Global state space approach for the efficient numerical solution of state-constrained trajectory optimization problems. *Journal of Optimization*, *Theory and Applications*, 103, 75-93.

COELHO, L. S. (2003). Fundamentos, Potencialidades e Aplicações de Algoritmos Evolutivos, Notas em Matemática Aplicada, VoL 2, SBMAC, 94 pp., São Carlos - SP.

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

COSTA, A.C., ALVES, T.L M., HENRIQUES, A.W.S., MACIEL FILHO, R., LIMA, E.L. (1998). An adaptive optimal control scheme based on hybrid neural modeling, *Computers them. Engng*, 22, Suppl., S859-S862.

CUTHREL, J., BIEGLER, L. T. (1989). Simultaneous optimization and solution methods for batch reactor control profiles. *Computers Chem. Engng.*, 13, 49-62.

DEB, K. (2001). Multi-Objective Optimization Using Evolutionary Algorithms. New York, NY, USA, John Wiley & Sons, Inc., 518p.

DOURADO, A., GOMA, G., ALBUQUERQUE, U., SEVELY, Y. (1987). Modeling and Statistic Optimization of the Ethanol Production in a Cascate Reactor I.Modeling. *Biotechnology and Bioengineering*, 29, n.2, 187-194.

DRAKUNOV, S. V., LAW, V. J. (2007). Parameter Estimation Using Sliding Mode Observers: Application to the Monod Kinetic Model. *Chemical Product and Process Modeling*, 2, Iss. 3, Art. 21, 1-27.

DUTTA, S., CHOWDHURY, R., BHATTACHARYA, P. (2001). Parametric sensitivity in bioreactor: an analysis with reference to phenol degradation system. *Chemical Engineering Science,* 56, 5103-5110.

EDGAR, T. F., HIMMELBLAU, D. M., LASDON, L. S. (2001). Optimization of Chemical Process, Second Edition, McGraw-Hill Chemical Engineering Series, 651pp.

FACCIOTTI, M. C. R. (2001). Fermentação Contínua. In: Schmidell et al. (Coord.). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher, 223-246. (Biotecnologia Industrial; v.2)

FEEHERY, W. F. (1998). Dynamic optimization with path constraints. Tese (Doutorado) – Massachusetts Institute of Technology.

FERREIRA, A. A. (1998). Simulação da Fermentação Alcoólica de Meios à Base de Glicose por *Saccharomyces cerevisiae*. Uberlândia, 98p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia.

FERREIRA, A. A., RIBEIRO, E. J., MURATA, V. V. (1998). Simulação da fermentação alcoólica de meios a base de glicose por *Sacharomyces cerevisiae*. (1998). In: XII Simpósio Nacional de Fermentações, 1998, Uberlândia/MG. *Anais do XII Simpósio Nacional de Fermentações*.

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

FRANCO-LARA, E., WEUSTER-BOTZ, D. (2005). Estimation of optimal feeding strategies for fed-batch bioprocesses, *Bioprocess Biosyst Eng*, 27, 255–262.

FU, P.C., BARFORD, J.P. (1993). Nonsingular optimal control for fed-batch fermentation processes with a differential-algebraic system model. *J. Proc. Control*, 3, nº4, 211-218.

FURTADO, T. A., SCANDIFFIO, M. G. (2006). Álcool no Brasil - Uma longa história. *Scientific American Brasil*, 66-71, Outubro, 2006.

GARAY-ARROYO, COVARRUBIAS, A. A., CLARK, I., NI_, I., GOSSET, G., MARTINEZ, A. (2004). Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 63, 734–741.

GHOSE, T.K., THYAGI, R.D. (1979). Rapid Ethanol Fermentation of Cellulose Hydrolysate. II Product and Substrate Inhibition and Optimization of Fermentor Design. *Biotechnology and Bioengineering*, 21, 1401-1420.

GÒDIA, F., CASAS, C., SOLÀ C. (1988). Batch Alcoholic Fermentation Modelling by Simultaneous Integration of Growth and Fermentation Equations. *J. Chem. Tech. Biotechnol*., 41, 155-165.

GOSWAMI, V., SRIVASTAVA, A. K. (2000). Fed-batch propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici*. *Biochemical Engineering Journal*, 4, 121-128.

GROSFILS, A., WOUWER, A. V., BOGAERTS, P. (2007). On a general model structure for macroscopic biological reaction rates. *Journal of Biotechnology*, 130, 253-264.

HAN, K., LEVENSPIEL, O. (1988). Extended Monod Kinetics for Substrate, Product, and Cell Inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*, 32, 430-437.

HONG , J. (1986). General characteristics of optimal feed rate profiles for various fed-batch fermentation process. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 1421-1431.

IMPE VAN, J.F., NICOLAY, B.M., VANROLLEGHM, P.A., SPRIET, J.A., MOOR, B.D., VANDEWALLE, J. (1994). Optimal control of the penicillin G fed-batch fermentation: an analysis of the model of Heijnen *et al.*. *Optimal Control Appl. & Methods*, 15, 13–34.

JAMAI, L., ETTAYEBI, K., EL YAMANI, J., ETTAYEBI, M. (2007). Production of ethanol from starch by free and immobilized Candida tropicallis in the presence of α-amylase. *Bioresource Technology*, 98, 2765-2770.

JORNALCANA. 2008 Será Cheio de Álcool. São Paulo, n. 168, dez. 2007. Disponível em: <http://www.jornalcana.com.br/pdf/168//proddadnot.pdf>. Acesso em: 05 janeiro 2008.

KAPADI, M. D. e GUDI, R. D. (2004). *Optimal* Control of Fed-Batch Fermentation Involving Multiple Feeds using Differential Evolution. *Process Biochemistry*, 39, 1709-1721.

KELLEY, J. H. (1965). A transformation approach to singular subarcs in optimal trajectory. *SIAM J. Control*, 2, 234-240.

KLINE, S. J., McCLINTOCK, F. A. (1953). Describing Uncertainties in Single-sample Experiments. *Mechanical Engineering*, 3-8.

KROUMOV, A. D., MÓDENES, A. N., TAIT, M. C. A. (2006). Development of new unstructured model for simultaneous saccharification and fermentation of starch to ethanol by recombinant strain. *Biochemical Engineering Journal*, 28, 243-255.

KURTANJEK, Z. (1991). Optimal Nonsingular Control of Fed-Batch Fermentation. *Biotechnol. and. Bioeng*, 37, 814-823.

LAKKANA LAOPAIBOON, L., PORNTHAP THANONKEO Æ. (2007). Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by Saccharomyces cerevisiae. *World J Microbiol Biotechnol*, 23, 1497–1501.

LAVARDA, F. C. (1997). Metodologia Básica de Tratamento de Dados Experimentais. Medição de Grandezas Físicas, Algarismos Significativos , Arredondamentos, Gráficos e Relatório Científico. Departamento de Física, Faculdade de Ciências – UNESP/Bauru. Primeiro Semestre de 1997.

LEE, J.H., PAGAN, R.J., ROGERS, P.L. (1983). Continuous simultaneous saccharification and fermentation of starch using *Zimomonas mobilis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 25, 659-669.

LEE, Y., LEE, W. G., CHANG, Y. K., CHANG, H. N. (1995). Modelling of Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* from a Glicose and Maltose Mixture. *Biotechnology Letters*, 17, nº 8, 791-796.

LEVENSPIEL, O. (1980). The Monod Equation: A Revisit and a Generalization to Product Inhibition Situations. *Biotechnology and Bioengineering*, 22, 1671-1687.

LIM, H. C.; TAYEB, Y. J.; MODAK, J. M.; BOUTE, P. (1986). Computational algorithms for optimal feed rate for a class of fed-batch fermentation: numerical results for penicillin and cell mass production. *Biotechnol. Bioeng*, 28, 1408-1420.

LIMA, L.R., MARCONDES, A.A. (2002). Álcool Carburante: Uma Estratégia Brasileira. Curitiba: Editora UFPR, 248p.

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

LIN, Y., TANAKA, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 69, 627–642.

LOBATO, F. S. (2004). Abordagem Mista para Problemas de Otimização Dinâmica. Uberlândia, 195p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia.

LOBATO, F. S., OLIVEIRA-LOPES, L. C., MURATA, V. V. (2006). OPTIMAL FEED POLICY FOR FED-BATCH FERMENTATION WITH EVENTS IDENTIFICATION BASED ON SWITCHING STRUCTURES, XXII IACChE (CIIQ) 2006 / V CAIQ AAIQ Asociación Argentina de Ingenieros Químicos IACCHE - Interamerican Confederation of Chemical Engineering.

LOBATO, F. S., STEFFEN, V. (2007). Engineering System Design with Multi-Objective Differential Evolution. 19th COBEM – International Congress of Mechanical Engineering.

LOBATO, F. S., SILVA-NETO, A. J., STEFFEN, V. (2007a). Um Estudo Comparativo usando Evolução Diferencial e Recozimento Simulado Aplicado a um Problema Inverso de Transferência Radiativa, X Encontro de Modelagem Computacional, Instituto Politécnico - UERJ, Nova Friburgo, Rio de Janeiro.

LOBATO, F. S., OLIVEIRA-LOPES, L. C., MURATA, V. V., STEFFEN Jr, V. (2007b). *Solution of Multi-objective Optimal Control Problems with Fluctuation Index using Differential Evolution,* 6º Brazilian Conference on Dynamics, Control and Their Applications, UNESP – Campus de São José do Rio Preto – São Paulo, May 21-25.

LOGSDON, J.S., BIEGLER, L.T. (1989). Accurate Solution of Differential Algebraic Optimization Problems. *Ind. Eng. Chem. Res*., 28, 1628-1639.

LUONG, J. H. T. (1985). Kinetics of Ethanol inhibition in Alcohol Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 280-285.

LUONG, J. H. T. (1987). Generalization of Monod Kinetics for Analysis of Growth Data with Substrate Inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*, 29, 242-248.

LYNN, L. L., PARKIN, E. S., ZAHRADNIK, R. L. (1970). Near-optimal control by trajectory approximation. *I&EC Fundamentals*, 9, n. 1, 58-63.

LYNN, L. L., ZAHRADNIK, R. L. (1987). The use of orthogonal polynomials in the near-optimal control of distributed systems by trajectory approximation. *Int. J. Control*, 12, n. 6, 1079-1087.

MALY, T., PETZOLD, L. R. (1996). Numerical methods and software for sensitivity analysis of differential-algebraic systems. *Applied Numerical Mathematics*, 20, 57-79.

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

METROPOLIS, N., ROSENBLUTH, A. W., TELLER, A. H. (1953). Equations of State Calculations by Fast Computing Machines, *Journal of Chemical Physics*, 21, 1087-1092.

MODAK, J. M.; LIM, H. C.; TAYEB, Y. J. (1986). General characteristics of optimal feed rate profile for various fed-batch fermentation processes. *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 1396-1407.

MODAK, J. M.; LIM, H. C. (1987). Feedback optimization of fed-batch fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 528-540.

MORBIDELLI, M., VARMA, A. (1989). A generalized criterion for parametric sensitivity: Application to a pseudohomogeneous tubular reactor with consecutive or parallel reactions. *Chemical Engineering Science*, 44, 1675-1696.

NAVARRO, A. R., SEPULVEDA, M. C, RUBIO, M.C. (2000). Bio- concentration of vinasse from the alcoholic fermentation of sugar cane molasses. *Waste Management*, p. 581-585

OLIVEIRA, G. T. S. (2006). Estudo e Aplicações da Evolução Diferencial. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Mecância, Universidade Federal de Uberlândia.

OLIVEIRA, F. C. G., VIANA, F. A. C., BORGES, J. A. F. and STEFFEN, V. (2007). Three-Dimensional Vehicular Structure Design Combining Finite Elemet Modeling and Numerical Optimization. 19th COBEM – International Congress of Mechanical Engineering.

OZMIHCI, S., KARGI, F. (2007). Ethanol fermentation of cheese whey powder solution by repeated fed-batch operation. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 169-174.

PALANKI, S., KRAVARIS, C., WANG, H. Y. (1993). Synthesis of state feedback laws for end-point optimization in batch processes. *Chemical Engineering Science*, 48, 135-142.

PANTELIDES, C. (1988). The consistent inicialization of differential algebric systems. *SIAM. J. SCI. STAT. Compt.*, 9, 213-231.

PERTEV, C., TÜRKER, M., BERBER, R. (1997). Dynamic modeling, sensitivity analysis and parameter estimation of industrial yeast fermenters. *Computers Chemical Engineering*, 21, 739-744.

PETZOLD, L. R., BROWN, P. N., HINDMARSH, A. C., LI, S. (2000). Code DDASPK. Copyright. University of Califórnia, 1-206.

PFEIFER, A. A. (2007). Controle Ótimo de Sistemas Algébrico-Diferenciais com Flutuação do Índice Diferencial. Uberlândia, 106p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia.

POPOVA, P., BOYADJIEV, C. (2007). Hierarchical Approach for Parameter Identification of Multiparameter Models. *Biochemical Engineering Journal*, 39, 397-402.

QUEINNEC, I., DAHHOU, B. (1994). Optimization and control of a fed-batch fermentation process. *Optimal Control Appl. & Methods.*, 15, 175–191.

RAY, W.H. (1981). Advanced Process Control. McGraw-Hill, New York., p. 87-90.

RENFRO, J. G. (1986). Computational studies in the optimization of systems described by differential-algebric equations. Tese (Doutorado) – University of Houston.

REVISTA ALCOOLBRÁS. (2006). São Paulo, nº 101, abr. 2006. Disponível em: <http://www.editoravalete.com.br/site%5Falcoolbras/>. Acesso em: 27 setembro 2006.

RIBEIRO, M. P. A., GIORDANO, R. C. (2005). Variational Calculus (Optimal Control) Applied to the Optimization of the Enzymatic Synthesis of Ampicillin. *Brazilian Archives of Biology an Technology*, 48, 19-28.

SANTOS, K. G.; LOBATO, F. S.; RIBEIRO, E. J.; LOPES, L. C. O. e MURATA, V. V. (2005). Controle Ótimo da Fermentação Alcoólica com Altas Concentrações Iniciais de Substrato em Reator Batelada Alimentada. *Anais do Sinaferm 2005*. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 7p.

Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.

SANZ, E., VOSS, C. I. (2006). Inverse modeling for seawater intrusion in coastal aquifers: Insights about parameter sensitivities, variances, correlations and estimation procedures derived from the Henry problem. *Advances in Water Resources*, 29, 439-457.

SCHMIDELL, W., FACCIOTTI , M. C. R. (2001). Biorreatores e Processos Fermentativos. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgar Blücher, p. 179-192. (Biotecnologia Industrial; v.2)

SEYWALD, H., CLIFF, E. M., WELL, K. H. (1994). Range optimal trajectories for an aircraft flying in the vertical plane. *Journal of Guidance, Control and Dynamics*, 17, 389-398.

SHEN, J. (2006). Optimal estimation of parameters for a estuarine eutrophication model. *Ecological Modelling*, 191, 521-537.

SHIUE, Y. L., WANG, F. S., LEE, W. C. (1995). Parameter estimation and sensitivity analysis for batch fermentation of recombinant cells. *Biotechnology Techniques*, 9, 891-896.

SILVA-NETO, A. J., SOEIRO, F. J. C. P. (2002). Estimation of the Phase Function of Anisotropic Scattering with a Combination of Gradient based and Stochastic Global Optimization Methods, Proceedings of 5o World Congress on Computational Mechanics, Vienna, Austria, July, 7-12.

SILVA-NETO, C. A., SILVA-NETO, A. J. (2003). Estimation of Optical Thickness, Single Scattering Albedo and Diffuse Reflectivities with a Minimization Algorithm based on an Interior Points Method, Proceedings of 17 International Congress of Mechanical Engineering, ABCM, São Paulo, Brazil.

SONNLEITNER, B., KAPPELI, O. (1986). Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiration capacity: Formulation and verification of a hypothesis, *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 927-937.

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

STIGTER, J. D., KEESMAN, K. J. (2004). Optimal parametric sensitivity control of a fed-batch reactor. *Automatica*, 40, 1459-1464.

STORN, R., PRICE, K. (1995). Differential Evolution: A Simple and Efficient Adaptive Scheme for Global Optimization over Continuous Spaces. Techinical Report TR 95-012, International Computer Science Institute, Berkeley.

STORN, R., PRICE, K. (1996). Differential Evolution – A simple and efficient adaptive scheme for global optimization over continuous spaces. International Computer Science Institute, Berkeley, 1-15.

STORN, R., PRICE, K., LAMPINEN, J. A. (2005). Differential Evolution - A Pratical Approach to Global Optimization. Springer. *Natural Computing Series*.

STRAPASSON, A. (2006). Perspectivas para o Álcool Combustível. In: Seminários realizados pela Associação Brasileira de Engenharia Automotiva – AEA, São Paulo, 2006. Disponível em: <www.aea.org.br/docs/seminarios2006/Matriz_Energetica/Trabalho%20-%20Alexandre%>. Acesso em: 12 dez. 2007.

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

STRYK, O. Von. (1999), User's Guide for DIRCOL – A Direct Collocation Method for the Numerical Solution of Optimal Control Problems. Version 2.1.

TAMBE, S. S., INAMDAR, S. R., BANDOPADHYAY, J. K., KULKARNI, B. D. (1991). Parametric sensitivity of complex reaction systems. *The Chemical Engineering Journal,* 46, 23-28.

THATIPAMALA, R., ROHANI, S., HILL, G. A. (1992). Effects of High Product and Substrate Inhibitions on the Kinetics and Biomass and Product Yields During Ethanol Batch Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 40, 289-297.

TORIJA, M.J., ROZÈS, N., POBLET, M., GUILLAMÓN, J.M., MAS, A. (2003). Effects of Fermentation Temperature on the Strain Population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 47-53.

TOSETTO, G. M. (2002). 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.

TRIÂNGULO recebe mais duas usinas de açúcar e álcool. Governo de Minas Secretaria de Estado de Desenvolvimento Econômico, Minas Gerais, mar. 2007. Disponível em: <http://www.desenvolvimento.mg.gov.br/index.php?option=com_content&task=view&id=134>. Acesso em: 04 abril 2007.

USINAS terão até 2017 para colher cana sem queimadas em São Paulo. Folha Online, São Paulo, jun. 2007. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/folha/dinheiro/ult91u301972.shtml>. Acesso em: 15 julho 2007.

VANDERPLAATS, G. N. (1999). Numerical Optimization Techniques for Engineering Design. Colorado Springs, CO, Third Edition.

VASCONCELOS, J. N., VALDMAN, B. (1988). Otimização do Processo de Fermentação Alcoólica através da Batelada Alimentada. V Simpósio de Avaliação de Safra da Agroindústria da Cana-de-Açúcar em Alagoas. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 106, nº 2, 38-48.

VASCONCELOS, J. N., PINTO, V. C., SILVA, R. A. (1992). Fermentação Alcoólica Industrial: Modelagem e simulação do Processo Descontínuo Alimentado. Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 1992, Salvador-BA. Anais do IX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. São Paulo : ABEQ, 2, 403-410.

VASCONCELOS, J. N. (1993). Influência do Perfil de Alimentação de Substrato sobre o Processo de Fermentação Alcoólica. *Revista Álcool & Açúcar*, SP, nº 66, 14-18.

VIEGAS, M. C. (2003). Otimização de Sistema de Fermentação Alcoólica Contínua Utilizando Reatores Tipo Torre e Leveduras com Características Floculantes. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP. 135p.

VOTRUBA, J. (1982). Practical aspects of mathematical modelling of fermentation processes as a method of description, simulation, identification and optimization. *Acta Biotechnologica*, 2, 119.

WANG, F. S., SHYU C. H. (1997). Optimal feed policy for fed-batch fermentation of ethanol production by *Zymomous mobilis*. *Bioprocess Engineering*, 17, 63–68.

WANG, F., SHEU, J. (2000). Multiobjective parameter estimation problems of fermentation processes using a high ethanol tolerance yeast. *Chemical Engineering Science*, 55, 3685-3695.

WANG, F. S., SU, T., JANG, H. (2001). Hybrid Differential Evolution for Problems of Kinetic Parameter Estimation and Dynamic Optimization of an Ethanol Fermentation Process. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 40, 2876-2885.

YANASE, H., OKAMOTO, K., TAKADERA, T. e SUGIURA, A. (2004). Microorganismos Transformados Fermentativos de Pentose, DNA Recombinante, Processo para produzir Etanol, Veículo de Imobilização, e, Biorreator. Depositante: Kansai Paint Co., Ltd - JP, procurador: Momsen, Leonardos & Cia, 30/07/2004.

XIONG, Z., ZHANG, J. (2004). Modelling and optimal control of fed-batch processes using a novel control affine feedforward neural network. *Neurocomputing*, 61, 317-337.

ZANFIR, M., GAVRIILIDIS, A. (2002). Parametric sensitivity in catalytic plate reactors with first-order endothermic-exothermic reactions. *Chemical Engineering Journal,* 86, 277-286.