

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Fermentação Contínua de *Zymomonas mobilis*:
Modelagem, Ajuste de Parâmetros e Inferências
a Partir do Consumo de Hidróxido de Sódio**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

CASSIANO RANZAN

Porto Alegre

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Fermentação Contínua de *Zymomonas mobilis*:
Modelagem, Ajuste de Parâmetros e Inferências
a Partir do Consumo de Hidróxido de Sódio**

CASSIANO RANZAN

Dissertação de mestrado apresentada como
requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Engenharia

Área de concentração: Pesquisa e
Desenvolvimento de Processos

Orientador:

Prof. Dr. Jorge Otávio Trierweiler

Co-orientador:

Prof^a. Dra. Eloane Malvessi

Colaborador:

Prof. Dr. Mauricio Moura da Silveira

Porto Alegre

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação “*Fermentação Contínua de Zymomonas mobilis: Modelagem, Ajuste de Parâmetros e Inferências a Partir do Consumo de Hidróxido de Sódio*”, elaborada por Cassiano Ranzan, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon – IB / UCS

Dra. Luciane Ferreira Trierweiler – DEQUI / UFRGS

Prof^a. Dra. Rosane Rech – ICTA/UFRGS

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pelas dádivas a mim concedidas.

Ao Prof. Dr. Jorge Otávio Trierweiler pela orientação, amizade e conselhos. Ele foi o grande idealizador deste trabalho, meu mentor, sem o qual não teria concluído esta etapa.

À Prof. Dra. Eloane Malvessi pela co-orientação e paciência. Sua participação ativa no decorrer deste trabalho foi essencial para seu término. Também gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Maurício Moura da Silveira pela colaboração e prestação apresentadas.

Ao Grupo de Intensificação, Modelagem, Simulação, Controle e Otimização de Processos (GIMSCOP), por me receber de braços abertos, em especial à Dra. Nina Paula Salau, MSc Cristiane Schweinberger e MSc Débora Faccin pelos auxílios prestados. Não poderia esquecer os colegas de laboratório que me proporcionaram momentos únicos no decorrer destes anos de convivência. Ao MSc Eng. Químico Anderson Pain, MSc. Eng. Químico Rodrigo Silveira e Eng. Python, pela companhia, coleguismo e participação ativa, inclusive em situações críticas, como alagamentos, terremotos e demais catástrofes naturais sujeitas ao laboratório. Ao ex colega MSc. Eng. Químico Fábio Cesar Diehl, atual diretor Petrobrás, grande amigo e participante ativo deste trabalho.

Ao Departamento de Engenharia Química (DEQUI) pela infra-estrutura disponibilizada e aos professores do curso de pós-graduação, exemplos de excelência e dedicação profissional. Também aos diversos colegas de mestrado, como Nathan, Busato, Toss, Giovana, Tata, Cris, Mineiro, Jeferson, Ciça, Jordana, Júlia, Palliga, Juliana, Guilherme, dentre muitos outros, pelos momentos de descontração e discussões.

Aos colegas do Laboratório de Bioprocessos da Universidade de Caxias do Sul, Sabrina, Natasha, Luana, Lucas, Thomás, dentre outros por me receberem tão bem.

Aos meus eternos amigos de Caxias, Chorão, Ede, Muller, Fontana, Franja, Léo, Meleco, Cléberson, Polleto e todos os demais pela força e apoio, sempre mostrando interesse pelo meu trabalho mesmo não fazendo a mínima idéia do que se tratava.

Aos meus irmãos de guerra da academia Sonkão Camp, de Muay Tai. Ao meu professor Helio Dipp, que tornou-se mais que um professor para mim, mas um grande amigo e exemplo de dedicação e amor ao esporte. Aos colegas Leoton, Roberto, Rodrigo, Lucas (meu irmão), João, Carine, Igor, Nathan, Larissa, Janine, Fred e todos os demais, pelos inúmeros olhos roxos, maxilar dolorido e canelas destruídas, mas também pela diversão, amizade e parceria.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela oportunidade, à Universidade de Caxias do Sul (UCS) pela parceria e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

E por fim, mas nunca menos importante, aos meus pais, Angelin Ranzan e Iracema Inez Ceron Ranzan, sem eles eu jamais concretizaria esta etapa, eles são os grandes responsáveis por eu ser quem sou hoje. Também ao meu grande irmão Lucas pela companhia, brigas, festas, lutas e amor. Valeu mano!!

Gostaria também de agradecer à Débora Secchi Silveira, que esteve ao meu lado durante estes dois anos, me incentivando, dando apoio e principalmente amor, independente das adversidades.

Resumo

A bactéria *Zymomonas mobilis* atraiu considerável interesse nas últimas décadas devido ao seu metabolismo único e eficientes características fermentativas na produção de etanol a partir de açúcares simples. No entanto, apesar das aparentes vantagens na conversão e taxas específicas quando comparada com as leveduras, estas ainda dominam o mercado produtivo de etanol. Dentre os diversos modelos encontrados na literatura para representar o processo fermentativo de glicose através de *Z. mobilis*, o modelo proposto por Jöbses *et al.* (1986) aparenta ser bem estruturado e ideal para a criação de estratégias de controle e otimização de processos fermentativos com este microrganismo, viabilizando sua utilização em escala industrial. Fermentações de *Z. mobilis* em regime contínuo apresentam comportamento oscilatório para baixas taxas de diluição, fenômeno este comprovado experimentalmente. Experimentos laboratoriais foram utilizados para a estimação de parâmetros do modelo de Jöbses, através da técnica de minimização da derivada do erro da função objetivo. O novo modelo ajustado apresenta dinâmica equivalente ao modelo original de Jöbses, fato este comprovado através da construção dos diagramas de bifurcação. Os diagramas de fase dos modelos apresentam algumas diferenças estruturais entre si, entretanto, a ocorrência de multiplicidade de estados estacionários em baixos valores de taxa de diluição está presente em todos. Em bioprocessos, a obtenção de informações sobre o sistema é um tanto complexa, devido a estes meios serem muito suscetíveis a distúrbios, contaminações, além de que medidas de concentrações são relativamente dispendiosas, associadas com um alto tempo morto, o que impossibilita, muitas vezes, a implementação de sistemas de controle eficientes. Para contribuir com a resolução deste problema foi desenvolvida uma nova inferência das variáveis de estado através da informação de consumo de hidróxido de sódio, utilizado no controle de pH do meio. Inferidores de variáveis de estado que utilizam a variação no consumo de hidróxido de sódio foram ajustados e apresentaram resultados promissores, mostrando a viabilidade do desenvolvimento de metodologias para este tipo de análise, tornando a caracterização de sistemas fermentativos mais rápida e acessível, não apenas em nível acadêmico, que a desenvolvida atualmente, principalmente devido ao baixo custo associado, e a dinâmica rápida deste tipo de sensor.

Palavras chave: *Zymomonas mobilis*, fermentações contínuas, modelagem, estimação de parâmetros, análise de bifurcação, inferidores de estado.

Abstract

The bacterium *Zymomonas mobilis* has attracted considerable interest in recent decades due to their unique metabolism and efficient characteristics in the production of ethanol by simple sugars. However, despite the apparent advantages in the conversion and specific rates, when compared with yeast, there is no industrial-scale fermentations with these bacteria. Among the various models found in literature to represent glucose fermentation with *Z. mobilis*, the model proposed by Jöbses *et al.* (1986) appears to be well structured and ideal for the creation of control strategies and optimization methods for increase productions. Fermentation in continuous mode with this organism exhibit oscillatory behavior at low dilution rates, phenomenon showed or demonstrated by experiments performed on laboratory scale. A laboratorial experiment also was used for estimation of new parameters group of Jöbses models, using the technique of minimization of error derivative for objective function. The new adjusted model set presents dynamics similar to the original model, fact confirmed by bifurcation analyses of both models. The diagram for these models show structural differences, but both presents steady states multiplicity and Hopf bifurcations. The obtained of fermentation characteristics is very complex, due to these reactive means being very susceptible to disturbances, contamination, among others, and concentrations measures are relatively expensive and whit a high dead time associated, which often prevents the implementation of control tools. The proposed inference of state variables by consumption rate of hydroxide sodium, used for maintenance pH medium, was tested and confirmed. Virtual sensors using the information of consumption rate of hydroxide were adjusted and have shown promising results, demonstrating the feasibility of developing methods of analysis based on this methodology, making the characterization of fermentative systems faster and cheaper them currently developed, mainly due to low cost associated, and the dynamics of this fast type of sensor.

Key words: *Zimomonas mobilis*, continuous fermentation, modeling, parameters estimation, bifurcation analysis, state inferring.

Sumário

Capítulo 1

Introdução	13
1.1 Motivação.....	14
1.2 Objetivos	15
1.3 Estrutura da Dissertação.....	16

Capítulo 2

Zymomonas mobilis e a Produção de Bioetanol	18
2.1 <i>Zymomonas mobilis</i>	19
2.1.1 Metabolismo de carboidratos	20
2.2 Modelagem matemática	22
2.3 Fermentação alcoólica utilizando a bactéria <i>Zymomonas mobilis</i>	25
2.3.1 Modelagem dinâmica do comportamento de <i>Z. mobilis</i>	25
2.3.2 Oscilação Sustentada.....	41
2.4 Características dos Principais Modelos.....	42

Capítulo 3

Materiais e Métodos	44
3.1 Instalações.....	45
3.2 Microrganismo	45
3.3 Meios de cultivo.....	45
3.4 Preparo de inóculo	46
3.5 Cultivo de <i>Z. mobilis</i> em biorreator de bancada	47
3.6 Métodos Analíticos	49
3.6.1 Coleta e preparo de amostras	49
3.6.2 Concentração celular.....	50
3.6.3 Determinação de açúcares redutores.....	51
3.6.4 Concentração de etanol	51

Capítulo 4

Estimação de Parâmetros para o modelo de Jöbses	52
4.1 <i>Identificação de Processos</i>	53
4.1.1 Estimativa de Parâmetros.....	53
4.2 Resultados experimentais.....	55
4.2.1 Fermentação 1	55
4.2.2 Fermentação 2	58
4.3 <i>Descrição do modelo</i>	61
4.4 <i>Método de Gauss</i>	63
4.5 <i>Estimativa de Parâmetros utilizando dados experimentais</i>	63
4.5.1 Cálculo de derivadas	66
4.5.2 Conjunto de parâmetros estimados	69

Capítulo 5

Análise de bifurcação do modelo de Jöbbses	74
5.1 <i>Sistemas não Lineares</i>	75
5.1.1 Estabilidade de Sistemas Dinâmicos.....	76
5.1.2 Diagramas de fase e Bifurcação.....	77
5.2 Análise Sistemática de Modelos	81
5.2.1 Simulações Dinâmicas	84
5.2.2 Análise de Bifurcação	85
5.2.3 Análise de Bifurcação Codimensão-2.....	92

Capítulo 6

Inferência de Variáveis de Estado	96
6.1 Uma visão geral acerca de Bioprocessos	97
6.2 Incremento Produtivo.....	97
6.3 Variáveis de processo.....	99
6.4 Transdutores associados a Bioprocessos.....	100
6.5 Medidas de Processo	102
6.5.1 Sensores Primários in situ	103
6.5.2 Sensores Primários em linha	103
6.5.3 Tecnologias analíticas aplicadas a bioprocessos.....	103
6.5.4 Sensores virtuais	104
6.6 Metabolismo de <i>Z. mobilis</i> e manutenção do pH.....	105
6.7 Inferência de estados associada ao controle de pH.....	108
6.8 Estudo de caso.....	109
6.9 Ajuste de modelos dinâmicos	113

Capítulo 7

Conclusões	118
Perspectivas.....	120
Referências Bibliográficas.....	122
Apêndice A	129
Apêndice B	137
Apêndice C	148
Anexo A	151

Lista de Figuras

Figura 1.1: Fermentações alcoólicas contínuas de <i>Z. mobilis</i> com a alteração de períodos de batelada. Fonte: Elnashaie <i>et al.</i> (2006).....	15
Figura 1.2: Estratégia de controle para reator de <i>Z. mobilis</i> . Fonte: Diehl (2009).....	16
Figura 2.1: Esquema proposto por Ghommidh <i>et al.</i> (1989) para a fermentação alcoólica de <i>Z. mobilis</i> em regime contínuo. Fonte: Ghommidh <i>et al.</i> , 1989.....	32
Figura 3.1: Obtenção de inóculo de <i>Z. mobilis</i> em frascos agitados: (1) cultura de <i>Z. mobilis</i> previamente ativada; (2, 3) frascos inoculados, mantidos sob condições de crescimento.	47
Figura 3.2: Diagrama das etapas para realização de fermentações em regime contínuo com a bactéria <i>Z. mobilis</i>	47
Figura 3.3: Sistema utilizado para realização de ensaios fermentativos, (1) cuba encamisada de fermentação; (2) controlador de pH; (3) sistema de agitação magnética; (4) reservatório de hidróxido de sódio; (5) banho termostaticado; (6) bomba peristáltica de recirculação; (7) entrada condensador.	49
Figura 4.1: Comportamento das correntes C_{So} , C_{Po} e D ao longo da fermentação, as variáveis C_{xo} e C_{eo} não são mostradas por não apresentarem variações.	56
Figura 4.2: Fermentação 1, concentrações de substrato e etanol ao longo do tempo de fermentação. As retas 1 e 2 representam, respectivamente, os instantes de início do processo contínuo e adição de etanol.	57
Figura 4.3: Fermentação 1, concentração celular ao longo do tempo de fermentação. As retas 1 e 2 representam, respectivamente, os instantes de início do processo contínuo e adição de etanol.	57
Figura 4.4: Fermentação 1, consumo cumulativo de hidróxido de sódio 5 M para controle do pH do meio reacional. As retas 1 e 2 representam, respectivamente, os instantes de início do processo contínuo e adição de etanol.	58
Figura 4.5: Comportamento das variáveis de entrada C_{So} , C_{Po} e D ao longo da fermentação 2, as variáveis C_{xo} e C_{eo} não são graficadas por assumirem valor zero durante todo período de fermentação.	59
Figura 4.6: Fermentação 2, concentrações de substrato e etanol ao longo do tempo de fermentação. As retas 1 e 2 representam, respectivamente, os instantes de início do processo contínuo e adição de etanol.	60
Figura 4.7: Fermentação 2, concentração celular ao longo do tempo de fermentação. As retas 1 e 2 representam, respectivamente, os instantes de início do processo contínuo e adição de etanol.	60
Figura 4.8: Fermentação 2, consumo cumulativo de hidróxido de sódio 5 M para controle do pH do meio reacional. As retas 1 e 2 representam, respectivamente, os instantes de início do processo contínuo e adição de etanol.	61
Figura 4.9: Fermentação 1, concentrações de substrato, etanol e biomassa experimental e simulação dos respectivos estados com o conjunto de parâmetros originais propostos por Jöbses. As retas transversais representam instantes onde ocorreram variações nas variáveis de entrada.	64
Figura 4.10: Fermentação 2, concentrações de substrato, etanol e biomassa experimental e simulação dos respectivos estados com o conjunto de parâmetros original propostos por Jöbses. As retas transversais representam instantes onde ocorreram variações nas variáveis de entrada.	65

Figura 4.11: Derivada das variáveis de estado, obtidas com a aplicação da técnica de <i>Cubic Spline</i> diretamente aos dados experimentais.	67
Figura 4.12: Resultado obtido através da aplicação de funções contínuas para representar os dados experimentais da Fermentação 2. As regiões especificadas de <i>a</i> a <i>j</i> compõe os diferentes intervalos usados para representar cada estado.	68
Figura 4.13: Derivada das variáveis de estado, obtidas com a aplicação da técnica de derivação no conjunto de dados ajustados aos resultados experimentais.	69
Figura 4.14: Dados experimentais e simulações dinâmicas do modelo original de Jöbses (θ_0) e dos três conjuntos obtidos (θ_1 , θ_2 e θ_3) para a Fermentação 2.	71
Figura 4.15: Dados experimentais e simulações dinâmicas do modelo original de Jöbses (θ_0) e dos três conjuntos obtidos (θ_1 , θ_2 e θ_3) para a Fermentação 1.	73
Figura 5.1: Bifurcação sela: equação graficada (a) e diagrama de bifurcação (b). <i>Fonte: Médio e Lines, 2001.</i>	79
Figura 5.2: Bifurcação transcítica: equação graficada (a) e diagrama de bifurcação (b). <i>Fonte: Médio e Lines, 2001.</i>	79
Figura 5.3: Bifurcação <i>pitchfork</i> : equação graficada (a) e diagrama de bifurcação (b). <i>Fonte: Médio e Lines, 2001.</i>	80
Figura 5.4: Localização dos autovalores no plano complexo em função de μ . <i>Adaptado: Bequette, 1998.</i>	81
Figura 5.5: Retrato de fase da formação de uma bifurcação Hopf: (a) supercrítica e (b) subcrítica. <i>Fonte: Kusnetsov, 1998.</i>	81
Figura 5.6: Espaços de fase: biestabilidade para o modelo original de Jöbses (θ_0) e dos modelos ajustados (θ_1 , θ_2 e θ_3).	83
Figura 5.7: Simulação dinâmica do modelo original de Jöbses (θ_0) e dos modelos ajustados (θ_1 , θ_2 e θ_3), para diferentes CI (a e b).	85
Figura 5.8: Diagrama de Bifurcação para o modelo de Jöbses original, $C_{So} = 200$ g/L.	86
Figura 5.9: Diagrama de Bifurcação para o modelo de Jöbses θ_1 , $C_{So} = 200$ g/L. Subgráficos (e) e (g) mostram o efeito de lavagem do reator (<i>washout</i>).	88
Figura 5.10: Diagrama de Bifurcação para o modelo de Jöbses θ_2 , $C_{So} = 200$ g/L.	90
Figura 5.11: Diagrama de Bifurcação para o modelo de Jöbses θ_3 , $C_{So} = 200$ g/L.	91
Figura 5.12: Diagramas de Bifurcação de codimensão-2 para o modelo de Jöbses θ_0	92
Figura 5.13: Diagramas de Bifurcação de codimensão-2 para o modelo de Jöbses θ_1	93
Figura 5.14: Diagramas de Bifurcação de codimensão-2 para o modelo de Jöbses θ_2	93
Figura 5.15: Diagramas de Bifurcação de codimensão-2 para o modelo de Jöbses θ_3	94
Figura 6.1: Típico monitoramento e controle de um bioprocessos. <i>Fonte: LIU et al. (2001).</i>	98
Figura 6.2: Exemplo de pós-tratamento genérico aplicado a fermentações. <i>Fonte: Aford (2006).</i>	99
Figura 6.3: Captação de oxigênio versus tempo. <i>Fonte: Aford, (2006).</i>	104
Figura 6.4: Vias metabólicas de formação de produtos da fermentação de carboidratos por <i>Z. mobilis</i> . A lista de enzimas encontra-se no ANEXO A. <i>Fonte: Bertasso (1996).</i>	107
Figura 6.5: Volume cumulativo de hidróxido de sódio adicionado durante a Fermentação 2.	110
Figura 6.6: Comportamento das variáveis de estado da Fermentação 2. Dados experimentais.	111
Figura 6.7: Comportamento das variáveis de estado e da Taxa de consumo de hidróxido da Fermentação 2.	112
Figura 6.8: Sensores virtuais aplicados às variáveis de estado da Fermentação 2.	115

Lista de Tabelas

Tabela 2.1: Parâmetros apresentados do modelo de Jöbses <i>et al.</i> (1986).....	31
Tabela 2.2: Parâmetros do modelo de Ghommidh <i>et al.</i> (1989).....	33
Tabela 2.3: Parâmetros do modelo de Jarzebski.....	36
Tabela 2.4: Parâmetros do modelo de Daugulis <i>et al.</i> (1997).....	40
Tabela 2.5: Resumo das características dos modelos para fermentações com <i>Z. mobilis</i>	42
Tabela 3.1: Composição dos meios de cultura.....	45
Tabela 3.2: Concentração de glicose dos meios de cultura.....	46
Tabela 4.1: Condições iniciais da Fermentação 1.....	55
Tabela 4.2: Valores assumidos pelas variáveis de entrada em momentos característicos da Fermentação 1.....	56
Tabela 4.3: Condições iniciais da Fermentação 2.....	58
Tabela 4.4: Valores assumidos pelas variáveis de entrada em momentos característicos da Fermentação 2.....	59
Tabela 4.5: Parâmetros originais do modelo de Jöbses.....	62
Tabela 4.6: Conjuntos de parâmetros estimados para o modelo de Jöbses <i>et al.</i> (1986).....	70
Tabela 5.1: Classificação topológica de equilíbrios no plano. Fonte: Médio e Lines, 2001.....	78
Tabela 5.2: Conjuntos de parâmetros para o modelo de Jöbses: original (θ_0) e ajustados (θ_1, θ_2 e θ_3)......	83
Tabela 5.3: Condições iniciais para a realização de simulações dinâmicas para os modelos ajustados.....	84
Tabela 5.4: Singularidades presentes no modelo original de Jöbses para $C_{S0} = 200$ g/L.....	87
Tabela 5.5: Singularidades presentes no modelo de Jöbses $\theta 1$ para $C_{S0} = 200$ g/L.....	89
Tabela 6.1: Sensores virtuais gerados.....	114

Capítulo 1

Introdução

1.1 Motivação

A busca por combustíveis renováveis, a fim de promover a substituição da matriz energética mundial baseada atualmente em combustíveis de origem fóssil, vem sendo alvo de intensas pesquisas e estudos (Porto, 2005). O etanol é, no momento, um dos mais prováveis substitutos a esses combustíveis. No processo fermentativo, a bactéria *Z. mobilis* vem sendo muito pesquisada, principalmente devido às suas características de fermentação aparentemente muito promissoras na utilização em escala industrial (Lima, Basso e Amorim, 2001).

Zymomonas mobilis tem atraído considerável interesse como resultado de seu rápido metabolismo e eficiente habilidade em produzir etanol a partir de açúcares simples. No entanto, apesar das aparentes vantagens como maiores rendimentos, taxas de crescimento específicas mais rápidas, menor produção de biomassa, não necessidade de adição controlada de oxigênio e boa receptividade às manipulações genéticas, principalmente quando comparada à *Saccharomyces cerevisiae*, principal microrganismo utilizado na produção de etanol, ainda não existem, plantas em escala industrial que utilizem *Z. mobilis* para produção de etanol combustível (Najafpour, 2007).

A maior limitação de *Z. mobilis* é relacionada a sua gama de substratos fermentáveis, sendo restrita à glicose, frutose e sacarose. Entretanto, manipulações genéticas tem apresentado sucesso no desenvolvimento de linhagens capazes de fermentar cadeias formadas por cinco carbonos, como pentoses (Franden; Pienkos e Zhang, 2009). Além do etanol, outros produtos podem ser obtidos do processo fermentativo, em função do tipo de substrato utilizado, como a formação de ácido acético, ácido fórmico, acetona e sorbitol (Rogers *et al.*, 2007).

O comportamento da bactéria *Z. mobilis* para a fermentação de glicose foi modelado por diversos pesquisadores, dentre os quais destacam-se os modelos propostos por Jöbses *et al.* (1985), Ghommidh *et al.* (1989), Jarzebski (1992) e Daugulis *et al.* (1997). Estes modelos apresentam diferenças estruturais, algumas variáveis distintas e diferentes tipos de comportamentos dinâmico e estacionário para condições de entrada equivalentes.

Neste trabalho foi utilizado o modelo de Jöbses como ponto de partida para o estudo de fermentações contínuas de *Z. mobilis*, já que este modelo apresenta características observadas na prática, como multiplicidade de equilíbrios e comportamentos oscilatórios, previstas por este modelo.

Fermentações de *Z. mobilis* apresentam características marcantes, principalmente o surgimento de períodos com comportamento oscilatório e multiplicidade de estados estacionários. Elnashaie *et al.* (2006), comprovam experimentalmente o aparecimento de multiplicidade de

equilíbrios para determinadas condições experimentais. A Figura 1.1 mostra através de dados experimentais a capacidade do sistema em atingir diferentes estados estacionários apenas controlando condições específicas da fermentação, como taxa de diluição e concentração de glicose na corrente de alimentação. Para diferentes períodos de operação em batelada, o sistema migra para dois diferentes estados de equilíbrio. Com a modificação do tempo de batelada o que ocorre efetivamente é a manipulação das condições iniciais para o processo contínuo, já que as condições de operação são as mesmas (taxa de diluição e concentração de substrato na alimentação), resultando assim na migração do sistema para diferentes soluções e comprovando a multiplicidade de equilíbrios para as mesmas condições de operação.

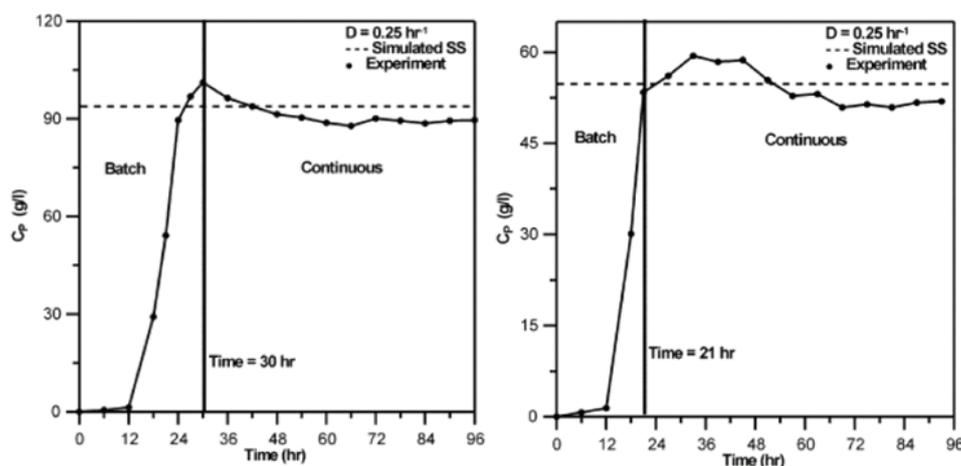


Figura 1.1: Fermentações alcoólicas contínuas de *Z. mobilis* com a alteração de períodos de batelada. Fonte: Elnashaie *et al.* (2006).

Este fenômeno observado em fermentações com *Z. mobilis* é previsto pelo modelo de Jöbbses, o que viabiliza sua utilização em estudos de fermentações com esta bactéria. Devido a existência de outros modelos para este processo, a segmentação destes, frente características estático/dinâmicas, deve ser feita através da utilização de uma ferramenta capaz de caracterizá-los. Neste trabalho optou-se pela construção de diagramas de bifurcação como ferramentas para a escolha da estrutura de modelo a ser estudada.

1.2 Objetivos

Novas estratégias de controle foram propostas baseadas no modelo original de Jöbbses. Diehl (2009), avaliou a manipulação do sistema fermentativo de *Z. mobilis* através da adição de etanol, o que possibilitou a migração do ponto de operação entre os diversos ramos de soluções estacionárias.

Como observado na Figura 1.2 a mudança de equilíbrio da solução estacionária, localizada na região de alta conversão A1* para a região de baixa conversão C1*, foi provocada por manipulações da taxa de diluição. Na tentativa de retornar a operação do sistema para a região de alta conversão A1*, com a manipulação da taxa de diluição, observou-se a migração do sistema para C2*, ponto de operação contido no ramo de baixa conversão. Com a adição de etanol através de uma corrente secundária de alimentação, foi observado um distúrbio no meio reacional que voltou a operar em A1*.

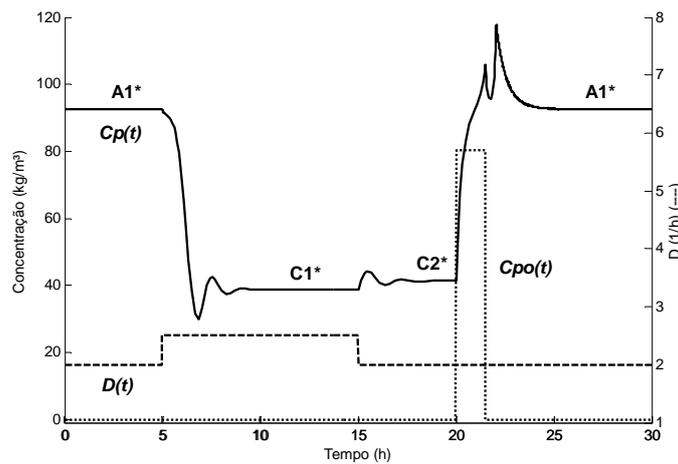


Figura 1.2: Estratégia de controle para reator de *Z. mobilis*. Fonte: Diehl (2009).

1.3 Estrutura da Dissertação

No Capítulo 2 é apresentada a revisão bibliográfica acerca de processos fermentativos com a bactéria *Zymomonas mobilis*, apresentando as principais características desta bactéria e os modelos propostos para representarem fermentações contínuas de glicose com este microrganismo.

O Capítulo 3 apresenta a metodologia aplicada na realização das fermentações contínuas de *Z. mobilis* em escala laboratorial.

No Capítulo 4 são utilizados dados reais de planta laboratorial para o ajuste de parâmetros à estrutura de modelo escolhida. O ajuste destes parâmetros é feito através da metodologia proposta por Machado e Trierweiler (2004) e largamente testada por Schweinberger (2009), onde é proposta a determinação de parâmetros através da minimização da derivada da função erro, metodologia capaz de capturar a tendência geral do processo, resultando em melhores conjuntos de parâmetros estimados.

No Capítulo 5 são apresentadas descrições sobre análise de bifurcação e construção de diagramas de bifurcação, além de ser feita a análise do modelo de Jöbses original, e dos modelos obtidos no Capítulo 4, utilizando esta técnica como ferramenta na escolha do modelo que melhor representa o processo real, de forma a permitir sua utilização na proposta de novos sistemas de controle e otimização do processo de fermentação com este microrganismo.

O resultado obtido através da simulação ilustrada na Figura 1.2, obtidas com o modelo de Jöbses foram os motivadores dos ensaios laboratoriais apresentados no Capítulo 4. Nestes ensaios, tentamos comprovar a viabilidade da estratégia de controle apontada por Diehl (2009), provocando a migração entre estados estacionários através de distúrbios na concentração de etanol.

O capítulo 6 apresenta uma nova metodologia para a quantização de variáveis chave de processos fermentativos, aplicada à fermentações com *Z. mobilis* com o intuito de avaliar a viabilidade desta. Neste capítulo é proposta a inferência de variáveis chave do processo (concentrações de substrato, biomassa e etanol) através das variações da taxa de hidróxido de sódio consumido para o controle do pH reacional.

A obtenção de um inferidor, capaz de converter dados relativos ao consumo de hidróxido de sódio, utilizado para o controle do pH reacional, em concentrações de biomassa, substrato ou etanol, variáveis chave do processo e usualmente de difícil quantização, seria de grande relevância. Este sistema permitiria a implementação de novas estratégias de controle, além de tornar a caracterização de sistemas fermentativos algo mais acessível e principalmente reduziria o tempo morto associado a estas caracterizações.

Finalmente no Capítulo 7 são apresentadas as principais conclusões e sugestões para trabalhos futuros. Três apêndices e um anexo complementam o conteúdo desta dissertação. No apêndice A é apresentada uma revisão sobre diversos conceitos de bifurcação, ficando para o apêndice B a discussão sobre o método empregado na estimação dos parâmetros do modelo de Jöbses. O apêndice C apresenta a tabela com funções ajustadas a dados experimentais. Por fim, o anexo A apresenta as enzimas presentes na rota fermentativa aplicada por *Z. mobilis*.

Capítulo 2

***Zymomonas mobilis* e a Produção de Bioetanol**

2.1 *Zymomonas mobilis*

De acordo com Swings e DeLey (1984), a bactéria *Zymomonas mobilis* engloba apenas uma espécie, com duas subespécies *Zymomonas mobilis* subespécie *mobilis* e *Zymomonas mobilis* subespécie *pamaceae*.

Z. mobilis é uma bactéria anaeróbia, gram-negativa, podendo se apresentar de forma isolada, aos pares ou em cadeia. Sua reprodução é, na grande maioria dos casos, por divisão binária simples, na qual uma célula divide-se ao meio após atingir determinado tamanho. Tipicamente o formato assumido por tais microrganismos é esférico, cilíndrico ou espiralado (Alterthum, 2001). Suas dimensões, quando na forma cilíndrica, variam de 1 a 6 µm de comprimento e 1 a 1,4 µm de diâmetro, não formam cápsulas nem esporos (Swings e DeLey, 1977, Viikari, 1986).

As bactérias *Z. mobilis* são quimioorganotróficas, o que possibilita o crescimento em glicose ou frutose, podendo fermentar 1 mol de glicose à aproximadamente 1,8 moles de etanol, 1,9 moles de CO₂, 0,15 moles de ácido acético e uma pequena quantidade de outros subprodutos como lactato, acetaldeído, dentre outros (Falcão, 1982; Bertasso, 1996). *Z. mobilis*, como a grande maioria dos organismos quimioorganotróficos, necessita de fontes de nitrogênio, fósforo, enxofre e micronutrientes, e *Z. mobilis* é relativamente insensível ao oxigênio (Viikari, 1986).

Bactérias do gênero *Z. mobilis* são microrganismos encontrados no meio ambiente, em áreas tropicais da América, África e Ásia, em associação com plantas com alto teor de açúcares nas seivas (Swings e De Ley, 1977; Viikari, 1986). *Z. mobilis* apresenta efeito antagônico contra numerosas espécies de bactérias e fungos, como por exemplo, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* e *Candida albicans*; porém, não é patogênica para seres humanos e animais (Wanick *et al.*, 1970; Lima *et al.*, 1972). A resistência à grande variedade de antibióticos por várias linhagens de *Z. mobilis* foi amplamente pesquisada e relatada na literatura (Swings e De Ley, 1977).

O nitrogênio, componente significativo para o “pool” protético das células, pode ser adicionado ao meio de cultura na forma de aminoácidos, peptona, sais de amônia ou peptídeos. Sais de amônio e aminoácidos conduzem a um melhor crescimento, pelo fato de não promoverem acúmulo de nitritos e nitratos. O fósforo também possui papel importante nas vias metabólicas, iniciadas através de uma fosforilação do substrato, sendo elemento constituinte das moléculas de ATP que estão presentes no mecanismo energético das células. O fósforo é absorvido, preferencialmente, de sais de potássio como KH₂PO₄ ou K₂HPO₄. O enxofre, componente estrutural da célula e fundamental para a formação de proteínas, pode ser fornecido para a *Z. mobilis* por metionina, cisteína e sulfatos, sendo o MgSO₄ a melhor fonte de enxofre, por servir

simultaneamente também como fonte de magnésio (França e Rodrigues, 1985). O magnésio é responsável pela estabilidade estrutural de diversas enzimas, como também na prevenção da formação de vesículas na membrana externa da célula (Galani et al., 1985).

Um dos fatores mais importantes e significativos em processos de fermentação de etanol é a inibição causada por este produto, o que leva a uma baixa produtividade e um elevado custo de produção (Ingram e Buttke, 1984). A seleção de linhagens resistentes a elevadas concentrações de etanol é uma das alternativas para minimizar o efeito de inibição. Diversos trabalhos estão sendo desenvolvidos na área da fermentação alcoólica, com o objetivo de selecionar microrganismos mais resistentes e que possibilitem incrementos produtivos (Neto, 2006; Joachimsthal et al. 1998; Mohagheghi *et al.*, 2004).

Nos últimos anos, *Z. mobilis* foi considerada mais promissora para a produção industrial de etanol, quando comparada às leveduras, por apresentar alta tolerância a etanol, maiores velocidades específicas de consumo de substrato, de produção de etanol e conseqüentemente, maior rendimento (Ruanglek *et al.*, 2006, Beavan *et al.*, 1989). No processo operado em regime contínuo, complexidades associadas à ocorrência de comportamento oscilatório das concentrações de substrato, biomassa e produto, são decorrentes das condições de processo de fermentação empregadas (Camêlo, 2004, Pinheiro, 2001, Bruce *et al.*, 1991, Ghommidh *et al.*, 1989, Jöbses *et al.*, 1986, Lee *et al.*, 1979, 1980). Adicionalmente observa-se a multiplicidade de estados estacionários, como relatado por Li (1996), Costa *et al.* (2001), Diez e Yokoya (1996), Baratti e Torres (1987), dentre outros.

2.1.1 Metabolismo de carboidratos

Z. mobilis é obrigatoriamente fermentativa, anaeróbia, apresentando aerotolerância. Como fontes de carbono, utiliza somente glicose, frutose e sacarose, apresentando tolerância a altas concentrações de açúcares e etanol (Viikari, 1988; Sprenger, 1996). Glicose, frutose e sacarose são metabolizadas na mesma via bioquímica, a via de Entner-Doudoroff, característica marcante do gênero *Z. mobilis*, sendo também identificada como única bactéria anaeróbia a utilizar esta rota metabólica (Gibbs e Moss, 1954; Viikari, 1984). Esta via, entretanto, apresenta reações em comum com a via glicolítica. O rendimento energético é a metade do obtido por leveduras, assim, é produzida a metade do ATP por mol de glicose. Desta forma, ocorre um menor rendimento em biomassa, sendo necessário consumir mais glicose durante a fermentação para gerar a quantidade de ATP necessária a sua manutenção (Dawes et al., 1996). Stokes et al. (1981) sugeriram que *Z.*

mobilis é descendente de organismos aeróbios, que teriam perdido a capacidade de sintetizar certas enzimas do ciclo de Krebs.

Principalmente na década de 80, *Z. mobilis* foi citada por vários autores em função da sua potencialidade na produção de etanol em larga escala (Lyness et al., 1981; Fein et al., 1983; Doelle e Greenfield, 1985; Viikari e Korhola, 1986; Buccholz et al., 1987). Utilizando glicose como fonte de carbono, a produção de etanol representa cerca de 95% do valor máximo teórico, havendo a formação de outros produtos como acetoína, acetaldeído, glicerol, ácido acético e ácido láctico, mas em pequenas concentrações (Viikari, 1988). Erzinger (1996) e Wisbeck *et al.* (1997) destacam a significativa redução da produtividade em processos batelada usando altas concentrações iniciais de glicose. Também já foi mostrado que concentrações elevadas de glicose levam, ainda, à inibição do crescimento microbiano (Rogers *et al.*, 1982).

Rendimentos inferiores em etanol são atingidos com o uso de sacarose, frutose ou de uma mistura de glicose e frutose, principalmente em altas concentrações (Doelle e Greenfield, 1985; Viikari e Korhola, 1986). Com a utilização de frutose como substrato, Viikari (1988) relata que a produção de etanol por *Z. mobilis* atinge cerca de 90% do valor máximo teórico, sendo observada a formação de dihidroxiacetona e manitol além dos mesmos subprodutos formados com o uso de glicose. Com sacarose é observada uma redução mais acentuada na produção de etanol, cerca de 75-80% do máximo teórico. Levana e sorbitol são os principais subprodutos formados na fermentação alcoólica de sacarose por *Z. mobilis* (Viikari, 1984).

Kesava *et al.* (1995) estudaram a produção de etanol por *Z. mobilis* ATCC10988 utilizando diferentes concentrações de glicose, relatando o aumento da duração da fase *lag* e a diminuição do rendimento em etanol com utilização de concentrações de glicose acima de 200 g/l. Erzinger *et al.* (2003) relatam a eficiência do uso do regime descontínuo alimentado de fermentação como alternativa para evitar a inibição pelo substrato e incrementar a produção de etanol.

Z. mobilis é considerada uma alternativa para a produção de etanol em larga escala, com vantagens em relação ao uso de leveduras, que incluem melhor rendimento na conversão de açúcares à etanol, menor produção de biomassa, maior tolerância ao etanol e facilidade de manipulação genética para melhoramento (Shene e Bravo, 2001; Lin e Tanaka, 2006). A principal desvantagem apresentada na literatura para esta bactéria, com relação às leveduras, é sua limitada quantidade de substratos fermentáveis, ficando restrita a glicose, frutose e sacarose (Sprenger, 1996; Gunasekaran e Chandra, 1999). Apesar disto, estudos focados em estender a quantidade de substratos fermentáveis por *Z. mobilis*, mostram a viabilidade do desenvolvimento de uma linhagem

recombinante desta bactéria capaz de fermentar substratos com cadeias de 5 carbonos, mais especificamente substratos a base de xiloses (Rogers *et al.*, 2007).

A viabilidade de utilização de *Z. mobilis* para produção de etanol a partir de fontes ricas em materiais lignocelulósicos, como resíduos da agricultura, vem sendo altamente pesquisada e relatada. O problema em utilizar este tipo de substrato encontra-se no fato da toxicidade natural dos hidrolisados de lignocelulose resultar em altos custos de processo para desintoxicação do meio reacional (Aden e Foust, 2009). Linhagens recombinantes de *Escherichia coli* e *Z. mobilis* têm apresentado viabilidade para utilização neste tipo de substrato, por apresentarem menor fator inibitório de crescimento na presença dos componentes tóxicos característicos destes meios (Franden; Pienkos e Zhang, 2009).

Projeções mostram que na África e na Ásia, *Z. mobilis* tende a ocupar uma posição industrial similar a que *Saccharomyces cerevisiae* ocupa na Europa e nas Américas, por apresentar boa tolerância à altas concentrações de etanol (acima de 120 g/L) (Lin e Tanaka, 2006) e de substrato (Najafpour, 2007) o que possibilita maiores rendimentos e lucros. O fato de ser uma bactéria gram-negativa a torna mais atrativa, já que esse tipo de microrganismo permite manipulações genéticas com maior facilidade (Medigan *et al.*, 2000).

2.2 Modelagem matemática

A utilização de ferramentas matemáticas para o entendimento qualitativo e quantitativo de processos, vem sendo de grande auxílio no desenvolvimento de processos e tecnologias. Dentre estas ferramentas, descrições de fenômenos e processos reais, chamados de modelos matemáticos, permitem a caracterização dos mesmos quando suas entradas são conhecidas (Mello e Pinto, 2008). A concepção de um modelo surge da demanda investigativa em criar uma estrutura física ou abstrata, simples ou complexa, capaz de descrever um fenômeno real. O resultado da simulação de um modelo deve ser confrontado com o fato experimental, que se trata de uma referência básica da investigação. Caso a comparação seja positiva, significa que o modelo representa, dentro de um determinado grau de confiança, o fenômeno modelado. Caso contrário, novas propostas de modelo devem ser formuladas e testadas (Aris, 1989). Sem resultados experimentais, a validação de modelos torna-se intangível, bem como sem a utilização de modelos, restrições temporais ou econômicas podem inviabilizar e restringir o avanço da pesquisa (Melo e Pinto, 2008).

Os modelos são basicamente divididos em três grupos: os teóricos, fenomenológicos ou constitutivos, formam modelos baseados puramente em princípios físicos e químicos; os empíricos,

obtidos através de relações de dados do processo; e os modelos semi-empíricos, que combinam fundamentos teóricos e aproximações empíricas (Mikles e Fikar, 2007 *apud* Diehl, 2009).

Os modelos fenomenológicos, devido a sua estrutura, possuem capacidade extrapolativa, fato que não ocorre em modelos empíricos. Como modelos empíricos são desenvolvidos a partir de dados experimentais, apresentam apenas características interpolativas, tornando sua faixa de validade restrita a faixa de dados experimentais utilizados para seu desenvolvimento (Bequette, 1998).

É rara a existência de um único modelo que descreva um determinado processo. Em geral, a complexidade do modelo depende da finalidade de seu uso. Por exemplo, se apenas uma aproximação do resultado for suficiente, então um modelo simplificado pode ser utilizado (Bequette, 1998). O desenvolvimento de um modelo rigoroso, que leve em consideração todos os fenômenos envolvidos a nível microscópico, em geral é tão complexo que o tempo necessário a sua formulação torna-se muito longo e a sua resolução possivelmente impraticável (Luyben, 1996). Sendo assim faz-se necessário um compromisso entre uma descrição rigorosa e uma resposta adequada. Isso envolve uma série de considerações com o objetivo de simplificação. No artigo *Modeling in Chemical Engineering* publicado em 2002, Levenspiel cita uma passagem da monografia de Denbigh (1951), que conduz a idéia de que a abstração da complexidade do mundo real, através de considerações de situações mais ou menos idealizadas, é sempre necessária na ciência com a finalidade de amenizar a análise dos fenômenos desejados.

Segundo Bequette (1998), o resultado mais importante no desenvolvimento de modelos matemáticos em engenharia química está no entendimento do comportamento do processo proporcionado pelos mesmos. As relações de causa-efeito entre as variáveis podem ser vistas de forma mais clara. Os modelos matemáticos podem ser ferramentas úteis na pesquisa e desenvolvimento de plantas laboratoriais, auxiliando de formas diversas em diferentes áreas, como por exemplo:

- pesquisa e desenvolvimento: na determinação de mecanismos cinéticos e parâmetros através de dados laboratoriais ou de plantas piloto; estudo dos efeitos de diferentes condições operacionais para otimização e controle; auxílio em cálculos de *scale-up*;
- projeto: permite a flexibilidade no dimensionamento e na determinação do melhor arranjo dos equipamentos no processo; facilita a análise de interações entre várias partes de uma planta, principalmente quando existe integração mássica e energética; proporciona simulações de *start up*, *shutdown* e situações de emergência; além de auxiliar na avaliação de estruturas e estratégias de controle;

- operação: ajuda no diagnóstico de problemas de controle e processo; permite o treinamento de operadores; é imprescindível na otimização operacional da planta; é mais seguro, barato e rápido no estudo do comportamento da planta quando comparado a testes experimentais, desde que o modelo seja devidamente validado.

Além dos acima citados há ainda a possibilidade de determinar novas condições operacionais que não seriam possíveis ou até mesmo difíceis de serem alcançadas experimentalmente. Estes novos pontos de operação podem ser identificados através de análise de multiplicidade de estados dos modelos, pela construção dos diagramas de bifurcação.

Embora a engenharia bioquímica englobe diversos processos, como a transferência de massa e calor, a pesquisa em modelagem matemática, citada na literatura técnica especializada, refere-se fundamentalmente às reações biológicas e, recentemente, às reações que ocorrem no interior das células. Em razão da complexidade do processo real (que envolve leis físico-químicas, bioquímicas e genéticas), somada às limitações matemáticas, os modelos, em geral, fornecem uma predição consistente somente para algumas propriedades (Bonomi e Schmidell, 2001). Inúmeras características dos processos fermentativos tornam o desenvolvimento de rigorosos modelos matemáticos uma árdua tarefa. Entre essas podem-se citar as baixas velocidades de reação, a complexidade da mistura reagente e da capacidade do sistema de sintetizar seu próprio catalisador, ausência de sensores para automação em tempo real, problemas de esterilidade, entre outros.

Modelos rigorosos que consideram as células dos microrganismos indivíduos distintos com propriedades únicas e levam em conta variações intra e extracelulares, são conhecidos como modelos estruturados e segregados.

Estruturação diz respeito à modelagem aplicada as células dos microrganismos. Modelos estruturados consideram a população celular segregada em células individuais que diferem em suas características, enquanto modelos não-estruturados consideram a população celular como um todo, uma “biofase”, que interage com o meio na forma de um único elemento, desconsiderando a heterogeneidade da população. A segregação de um modelo, por sua vez, diz respeito à modelagem aplicada às reações intracelulares. Modelos segregados consideram as reações que ocorrem dentro das células como individuais. A biomassa é dividida em compartimentos distintos, RNA, DNA, proteínas, hidratos de carbono, etc. As reações que ocorrem entre as células e o meio são descritas através de fórmulas. Por outro lado, modelos não-segregados consideram as células uma entidade em solução que interage com o meio ambiente, negligenciando as variações químicas intracelulares (Garhyan e Elnashaie, 2004).

2.3 Fermentação alcoólica utilizando a bactéria *Zymomonas mobilis*

2.3.1 Modelagem dinâmica do comportamento de *Z. mobilis*

A primeira proposta funcional feita para relacionar a velocidade de crescimento específica μ e a concentração de um composto essencial foi àquela feita por Monod em 1942, Equação (2.1). Nesta equação a velocidade de crescimento é função da concentração de substrato C_S , da constante K_S , e a variável μ_{max} , que representa a velocidade específica de crescimento máxima, factível quando $C_S \gg K_S$ e as concentrações de todos os outros nutrientes essenciais permanecem inalteradas. A constante K_S é numericamente igual ao valor da concentração de nutrientes limitante para qual a velocidade de crescimento específica é a metade de seu valor máximo.

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{C_S}{K_S + C_S} \right) \quad (2.1)$$

A equação de Monod é uma simplificação aplicável quando a presença de produtos metabólicos tóxicos não desempenha papel importante, e a inibição causada por concentrações excessivas de substrato pode ser negligenciada. Entretanto, por causa de sua analogia com a cinética de Michaelis-Menten, de reação catalítica enzimática, é amplamente utilizada (Bailey e Ollis, 1986).

Durante os processos de fermentação alcoólica, o etanol acumula-se no mosto, de forma que quando em altas concentrações ele promove a supressão da atividade metabólica do microrganismo. Como a presença de etanol tem influencia na velocidade de crescimento específica, a equação de Monod deve ser modificada de forma a levar em consideração a concentração de etanol no meio, C_P (Li, 1995). O efeito inibitório causado pelo etanol é devido a sua influência no valor de μ_{max} , entretanto, não apresenta efeito sobre o valor de K_S (Aiba et al., 1968; Ghose e Tyagi, 1979; Loung, 1985). As Equações (2.2) à (2.5) apresentam modificações na equação de Monod por levar em consideração a inibição causada pela concentração de etanol. Respectivamente elas representam a relação linear (2.2), a relação exponencial (2.3), a relação hiperbólica (2.4) e a relação parabólica (2.5).

$$\mu = \mu_{max} \left(1 - \frac{C_P}{P_m} \right) \left(\frac{C_S}{K_S + C_S} \right) \quad (2.2)$$

$$\mu = \mu_{\max} e^{-K_1 C_P} \left(\frac{C_S}{K_S + C_S} \right) \quad (2.3)$$

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{C_S}{1 + C_P/K_2} \right) \left(\frac{C_S}{K_S + C_S} \right) \quad (2.4)$$

$$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \left(\frac{C_P}{P_m} \right)^\alpha \right) \left(\frac{C_S}{K_S + C_S} \right) \quad (2.5)$$

As variáveis P_m , K_1 , K_2 e α , apresentadas nas equações acima, são determinadas de forma empírica, sendo P_m a concentração de etanol acima da qual o crescimento celular é nulo. Todas as equações de velocidade de crescimento específico prevêem diminuição no crescimento celular para elevadas concentrações de etanol, entretanto as relações exponencial e hiperbólica também indicam um crescimento celular e produção de etanol indefinidos. Este fato não é observado experimentalmente, pois existe uma dada concentração de etanol que acima desta o crescimento celular cessa. Na prática, a tolerância de etanol é fortemente associada à máxima concentração de etanol suportada, em torno de 120 g/L (Luong, 1985). Existem também, concentrações limites abaixo das quais o efeito inibidor do etanol é desprezível, desta forma, a relação linear foi modificada para a forma apresentada na Equação (2.6) e deve satisfazer as condições expressas nas equações (2.7) e (2.8) (Rogers et al., 1988).

$$\mu(C_S, C_P) = \mu_{\max} \left(1 - \frac{C_P - P_i}{P_m + P_i} \right) \left(\frac{C_S}{K_S + C_S} \right) \quad (2.6)$$

$$\frac{C_P - P_i}{P_m - P_i} = 0 \quad \text{Se } C_P \leq P_i \quad (2.7)$$

$$\frac{C_P - P_i}{P_m - P_i} = 1 \quad \text{Se } C_P > P_m \quad (2.8)$$

Além da inibição por etanol, o efeito de inibição por substrato também se torna significativo para altas concentrações de substrato, em torno de 150 g/L, além de também possuir um limite inferior no qual a inibição torna-se desprezível, e devido a estes fenômenos, outras correlações para a velocidade de crescimento específica foram propostas, equações (2.9) à (2.13), onde K_i e K_S são constantes e $\mu_{m(i)}$ são funções de μ_{\max} (Li, 1995; Edwards, 1970).

$$\mu = \frac{\mu_{m(1)}}{(K_S + C_S)(1 + C_S/K_i)} \quad (2.9)$$

$$\mu = \frac{\mu_{m(2)} C_S (1 + C_S/K_i)}{K_S + C_S + C_S^2/K_i} \quad (2.10)$$

$$\mu = \frac{\mu_{m(3)} C_S}{K_S + C_S + \left(\frac{C_S^2}{K_i} \right) (1 + C_S/K_i)} \quad (2.11)$$

$$\mu = \frac{\mu_{m(4)} C_S \exp(-C_S/K_i)}{K_S + C_S} \quad (2.12)$$

$$\mu = \mu_{m(5)} (\exp(-C_S/K_i) - \exp(-C_S/K_S)) \quad (2.13)$$

Para uma modelagem realística do processo de fermentação deve ser incluída a inibição por substrato e por produto. Lee e Rogers (1983) propuseram a relação apresentada na Equação (2.14) e restrições (2.15) à (2.17), que combinam o efeito inibitório por substrato e por produto, além da limitação por substrato, em fermentações alcoólicas por *Z. mobilis*.

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{C_S}{K_S + C_S} \right) \left(1 - \frac{C_P - P_i}{P_m - P_i} \right) \left(\frac{K_i - S_i}{(K_i - S_i) - (C_S - S_i)} \right) \quad (2.14)$$

$$\frac{C_P - P_i}{P_m - P_i} = 0 \quad \text{Se } C_P \leq P_i \quad (2.15)$$

$$\frac{C_P - P_i}{P_m - P_i} = 1 \quad \text{Se } C_P > P_m \quad (2.16)$$

$$C_S - S_i = 0 \quad \text{Se } C_S \leq S_i \quad (2.17)$$

Um modelo mais abrangente para o efeito combinado de inibição por etanol e por substrato em fermentações de glicose pela bactéria *Z. mobilis* foi proposto por Veramallu e Agraval (1990). Os efeitos inibitórios causados por etanol e substrato foram identificados por análise cinética de fermentações em batelada com a linhagem ATCC 10988. Estes autores observaram inibição no crescimento para concentrações de glicose acima de 80 g/L. O crescimento foi ligeiramente inibido por etanol a uma concentração de 50 g/L e severamente inibido para concentrações acima desta, sendo o modelo proposto apresentado na Equação (2.18) e restrições (2.19) à (2.22).

$$\mu = \frac{\mu_{\max} C_S \left(\frac{C_S}{K_S + C_S} \right) \left(1 - \left(\frac{C_P}{P_{ma}} \right)^a \right) \left(1 - \left(\frac{C_P - P_{ob}}{P_{mb} - P_{ob}} \right)^b \right)}{K_S + C_S + \frac{C_S(C_S - S_i)}{K_i - S_i}} \quad (2.18)$$

$$\frac{C_P - P_{ob}}{P_{mb} - P_{ob}} = 0 \quad \text{Se } C_P \leq P_{ob} \quad (2.19)$$

$$\frac{C_P - P_{ob}}{P_{mb} - P_{ob}} = 1 \quad \text{Se } C_P > P_{mb} \quad (2.20)$$

$$C_S - S_i = 0 \quad (2.21)$$

Se $C_S \leq S_i$

A intensidade de inibição na produção de etanol é muito menor que no crescimento celular em fermentações por *Z. mobilis*, sendo chamado de “desacoplamento entre produção de etanol e crescimento celular”, nos quais as velocidades específicas de consumo de glicose e de produção de etanol permanecem inalteradas com a diminuição da taxa de crescimento específica (Rogers *et al.*, 1982). Lee e Rogers (1983) propuseram uma relação para inibição da taxa específica de produção de etanol (Q_P) por produto e substrato, apresentada na Equação (2.22) e as restrições (2.23) e (2.24).

$$Q_P = Q_{P,\max} \left(\frac{C_S}{K'_S + C_S} \right) \left(1 - \frac{C_P - P'_i}{P'_m - P'_i} \right) \left(\frac{K'_i}{K'_i - S_i} \right) \quad (2.22)$$

$$\frac{C_P - P'_i}{P'_m - P'_i} = 0 \quad (2.23)$$

Se $C_P \leq P'_i$

$$\frac{C_P - P'_i}{P'_m - P'_i} = 1 \quad (2.24)$$

Se $C_P > P'_m$

Além desta, outra relação para a taxa de produção de etanol foi apresentada, Equação (2.25), e adotada por Lee e Rogers (1983), Luong (1985) e Li *et al.* (1995). Nesta também é verificada a influência de inibição por substrato e por etanol.

$$Q_P = Q_{P,\max'} \left(\frac{C_S}{K_{mp} + C_S} \right) \left(1 - \left(\frac{C_P}{P_{me}} \right)^a \right) \quad (2.25)$$

2.3.1.1 Modelo de Jöbses *et al.* (1986)

Em processos fermentativos, a biomassa atua como biocatalisador para a conversão do substrato em produtos. Além disso, é sintetizado durante o processo, o que caracteriza um exemplo de autocatálise. Diversos modelos têm sido propostos para descrever comportamentos oscilatórios da *Z. mobilis* como mencionado anteriormente. O modelo de Jöbses *et al.* (1986) é um modelo não-segregado e não-estruturado. Nas equações apresentadas C_i representa a concentração mássica do componente i e r_i sua taxa de conversão. Os subíndices S , e , X e P referem-se ao substrato, ao componente chave e , a biomassa e ao produto, respectivamente.

A Equação (2.26) é um modelo largamente utilizado em modelagem de processos fermentativos e descreve o consumo de substrato pelos microrganismos. É uma equação linear que considera que parte do substrato consumido tem finalidade de manutenção da vida dos

microrganismos e parte utiliza o substrato para a produção de biomassa nova. Assim, Y_{Sx} é o fator de rendimento da conversão de substrato em biomassa, m_S é um fator de manutenção (Jöbses *et al.*, 1985), onde o primeiro termo considera a taxa de crescimento e o segundo a conservação microbiana. A taxa de crescimento da biomassa é normalmente expressa por (2.27).

$$r_S = \left(\frac{1}{Y_{Sx}} \right) r_x + m_S C_x \quad (2.26)$$

$$r_x = \mu C_x \quad (2.27)$$

A relação entre a concentração de substrato e a taxa de crescimento específico é dada pela equação de Monod (2.1), onde K_S é a constante de Monod e μ_{max} é a taxa específica de crescimento máxima.

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{C_S}{K_S + C_S} \right) \quad (2.1)$$

Jöbses *et al.* (1986) sugerem um modelo não-estruturado baseado na introdução de um componente chave e de biomassa que torna a inibição por produto um efeito de influência indireta na fermentação. Mais precisamente o modelo considera que o etanol causa alterações na taxa de crescimento específica máxima μ_{max} . A resposta da taxa de crescimento específica máxima em relação a mudanças em C_P pode ser percebida ao longo de até 30 horas para *Z. mobilis*. Assim, supondo que μ_{max} é proporcional a um componente chave interno e , com atividade expressa em termos de concentração, a taxa de formação desse componente é inibida pela concentração de etanol que conseqüentemente está influenciando μ_{max} . A Equação (2.28) representa a taxa de formação de e , que leva em consideração a concentração de substrato, produto e do próprio componente chave e .

$$r_e = f(C_S) f(C_P) C_e \quad (2.28)$$

A função $f(C_S)$ é dada pela relação de Monod (2.1) e $f(C_P)$ é um polinômio de grau dois, proveniente de dados experimentais, onde os termos c_1 e c_2 são constantes empíricas. Assim, a inibição por produto afeta de forma indireta a fermentação.

$$f(C_P) = (C_P - c_1)(C_P - c_2) \quad (2.29)$$

O componente e pode ser expresso como uma fração da biomassa x como pode ser visto na Equação (2.30).

$$E = \frac{C_e}{C_x} \quad (2.30)$$

O modelo dinâmico de Jöbses *et al.* (1986) é um modelo de quatro estados constituído pelas equações de balanço material (2.31) a (2.34), com os seguintes componentes: substrato (S), biomassa (x), produto (P) e o componente chave (e). Na Equação (2.34), Y_{Px} é o fator de rendimento de biomassa em produto, enquanto que m_P é um fator de manutenção baseado na formação de produto.

$$\frac{dC_S}{dt} = \left(-\frac{\mu_{\max}}{Y_{Sx}} \right) \left(\frac{C_S C_e}{K_S + C_S} \right) - m_S C_x + D(C_{S0} - C_S) \quad (2.31)$$

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu_{\max} \left(\frac{C_S C_e}{K_S + C_S} \right) + D(C_{x0} - C_x) \quad (2.32)$$

$$\frac{dC_e}{dt} = K_E (C_P - c_1)(C_P - c_2) \left(\frac{C_S C_e}{K_S + C_S} \right) + D(C_{e0} - C_e) \quad (2.33)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = \left(\frac{\mu_{\max}}{Y_{Px}} \right) \left(\frac{C_S C_e}{K_S + C_S} \right) + m_P C_x + D(C_{P0} - C_P) \quad (2.34)$$

A conversão de substrato e de produto, definidas respectivamente nas equações (2.35) e (2.36), auxiliam a avaliar o desempenho do fermentador em diferentes condições operacionais.

$$Y_S = \frac{(C_{S0} - C_S)}{C_{S0}} \quad (2.35)$$

$$Y_P = \frac{(C_P - C_{P0})}{C_{S0}} \quad (2.36)$$

Os valores dos parâmetros do modelo apresentados no trabalho de Jöbses *et al.* (1986) e utilizado por Elnashaine *et al.* (2006), Maheca-Botero *et al.* (2006), Garhyan e Elnashaine (2004) e Garhyan *et al.* (2003), podem ser visualizados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Parâmetros apresentados do modelo de Jöbses *et al.* (1986)

Parâmetro	Valor	Unidade
K_E – Constante de Monod	0,00383	$m^6 / kg^2 h$
C_{Po} – Concentração de produto alimentado	0	kg / m^3
C_{eo} – Concentração de produto chave alimentado	0	kg / m^3
C_{xo} – Concentração de biomassa alimentada	0	kg / m^3
K_S – Constante de Monod	0,5	kg / m^3
c_1 – Constante empírica	59,2085	kg / m^3
c_2 – Constante empírica	70,5565	kg / m^3
μ_{max} – Taxa máxima de crescimento	1	h^{-1}
m_S – Fator de manutenção baseado no consumo de substrato	2,16	kg / kgh
m_P – Fator de manutenção baseado na formação de produto	1,10	kg / kgh
Y_{Sx} – Fator de rendimento da conversão de substrato em biomassa	0,0244498	kg / kg
Y_{Px} – Fator de rendimento da conversão de biomassa em produto	0,0526315	kg / kg

2.3.1.2 Modelo de Ghommidh *et al.* (1989)

O modelo proposto por Ghommidh *et al.* (1989) trata-se de um melhoramento do modelo proposto por Jöbses *et al.* (1986). É um modelo não-segregado e estruturado, onde é feita a modelagem do processo de fermentação contínua empregando *Z. mobilis* e segregando a população de microrganismos em três grupos distintos. O primeiro grupo, indicado pelo subíndice v , é chamado de células viáveis, e representa o conjunto de células capazes de gerar energia e produtos através da degradação de substrato, além de serem aptas à reprodução. O segundo grupo, indicado pelo subíndice nv , é denominado de células não viáveis, representando o conjunto de células capazes de converter substrato em produto, mas incapazes de se reproduzir. O terceiro e último grupo, indicado pelo subíndice d , refere-se ao conjunto de células mortas, incapazes de fermentar e reproduzir.

O esquema proposto por Ghommidh *et al.* (1989) para o processo de fermentação, à partir da segregação assumida, considera que as células vivas degradam substrato em energia e produtos à uma taxa constante, independentemente de suas taxas de crescimento, e que em altas concentrações de etanol no meio ocorre a desnaturação da membrana celular resultando na perda de viabilidade e/ou morte das células. Este esquema é apresentado na Figura 2.1, composto por substrato (S), produto (P) e biomassa (x), fazendo distinção entre os grupos segregados de biomassa, indicados pelos subíndices v , nv e d , respectivamente, células viáveis, células não viáveis e células mortas. A

variável μ refere-se à taxa específica de crescimento e a variável ν refere-se à taxa específica média de fermentação.

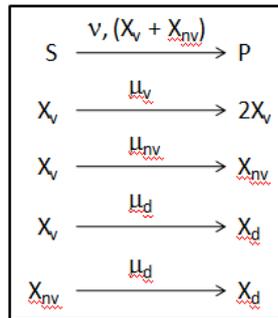


Figura 2.1: Esquema proposto por Ghommidh *et al.* (1989) para a fermentação alcoólica de *Z. mobilis* em regime contínuo. *Fonte: Ghommidh et al., 1989.*

O modelo dinâmico de Ghommidh *et al.* (1989) é um modelo de quatro estados constituído pelas equações de balanço material (2.37) a (2.40), com os seguintes componentes biomassa viável (xv), biomassa não viável (xnv), biomassa morta (xd) e produto (P).

$$\frac{dC_{xv}}{dt} = (\mu_v - \mu_d - D)C_{xv} \quad (2.37)$$

$$\frac{dC_{xd}}{dt} = \mu_d(C_{xv} + C_{xnv}) - DC_{xd} \quad (2.38)$$

$$\frac{dC_{xnv}}{dt} = \mu_{nv}C_{xv} - (\mu_d + D)C_{xnv} \quad (2.39)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = \mu_P(C_{xv} + C_{xnv}) - DC_P \quad (2.40)$$

Segundo Jarzebski (1992), a inexistência de um termo que indique a relação da concentração de células viáveis, com a taxa de crescimento específica de células não viáveis, não prejudica a representatividade do modelo. Além disto, para uma completa descrição do sistema, seria necessário inserir uma quinta equação ao modelo, referente ao balanço material de substrato.

A Equação (2.41) apresenta a taxa de crescimento específico, proposta segundo a suposição de que a inibição causada pelo etanol é responsável pela não viabilidade e posterior morte das células. A variável μ_{\max} indica a taxa de crescimento específico máxima, enquanto C_{PC} é uma constante que indica a concentração crítica de etanol no meio.

$$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{C_P}{C_{PC}} \right) \quad (2.41)$$

O valor da taxa de crescimento específico é nulo quando C_P é igual à C_{PC} indicando que possivelmente a célula perca gradativamente sua capacidade reprodutiva com o aumento de C_P .

Quando a concentração de etanol atinge valores próximos de C_{PC} , todas as células perdem a capacidade reprodutiva, tornando-se parte não viáveis e parte mortas. Desta forma, é assumido que para $C_P \leq C_{PC}$, $\mu_v = \mu$ e $\mu_d = 0$, enquanto que para $C_P > C_{PC}$, $\mu_v = 0$ e $\mu_d = -\mu$.

A Equação (2.42) apresenta a taxa específica de formação de células não viáveis. Nesta equação as variáveis μ'_{\max} e C'_{PC} são constantes, similares às presentes na Equação (2.41).

$$\mu_{nv} = \mu'_{\max} \left(1 - \frac{C_P}{C'_{PC}} \right) - \mu_v \quad (2.42)$$

A Equação (2.44) é composta por dois termos. O primeiro deles se relaciona á capacidade fermentativa da célula mesmo não se reproduzindo, pois, células não viáveis são incapazes de se reproduzir sendo entretanto, capazes de degradar substrato. Isto sugere que a capacidade fermentativa é mais resistente a concentrações de produto quando comparada à reprodutiva, visto que o valor de C'_{PC} é maior que o de C_{PC} . Como as células viáveis ao perder a capacidade reprodutiva, podem tornar-se células não viáveis ou mortas, o valor de μ'_{\max} é menor que o de μ_{\max} . A equação reflete a capacidade fermentativa residual da célula, em função da diferença entre a concentração de etanol no meio e a taxa de crescimento das células que apresentam capacidade reprodutiva.

Os valores dos parâmetros do modelo apresentados no trabalho de Ghommidh *et al.* (1989), obtidos através de resultados experimentais, podem ser visualizados na Tabela (2.2).

Tabela 2.2: Parâmetros do modelo de Ghommidh *et al.* (1989)

Parâmetro	Valor	Unidade
μ_{\max} – Taxa específica de formação máxima	0,42	h^{-1}
μ'_{\max} – Taxa específica de formação máxima	0,28	h^{-1}
C_{PC} – Concentração crítica de etanol no meio	75	g/l
C'_{PC} – Concentração crítica de etanol no meio	130	g/l
μ_P – Taxa específica de formação de etanol	162,2	$g/g.h$

2.3.1.3 Modelo de Jarzebski (1992)

Jarzebski (1992) baseou seus estudos no modelo proposto por Ghommidh *et al.* (1989), propondo algumas modificações. Afirma que, a hipótese de o fenômeno oscilatório ser explicado apenas pela inibição causada pelo etanol é muito simplificada. Suas afirmações são justificadas com base em trabalho publicado por Bruce *et al.* (1991), que relaciona o comportamento oscilatório com o efeito combinado de inibição pelo produto e substrato. O efeito combinado de inibições é explicado pela observação que até mesmo as mais elevadas concentrações de substrato residual, durante o período oscilatório, não são capazes de alcançar valores prejudiciais ao microrganismo, sugerindo que a inibição provocada pelo substrato pode ser dependente da causada pelo etanol, e vice versa, caracterizando o efeito inibitório combinado de substrato e produto. Bruce *et al.* (1991) observaram um forte amortecimento das oscilações quando foi reduzida a concentração de substrato residual, enquanto que a concentração de etanol atingiu um nível marcante, maior que os atingidos pelo sistema oscilatório.

Segundo Jarzebski (1992), apesar da existência de diferenças entre os diversos processos de fermentação alcoólica, uma característica comum, que não estava sendo considerada até então, é o fato de oscilações ocorrerem quando concentrações de substrato na corrente de alimentação, e por consequência de substrato residual no meio, são suficientemente elevadas (da ordem de 120 g/L), enquanto que, para valores de concentração de substrato mais baixos na corrente de alimentação, o sistema tende ao estado estacionário. Este comportamento é observado e descrito por Perego Jr *et al.* (1985), utilizando leveduras, por Mulchandani e Volesky (1986), utilizando *Clostridium*, e nos experimentos de Beaven *et al.* (1982), Jöbses *et al.* (1986) e Lee *et al.* (1979, 1980), utilizando *Z. mobilis*.

Baseado nestas constatações, Jarzebski (1992) incorporou ao modelo desenvolvido por Ghommidh *et al.* (1989) a hipótese de as oscilações dependerem do efeito combinado da inibição causada por substrato e produto.

O modelo dinâmico de Jarzebski (1992) é um modelo de cinco dimensões constituído pelas equações de balanço material (2.43) a (2.47), com os seguintes componentes: substrato (S), biomassa viável (xv), biomassa não viável (xnv), biomassa morta (xd) e produto (P). Na Equação (2.46), m_P é um fator de manutenção baseado na formação de produto e Y_{Px} é o fator de rendimento de biomassa em produto, enquanto na Equação (2.47), Y_{Sx} é o fator de rendimento de substrato em biomassa, enquanto que m_S é um fator de manutenção baseado no consumo de substrato.

$$\frac{dC_{xv}}{dt} = (\mu_v - \mu_{nv} - \mu_d - D)C_{xv} \quad (2.43)$$

$$\frac{dC_{xd}}{dt} = \mu_d(C_{xv} + C_{xnv}) - DC_{xd} \quad (2.44)$$

$$\frac{dC_{xnv}}{dt} = \mu_{nv}C_{xv} - (\mu_d + D)C_{xnv} \quad (2.45)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = \frac{\mu_v C_{xv}}{Y_{Px}} + m_P C_{xnv} - DC_P \quad (2.46)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = D(C_{So} - C_S) - \frac{\mu_v C_{xv}}{Y_{Sx}} - m_S C_{xnv} \quad (2.47)$$

Jarzebski (1992) completou as equações de balanço material introduzindo a equação referente ao balanço de massa para o substrato (Equação (2.47)), que leva em consideração o consumo de substrato para manter células não viáveis, bem como a variação da concentração de células viáveis. As equações para o cálculo das velocidades específicas de crescimento e formação de células não viáveis passaram por adaptações, incorporando a hipótese de efeito combinado de inibição por substrato e por produto.

A Equação (2.48) apresenta a taxa específica de crescimento das células viáveis. Nesta equação, as variáveis K indicam constantes, sendo K_{iS} a constante de inibição por substrato.

$$\mu_v = \mu_{\max} \frac{C_S}{K_1 + C_S + \frac{C_S}{K_{iS}}} \left(1 - \frac{C_P}{C_{Pc}} \right) \quad (2.48)$$

A velocidade específica de morte celular também passou por ajustes, resultando na Equação (2.49), válida no intervalo $C_P > C_{Pc}(K_2 + C_S)/C_S$.

$$\mu_d = -\mu_v \quad (2.49)$$

Partindo do mesmo raciocínio proposto por Ghommidh *et al.* (1989) e incorporando a hipótese do efeito combinado de inibição, a equação para a taxa específica de formação de células não viáveis é representada na Equação (2.50).

$$\mu_{nv} = \mu'_{\max} \frac{C_S}{K_1 + C_S} \left(1 - \frac{C_P}{C'_{PC}} \frac{C_S}{K_2 + C_S} \right) - \mu_v \quad (2.50)$$

Os valores dos parâmetros do modelo apresentados no trabalho de Jarzebski (1992) obtidos através de resultados experimentais de Perego Jr. *et al.* (1985), podem ser visualizados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3: Parâmetros do modelo de Jarzebski

Parâmetro	Valor	Unidade
μ_{\max} – Taxa específica de formação máxima	0,25	h^{-1}
μ'_{\max} – Taxa específica de formação máxima	0,21	h^{-1}
C_{PC} – Concentração crítica de etanol no meio	70	kg / m^3
C'_{PC} – Concentração crítica de etanol no meio	130	kg / m^3
K_1 – Constante empírica	3,0	kg / m^3
K_2 – Constante empírica	3,0	kg / m^3
m_S – Fator de manutenção baseado no consumo de substrato	4,42	kg / kgh
m_P – Fator de manutenção baseado na formação de produto	2,6	kg / kgh
Y_{Sx} – Fator de rendimento da conversão de biomassa em substrato	0,095	kg / kg
Y_{Px} – Fator de rendimento da conversão de biomassa em produto	0,235	kg / kg

2.3.1.4 Modelo de Daugulis *et al.* (1997)

Baseado nos trabalhos de Li *et al.* (1995) e Li (1996), Daugulis *et al.* (1997) desenvolveu o conceito de taxa de crescimento específica dinâmica. Esta taxa faz referência a situação em que a célula sofre uma taxa de crescimento menor ou igual a taxa de crescimento caracterizada pela condição de cultura instantânea, refletindo condições vivenciadas pelas células algum tempo no passado. Comprovações experimentais são fornecidas diretamente através da estimativa da taxa específica de crescimento dinâmica e comparada com a taxa instantânea de crescimento.

Li *et al.* (1995) mostra que o efeito de inibição causado pelo histórico de concentrações de etanol, pode ser considerado insignificante, enquanto que o efeito de inibição causado pela variação instantânea na concentração de etanol é muito mais significativo. Além deste fato, levando em consideração que as células são incapazes de responder instantaneamente as mudanças no meio, é proposto que existe um atraso entre o instante em que as células percebem a mudança do meio, e o instante em que ocorre a resposta metabólica destas células. O tempo de atraso do efeito de inibição

foi modelado como o efeito da média ponderada da taxa de variação da concentração de etanol (Z), definido através da Equação (2.51), onde o peso para o histórico da taxa de variação de concentração de etanol é definido na Equação (2.52), onde τ é o tempo no histórico e t é o tempo corrente.

$$C_Z(t) = \int_{-\infty}^t \frac{dC_P}{dt} \Big|_{\tau} \Psi_Z(\tau) d\tau \quad (2.51)$$

$$\Psi_Z(\tau) = \beta^2 (t - \tau) e^{-\beta(t-\tau)} \quad (2.52)$$

O máximo de $\Psi_Z(\tau)$ ocorre quando $\tau = t - 1/\beta$, indicando que a taxa de variação da concentração de etanol ocorrida $1/\beta$ horas atrás, é a que apresenta maior influência no desempenho atual da célula. O parâmetro β indica a magnitude do intervalo de tempo para o atraso do efeito inibitório.

Com isso é assumido que o crescimento das células, em um tempo t , é inibido quando a variável $C_Z(t)$ assume valores positivos, enquanto que para valores negativos ela não apresenta efeitos no crescimento celular. Com o objetivo de facilitar o processo de estimação de parâmetros, uma função hiperbólica contínua diferenciável, $f_{\mu}(C_Z(t))$ (Equação 2.53) é introduzida a fim de determinar aproximadamente o efeito de $C_Z(t)$ no crescimento celular.

$$f_{\mu}(C_Z(t)) = \frac{1}{2} \left(1 - \frac{e^{\lambda C_Z(t) - \delta} - e^{-\lambda C_Z(t) + \delta}}{e^{\lambda C_Z(t) - \delta} + e^{-\lambda C_Z(t) + \delta}} \right) \quad (2.53)$$

As variáveis λ e δ são parâmetros que indicam o fator de inibição causado por mudanças na concentração de etanol, e são determinados através de ajustes à dados experimentais. A função $f_{\mu}(C_Z(t))$ é denominada fator de inibição, e assume valores entre zero e um, para um intervalo de domínio variando entre menos e mais infinito. O fator de inibição é utilizado para definir a taxa dinâmica de crescimento específico $\mu(C_S(t), C_P(t), C_Z(t))$, relacionada com a taxa de crescimento específica convencional ou “instantânea” ($\mu(C_S(t), C_P(t))$) através da relação apresentada na Equação (2.54).

$$\mu(C_S(t), C_P(t), C_Z(t)) = \mu(C_S(t), C_P(t)) f_{\mu}(C_Z(t)) \quad (2.54)$$

A taxa instantânea específica de crescimento celular refere-se à representação tradicional ou clássica da taxa de crescimento específico, introduzida por Bailey e Ollis (1986) e Aiba *et al.* (1968). A taxa de crescimento celular específica instantânea é assim denominada, estritamente, no

sentido de depender das concentrações atuais de substrato e produto, enquanto que a taxa de crescimento dinâmica é proposta de forma a incluir o efeito inibitório do histórico de concentrações de etanol aos quais as células foram submetidas. A natureza dinâmica desta taxa de crescimento é devida à dependência de μ com C_Z , sendo associada à evolução histórica da concentração de etanol submetida às células.

Como f_μ varia entre zero e um, a taxa dinâmica de crescimento celular assume valores entre zero e $\mu(C_S(t), C_P(t))$. Quando a média ponderada da taxa de variação da concentração de etanol é negativa ou zero, implica em uma tendência de baixa sustentada na taxa de variação da concentração de etanol, ou então a uma tendência constante da concentração de etanol. A taxa de crescimento celular dinâmica irá apresentar um valor idêntico à taxa de crescimento celular específica. Ao ocorrer um aumento na taxa de variação da concentração de etanol ($C_Z(t) > 0$), a taxa dinâmica de crescimento irá atingir apenas uma fração da taxa instantânea específica de crescimento celular. A taxa de crescimento celular específica instantânea é modelada utilizando as concentrações de substrato e produto, apresentada por Veeramallu e Agrawal (1990), na forma da Equação (2.55), sendo que K_i é o parâmetro de inibição por substrato, K_S é o parâmetro de saturação de substrato, ambos para a taxa de crescimento específica, C_{Pma} é a inibição limitante por etanol para a taxa instantânea específica de crescimento, C_{Pmb} é o limite de inibição máximo por etanol para o crescimento celular, C_{Pob} é o limite de inibição por etanol para a taxa de crescimento específica, C_{Si} é o limite inferior para inibição por substrato para a taxa de crescimento específico, a e b representam parâmetros da taxa instantânea específica de crescimento e μ_{max} representa a taxa instantânea específica máxima de crescimento.

As condições apresentadas nas equações (2.56) à (2.58) devem ser satisfeitas, a fim de promover a correta modelagem do processo. A fim de simplificar a apresentação das fórmulas, as variáveis $C_P(t)$, $C_S(t)$, e $C_Z(t)$ serão substituídas por C_P , C_S e C_Z .

$$\mu(C_S, C_P) = \frac{\mu_{max} C_S \left(1 - \left(\frac{C_P}{C_{Pma}} \right)^a \right) \left(1 - \left(\frac{C_P - C_{Pob}}{C_{Pmb} - C_{Pob}} \right)^b \right)}{K_S + C_S + \frac{C_S(C_S - C_{Si})}{K_i - C_{Si}}} \quad (2.55)$$

$$\left(\frac{C_P - C_{Pob}}{C_{Pmb} - C_{Pob}} \right) = 0 \Rightarrow C_P \leq C_{Pob} \quad (2.56)$$

$$\left(\frac{C_P - C_{Pob}}{C_{Pmb} - C_{Pob}} \right) = 1 \Rightarrow C_P > C_{Pob} \quad (2.57)$$

$$C_S - C_{Si} = 0 \Rightarrow C_S \leq C_{Si} \quad (2.58)$$

A taxa de produção específica (Q_P) é modelada por Lee *et al.* (1983) e Luong (1985), sendo apresentada na Equação (2.59). Nesta equação, Q_{Pmax} representa a taxa de produção máxima específica de etanol, K_{mP} é o parâmetro de saturação por substrato para a produção de etanol, C_{Pme} é o limite máximo para a inibição da produção de etanol e α é o fator de inibição por etanol para a taxa de produção de etanol.

$$Q_P = Q_{Pmax} \frac{C_S}{K_{mP} C_S} \left(1 - \left(\frac{C_P}{C_{Pme}} \right)^\alpha \right) \quad (2.59)$$

O modelo dinâmico de Daugulis *et al.* (1997) é um modelo de quinta dimensão, constituído pelas equações de balanço material (2.60) a (2.64), com os seguintes componentes: substrato (S), biomassa (x), etanol (P), média ponderada de primeira ordem da taxa de variação da concentração de etanol (W) e média ponderada de segunda ordem da taxa de variação da concentração de etanol (Z). Na Equação (2.61), Y_{PS} é o fator de rendimento de conversão de substrato em produto.

$$\frac{dC_x}{dt} = (\mu(C_S, C_x, C_Z) - D - \sigma(t)D_e)C_x \quad (2.60)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = -\frac{1}{Y_{PS}} Q_P C_x + DC_{SF} - (\sigma(t)D_e + D)C_x \quad (2.61)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = Q_P C_x + \sigma(t)D_e C_{Pe} - (\sigma(t)D_e + D)C_P \quad (2.62)$$

$$\frac{dC_Z}{dt} = \beta(C_W - C_Z) \quad (2.63)$$

$$\frac{dC_W}{dt} = \beta(Q_P C_x + \sigma(t)D_e C_{Pe} - (\sigma(t)D_e + D)C_P - C_W) \quad (2.64)$$

As primeiras três equações do modelo ((2.62) a (2.64)) são obtidas através do balanço de massa, para cada componente no fermentador, enquanto que a Equação (2.66) é obtida da diferenciação, em relação a t , da equação de C_Z , onde C_W é uma variável intermediária que também é uma média ponderada prévia, da taxa de variação da concentração de etanol, com peso $\Psi_W(\tau)$. A definição de C_Z e $\Psi_Z(\tau)$ são apresentadas, respectivamente, nas equações (2.65) e (2.66).

$$C_Z(t) = \int_{-\infty}^t \frac{dC_P}{dt} \Big|_{\tau} \Psi_Z(\tau) d\tau \quad (2.65)$$

$$\Psi_Z(\tau) = \beta^2 (t - \tau) e^{-\beta(t-\tau)} \quad (2.66)$$

O modelo proposto por Daugulis et al. (1997) prevê a possível necessidade de inserir uma corrente de etanol no reator, com objetivos de controle, ou então para promover o aparecimento de oscilações forçadas. A variável $\sigma(t)$ indica se a adição de etanol está ativada ou não, assumindo valores zero ou um, enquanto que a variável D_e e C_{PE} indicam, respectivamente, a taxa de diluição e a concentração de etanol nesta corrente adicional.

Os valores dos parâmetros do modelo apresentados no trabalho de Daugulis et al. (1997), apresentados por Zhang e Henson (2001), podem ser visualizados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4: Parâmetros do modelo de Daugulis et al. (1997)

Parâmetro	Valor	Unidade
μ_{\max} – Taxa específica de formação máxima	0,41	h^{-1}
C_{Pob} – Limite de inibição por etanol para a taxa de crescimento específica	50	kg / m^3
C_{Pma} – Inibição por etanol para a taxa instantânea específica de crescimento	217	kg / m^3
C_{Pmb} – Limite de inibição máximo por etanol para o crescimento celular	108	kg / m^3
C_{Pme} – Limite máximo para a inibição da produção de etanol	127	kg / m^3
C_{Si} – Limite de inibição por substrato para a taxa de crescimento específico	80	kg / m^3
a – parâmetro da taxa instantânea específica de crescimento	0,3142	-
b – parâmetro da taxa instantânea específica de crescimento	1,415	-
α – Fator inibição por etanol para a taxa de produção de etanol	8,77	-
β – Fator de manutenção baseado na formação de produto	0,0366	-
δ – Fator de inibição causado por mudanças na concentração de etanol	0,8241	-
λ – Fator de inibição causado por mudanças na concentração de etanol	21,05	-
Q_{Pmax} – Taxa específica máxima de produção de etanol	2,613	h^{-1}
K_S – Parâmetro de saturação de substrato	0,5	kg / m^3
K_{mP} – Parâmetro de saturação por substrato para a produção de etanol	0,5	kg / m^3
K_i – Parâmetro de inibição por substrato	200	kg / m^3
Y_{PS} – Fator de rendimento da conversão de substrato em produto	0,495	kg / kg

2.3.2 Oscilação Sustentada

Determinados sistemas reacionais químicos e biológicos são conhecidos por apresentar, experimentalmente, comportamentos complexos conhecidos como oscilações espontâneas. Estas oscilações podem ser classificadas como amortecidas, quando sua amplitude diminui com o tempo, ou então sustentadas, caracterizada pela amplitude constante no tempo. Em processos fermentativos, o período de oscilação, que ocorre em determinadas condições operacionais, provoca uma redução na produção de etanol e um acúmulo de substrato, afetando negativamente o rendimento do processo. Com o objetivo de caracterizar este fenômeno no qual as células exibem uma velocidade de crescimento menor ou igual à velocidade correspondente em condições normais de cultura, foi proposto o conceito de crescimento específico dinâmico, apresentado nos itens seguintes (McLellan et al., 1999).

O surgimento de comportamentos oscilatórios em fermentações que operam em regime contínuo foi estudado através da utilização de diversos modelos e condições de operação (pontos operacionais e condições iniciais de fermentação). Dentre estes, encontram-se os modelos de Ghommidh *et al.* (1989) e Jarzebski (1992), que segregam a biomassa em células viáveis, não viáveis e mortas, além de se basear na hipótese do substrato ser convertido em energia a produto a uma velocidade constante pelas células vivas, independentemente da velocidade de crescimento e das altas concentrações de etanol.

Aliado à inibição causada por substrato e produto, deve-se considerar que as células não apresentam resposta instantânea às mudanças no meio. De acordo com Daugulis *et al.* (1997), este atraso na resposta metabólica dos microrganismos frente à distúrbios no meio, juntamente com a inibição por substrato e produtos, torna o mecanismo de fermentação alcoólica complexo. Com base nestas afirmações, Daugulis *et al.* (1997) propuseram um modelo não-segregado e não-estruturado, validado por McLellan *et al.* (1999), que propõe uma aproximação macroscópica incorporando o conceito de taxa de crescimento específica dinâmica, capaz de considerar o histórico recente de inibições do processo.

Em geral é difícil, experimentalmente, obter um conhecimento mecanístico a respeito do metabolismo celular, visando o desenvolvimento de um modelo estruturado realista, capaz de descrever tais oscilações no processo de fermentação. Entretanto, Lee e Huang (2000) propuseram um modelo estruturado, baseado em análises metabólicas e dados experimentais, para misturas de glicose e frutose.

2.4 Características dos Principais Modelos

Devido ao número de modelos propostos para fermentações contínuas de glicose com a bactéria *Z. mobilis*, é necessário determinar características semelhantes e divergentes de cada um destes modelos. Inicialmente foi feita uma comparação direta entre as características estruturais de cada um dos modelos, sendo o resultado apresentado na forma da Tabela 2.5. Nesta tabela são apresentadas de forma resumida as características estruturais mais significativas e necessárias para o entendimento da lógica por trás da modelagem proposta por cada um dos autores.

Tabela 2.5: Resumo das características dos modelos para fermentações com *Z. mobilis*

	Jöbses	Ghommidh	Jarzebski	Daugulis
Ano	1986	1989	1992	1997
Numero de Estados	4	4	5	5
Estados	C_S, C_P	C_{xv}, C_{xd}	C_{xv}, C_{xd}	C_S, C_P
	C_x, C_e	C_{xmv}, C_P	C_{xmv}, C_P	C_x, C_Z
			C_S	C_W
Número de Parâmetros	9	5	10	17
Segregado	Não	Não	Não	Sim
Estruturado	Não	Sim	Sim	Não

Com os dados obtidos através da Tabela 2.5, associados à simulações dinâmicas, análises de bifurcação e mapeamento de singularidades, o modelo de Jöbses foi escolhido como sendo o modelo que apresentava de forma mais apropriada o comportamento da bactéria *Z. mobilis* em fermentações contínuas de glicose. Trabalhos prévios (Diehl, 2009) já haviam feito uso da estrutura deste modelo para análise de controlabilidade de fermentadores contínuos, sendo feitas propostas de estratégias de controle diferenciadas capazes de operar o sistema em diferentes regiões de equilíbrio. Este modelo apresenta as duas principais características associadas a fermentações com esta bactéria, que são a multiplicidade de equilíbrios e aparecimento de oscilações sustentadas para baixos valores de taxa de diluição (Diehl, 2009). Apesar deste modelo não ser capaz de prever inibições de crescimento por concentração de substrato, a estrutura geral do modelo parece ser apropriada para a utilização em modelagem e controle de processos.

Os modelos de Jarzebski e Ghommidh foram descartados devido à impossibilidade de quantificação física de suas variáveis de estado, além do fato que estes modelos apresentaram comportamento insatisfatório quando analisados frente a simulações dinâmicas.

O modelo de Daugulis apresentou viabilidades para estudo, entretanto, este modelo não apresenta multiplicidade de equilíbrios, apenas ciclos limite são associados a este modelo. Outro fato importante é que o modelo apresenta descontinuidade para intervalos de C_P , que implicariam na necessidade de propor modificações na estrutura do modelo, para poder ser utilizado em sistemas de controle (Neto, 2006).

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1 Instalações

O trabalho experimental foi realizado através da parceria entre o Laboratório de Bioprocessos do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul (IB/UCS) e o Laboratório de Controle e Intensificação de Processos do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (LACIP/Dequi/UFRGS).

3.2 Microrganismo

A linhagem bacteriana usada neste estudo foi *Z. mobilis* ATCC 29191, escolhida devido a apresentar elevada tolerância a concentrações de etanol, quando comparada a outras linhagens (Lemmel *et al.*, 1992).

As culturas foram mantidas em meio líquido (Malvessi, 2008), repicadas mensalmente e estocadas a 4 °C.

3.3 Meios de cultivo

O meio líquido utilizado para a ativação e conservação das culturas, preparo de inóculo e na fermentação, seja no regime batelada ou contínuo, apresentam a mesma composição, sendo esta apresentada na Tabela 1.

Tabela 3.1: Composição dos meios de cultura

Componente	Composição [g/L]
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,00
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
KH ₂ PO ₄	3,50
Prodex Lac [®]	7,50

O Prodex Lac[®] é um extrato de levedura bruto comercial produzido pela empresa Prodesa S. A., Brasil, e utilizado como fonte de nitrogênio orgânico.

A diferença entre os meios de cultura está na concentração de glicose empregada na composição do meio, sendo apresentado na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Concentração de glicose dos meios de cultura

Meio de Cultura	Concentração de Glicose [g/L]
Ativação e Conservação	20
Inóculo	100
Fermentação Batelada	50
Fermentação Contínua	150 à 200

Na preparação do meio de ativação e conservação também foi adicionado 5 g/L de CaCO_3 com o objetivo de tamponar o pH do meio em 5,5.

Para os cultivos em biorreator, foi preparada uma solução concentrada de glicose (500 g/L), sendo adicionado ao meio o volume necessário desta solução para atingir-se a concentração desejada em cada meio. A esterilização dos meios, bem como da solução de glicose, foi feita em autoclave, a 1 atm por 15 minutos.

3.4 Preparo de inóculo

A ativação de culturas foi feita adicionando-se 2 mL de suspensão bacteriana em estoque a um tubo de tampa rosqueada contendo 18 mL de meio de ativação/conservação. Os tubos foram incubados em estufa a 30°C por 12 horas. Para a produção do inóculo, foram usados frascos anaeróbios de 500 mL, contendo 450 mL de meio total. Os meios foram inoculados com 45 mL de cultura previamente ativada e mantidos sob agitação orbital de 200 rpm (Certoamt U/H – B. Braun Biotech, RFA), a 30°C. Nos frascos de incubação, foram instalados filtros de algodão hidrófobo esterilizados, que permitiam a liberação de CO_2 produzido durante o processo, mantendo assim constante a pressão interna do frasco. A Figura 3.1 apresenta um fluxograma do processo de preparo de inóculo.

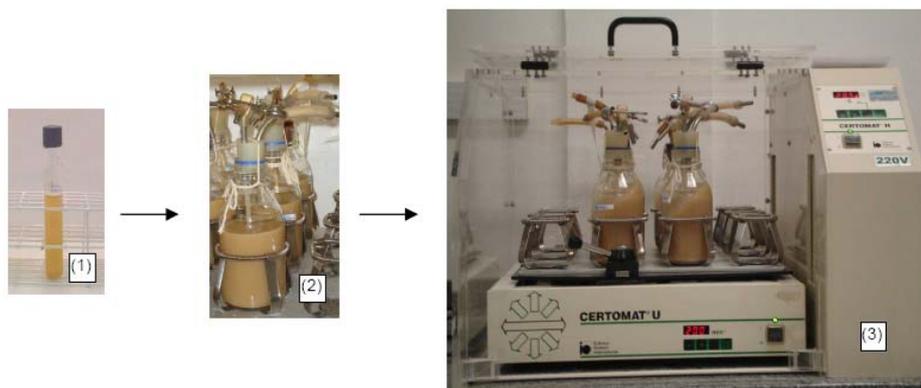


Figura 3.1: Obtenção de inóculo de *Z. mobilis* em frascos agitados: (1) cultura de *Z. mobilis* previamente ativada; (2, 3) frascos inoculados, mantidos sob condições de crescimento.

Em testes previamente realizados no laboratório, determinou-se o período de dez horas de incubação dos inóculos, permitindo que as células ainda estivessem na fase exponencial de crescimento no momento da inoculação no biorreator.

3.5 Cultivo de *Z. mobilis* em biorreator de bancada

O sistema de fermentação foi projetado para operar em regime contínuo de alimentação e retirada de produtos. Nas primeiras horas de fermentação, o processo operou em regime descontínuo, sendo o regime contínuo iniciado quando a concentração de açúcar redutor medida no biorreator atingiu valores entre 20 e 50% do valor inicial. A concentração de glicose na fermentação em batelada foi próximo de 50 g/L diminuindo continuamente até o momento em que foi iniciada a alimentação contínua com meio reacional contendo glicose (concentração entre 150 e 200 g/L). Maiores detalhes referentes aos ensaios fermentativos serão oportunamente apresentados no Capítulo 4. A Figura 3.2 apresenta o diagrama da condução do processo de fermentações em laboratório.

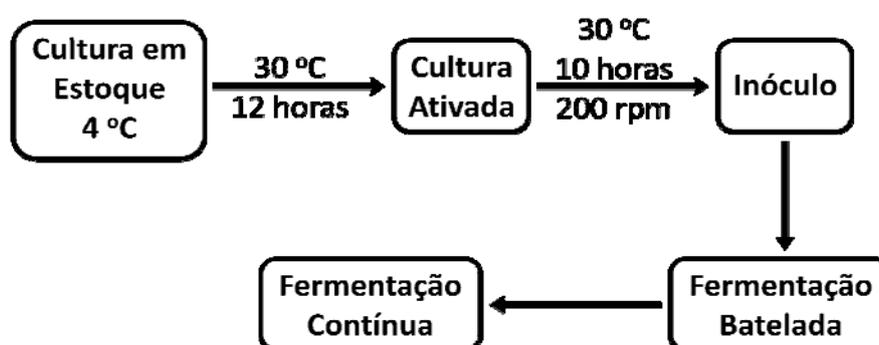


Figura 3.2: Diagrama das etapas para realização de fermentações em regime contínuo com a bactéria *Z. mobilis*.

Os cultivos de *Z. mobilis* em regime contínuo foram realizados em biorreator de bancada, com volume total de 0,7 L e volume útil de 0,5 L. O reator é composto por uma cuba de vidro encamisada e uma tampa de nylon usinada, com 1 cm de espessura. A tampa possui 7 orifícios nos quais são inseridos uma sonda de pH, um termômetro digital e tubulações para inserção de hidróxido de sódio, adição de meio de alimentação, adição e retirada de meio reacional para recirculação e saída de gases efluentes produzidos durante o processo de fermentação acoplado a um condensador. A retirada de produtos foi feita através de uma tubulação em forma de cachimbo, localizada na lateral da cuba de vidro.

Neste sistema, a temperatura foi controlada através da circulação de água, de um banho termostático, que passa através da camisa do reator, sendo monitorado pelo termômetro acoplado na tampa do biorreator. O sistema de agitação é do tipo magnético, sendo o reator apoiado em uma plataforma de agitação magnética possuindo uma barra magnética depositada em seu interior. Os gases efluentes passam por um condensador de serpentina, ligado a um banho com água a 10°C, com o objetivo de reduzir perdas de água e etanol por evaporação.

A cuba foi esterilizada em autoclave, juntamente com os meios de cultivo. Após o resfriamento dos mesmos, os meios foram adicionados à cuba, seguidos do inóculo e vedação do biorreator, sendo todo processo realizado em capela de fluxo.

O processo de fermentação foi conduzido na temperatura de 30 °C e o pH controlado em 5,5 através da adição de hidróxido de sódio (NaOH) 2 M. A adição do hidróxido de sódio estava associada ao controlador de pH. Neste processo fermentativo, o meio possui tendência a acidificação, de forma que o controlador de pH controlava o acionamento de uma bomba peristáltica conectada ao reator e ao reservatório de hidróxido de sódio. O reservatório de hidróxido possuía graduação, de forma que durante a coleta de amostras, era feita a leitura do volume de hidróxido adicionado ao meio fermentativo.

Durante os primeiros 20 minutos de fermentação, nitrogênio gasoso foi borbulhado no meio de cultivo, à vazão de 0,5 L/min, com a finalidade de garantir a anaerobiose. Após, a anaerobiose foi proporcionada pelo CO₂ produzido pelo próprio microrganismo. Amostras foram coletadas periodicamente através do circuito de recirculação de meio, impelido por uma bomba peristáltica.

Toda amostra coletada foi utilizada para quantificação da concentração de células suspensas, sendo posteriormente submetidas ao processo de centrifugação (Centrífuga Sigma 4K - 15), a 10000 rpm, por 10 minutos, para separar o sobrenadante das células. O sobrenadante ainda foi submetido ao processo de microfiltração com membranas de acetato com 1 cm de diâmetro e tamanho médio de poros de 0,45 µm.

A Figura 3.3 mostra o sistema de bancada utilizado para realizações de fermentações contínuas de glicose com a bactéria *Z. mobilis*.

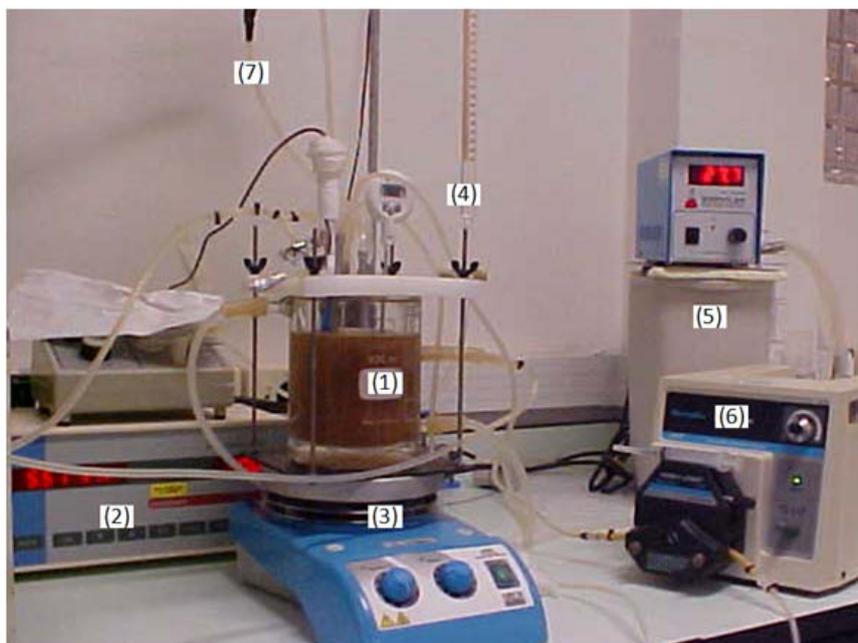


Figura 3.3: Sistema utilizado para realização de ensaios fermentativos, (1) cuba encamisada de fermentação; (2) controlador de pH; (3) sistema de agitação magnética; (4) reservatório de hidróxido de sódio; (5) banho termostatizado; (6) bomba peristáltica de recirculação; (7) entrada condensador.

3.6 Métodos Analíticos

3.6.1 Coleta e preparo de amostras

A amostragem durante o período da batelada foi feita a cada hora, enquanto durante o período contínuo foi feita em intervalos de 2 à 5 horas.

As amostras do cultivo em biorreator foram tomadas periodicamente para dosagens de açúcares redutores, concentração celular e etanol. Amostras não centrifugadas foram utilizadas para dosagem de biomassa, amostras centrifugadas foram utilizadas na dosagem de açúcares redutores, e amostras centrifugadas e filtradas, armazenadas sob refrigeração à 4 °C foram utilizadas para dosagem de etanol.

3.6.2 Concentração celular

O método utilizado para a determinação da concentração celular é baseado na lei de Beer-Lambert, que estipula que a concentração de substâncias pode ser quantificada por medida de densidade ótica, desde que a absorvância seja proporcional à concentração da substância absorvente (Franden; Pienkos e Zhang, 2009). Desta forma, a concentração celular foi determinada pela medida da absorvância de suspensões previamente diluídas de meio de fermentação, a 560 nm, e sua conversão em concentração, massa de matéria seca por unidade de volume, através de uma reta de calibração. As medições eram realizadas em espectrofotômetro (Aurora Instruments UV-210).

A reta de calibração foi obtida através dos seguintes passos:

- 10 mL de uma cultura de *Z. mobilis*, realizada em reator batelada, foi retirada no final do cultivo, sendo esta filtrada através de membranas de porosidade 0,2 µm, sendo a massa retida lavada várias vezes com água destilada;

- a massa úmida foi levada a estufa para secagem a 90-95°C por 24 horas, sendo, posteriormente, transferidas para o vaso dessecador, contendo cristais de sílica, mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos para o resfriamento, seguido de determinação da massa celular em balança analítica;

- conhecendo-se o volume e a massa de células - obtidas pela subtração do peso da membrana sem células pelo peso das membranas contendo células - determinou-se a concentração celular da cultura;

- paralelamente, uma alíquota da suspensão celular original foi diluída com água destilada de forma a obter-se uma suspensão com leitura de absorvância de cerca de 0,500 (a 560 nm);

- a partir desta diluição inicial, foram preparadas diluições de 1:10; 2:10; 3:10...ate 9:10, e com as medidas de absorvâncias das diferentes diluições e da concentração celular da cultura, construiu-se a reta de calibração.

Os valores foram convertidos em concentração celular, gramas de matéria seca por litro, através de uma equação de reta relacionando a absorvância da suspensão celular em função da concentração celular. Este procedimento foi repetido em diferentes cultivos, não sendo constatadas diferenças significativas entre os experimentos.

3.6.3 Determinação de açúcares redutores

Aliquotas de amostras dos diferentes cultivos de *Z. mobilis*, com aproximadamente 2 mL, são centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante utilizado para a dosagem de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-di-nitro-salicílico – DNS (Miller, 1959), utilizando curva padrão de glicose.

3.6.4 Concentração de etanol

As concentrações de etanol foram quantizadas após o término de cada fermentação. As amostras centrifugadas e armazenadas à 4 °C foram submetidas a análise cromatográfica gasosa, em equipamento da marca Turbochrom, modelo MHT3945. O gás de arraste utilizado foi nitrogênio, com vazão de 40 mL/min. A quantidade de amostra injetada foi de 1 microlitro, com *split* de 50. A temperatura utilizada na câmara de injeção e no forno foi mantida constante em 120 °C e a temperatura do detector era de 250 °C. Análises iniciais foram feitas para determinar o tempo necessário para ser detectado o pico de etanol, sendo este tempo estimado em 2,25 minutos, o que possibilitou a utilização de tempo de corrida de 5 minutos. Curvas padrão de concentração de etanol versus área de pico da cromatografia foram construídas para o cálculo da concentração de etanol em cada amostra.

Capítulo 4

Estimação de Parâmetros para o modelo de Jöbses

4.1 *Identificação de Processos*

Processo é definido como a atividade principal de uma unidade de produção onde, através de atividades secundárias, a matéria-prima é convertida em algum determinado produto. Desta forma, um processo pode ser compreendido como a seqüência de passos, tarefas e atividades necessárias à conversão de matéria-prima em produto.

Em engenharia química e bioquímica, os processos estão fundamentados em fenômenos de transferência de massa, calor, movimento e reações químicas e bioquímicas, aquelas que necessitam de um agente biológico para promover reações de oxidação e redução, convertendo substratos em produtos. Desta forma, em decorrência de entradas (u) ocorrem tais fenômenos resultando em um ou mais estados. Processos deste tipo possuem saídas (y) que são diretamente ou indiretamente relacionadas com os estados resultantes (x) e é através das medições das saídas que é possível obter inferências a respeito dos estados (Bequette, 1998).

Todo o processo de construção de um modelo (experimentações e hipóteses) visa a definição de duas entidades básicas distintas: a estrutura do modelo e os parâmetros. A estrutura do modelo é a forma funcional através da qual as diversas variáveis do problema estão relacionadas. Os parâmetros do modelo são os números que tornam possível a previsão quantitativa das relações existentes entre as várias variáveis do problema.

Quando o desafio consiste na determinação da estrutura do modelo bem como a estimativa dos parâmetros, se está diante de um problema de identificação do modelo.

Na literatura são comumente encontradas duas técnicas clássicas de identificação de modelos: caixa branca e caixa preta. Modelos caixa branca são modelos teóricos, enquanto modelos caixa preta são modelos empíricos (Bohlin, 2007).

4.1.1 *Estimativa de Parâmetros*

A metodologia para estimar parâmetros consiste em determinar o conjunto de números que melhor representa a realidade de um dado processo ao serem inseridos em um dado modelo. Isto significa dizer que é assumido a existência de θ^* , vetor dos parâmetros que melhor representa a realidade. Desta forma, o objetivo resume-se em obter um θ o mais próximo de θ^* , sendo o resultado a estimativa $\hat{\theta}$, sendo $E\{\hat{\theta}\} = \theta^*$.

Na literatura são encontradas diversas técnicas para a obtenção de $\hat{\theta}$, sendo todas baseadas na função erro: $e(\theta)$, seja de forma direta ou indireta (como nos casos em que a derivada é avaliada). Uma das formas como o erro pode ser definido é apresentada pela Equação (4.1).

$$e = \underbrace{y^{\text{medido}}}_y - \underbrace{y^{\text{estimado}}}_g = y - g(x; \theta) \quad (4.1)$$

Partindo da fórmula do erro apresentada anteriormente, a estimativa de parâmetros pode ser feita através de diversas técnicas, sendo as mais comuns as de mínimos quadrados e a de máxima verossimilhança. Além destas, existe o método de minimização da derivada do erro. O método da minimização da derivada do erro, proposto por Machado e Trierweiler (2004), e implementado por Schweinberger (2009), trata-se da minimização do somatório da derivada do erro ao quadrado. Os autores demonstram que o método apresentado pela Equação (4.2) produz melhores resultados do que os obtidos minimizando apenas o erro. Em outras palavras, através da Equação (4.2) se obtêm um melhor acompanhamento do perfil de comportamento da planta avaliada, mesmo quando esta sofre com distúrbios não medidos, sendo este resultado atribuído ao fato de que seguir a tendência do processo é melhor do que tentar representar todos os pontos experimentais. Nesta equação ne representa o número de experimentos realizados, enquanto que ny representa o número de pontos em cada experimento.

$$\min_{\theta} J(\theta) = \min_{\theta} \sum_{i=1}^{ne} \sum_{j=1}^{ny} \left(\frac{de_{ij}}{dt} \right)^2 \quad (4.2)$$

Desde que distúrbios não medidos estão sempre presentes em processos reais, formular uma função objetivo considerando o termo de/dt consiste em uma interessante alternativa. Esta alternativa apresentará bons resultados apenas para casos em que a variação provocada pelo distúrbio não medido é mais lenta que as variações provocadas pelas variáveis manipuladas.

Uma revisão mais detalhada acerca do processo de estimabilidade de parâmetros, ajuste de parâmetros, validação de modelos e qualidade de parâmetros obtidos é apresentada no Apêndice A. Neste são feitas considerações mais aprofundadas referentes a este tipo de procedimento, bem como às técnicas empregadas atualmente.

4.2 Resultados experimentais

Fermentações em bancada foram realizadas a fim de obterem-se dados experimentais passíveis de serem utilizados no processo de estimativa de parâmetros. O modelo, quando alimentado com o conjunto de parâmetros estimados a partir dos dados experimentais, tem a capacidade de prever o comportamento para o sistema específico utilizado.

Duas fermentações foram realizadas, ambas realizadas de acordo com a metodologia apresentada no capítulo três. O procedimento adotado durante cada processo fermentativo é descrito a seguir.

4.2.1 Fermentação 1

O processo fermentativo 1 teve início com as concentrações apresentadas na Tabela 4.1. O processo foi inicialmente operado em regime batelada por um período de 5 horas, quando a alimentação de substrato, em modo contínuo, foi iniciada. A corrente de alimentação solução de glicose de 200 g/L e taxa de diluição igual à $0,05978 \text{ h}^{-1}$. O valor de $C_e(0)$ é obtido através da Equação 2.31, onde o valor de E é assumido constante e igual a 5, obtido através de simulações dinâmicas do modelo original de Jöbses.

Tabela 4.1: Condições iniciais da Fermentação 1

Estados	Valor
$C_s(0)$	47,2 g/L
$C_x(0)$	0,66 g/L
$C_p(0)$	11,91 g/L
$C_e(0)$	3,302 g/L

Às 25,17 horas do início do processo foi impresso no sistema um distúrbio. Este distúrbio consiste da adição de uma corrente de etanol com concentração igual a 790 g/L e fator de diluição de $0,05978 \text{ h}^{-1}$, com o objetivo de causar uma perturbação no sistema reacional e gerar comportamento oscilatório. Esta injeção de etanol perdurou por uma hora. Após este distúrbio, o acompanhamento do sistema foi mantido em intervalos irregulares de aproximadamente 4 horas. A Tabela 4.2 apresenta o comportamento das variáveis de entrada nos momentos onde ocorreram

mudanças significativas no processo e na Figura 4.1 é demonstrado o comportamento das variáveis C_{So} , C_{Po} e D ao longo do período de fermentação. O cultivo foi encerrado com 98 horas de fermentação.

Tabela 4.2: Valores assumidos pelas variáveis de entrada em momentos característicos da Fermentação 1.

Variáveis \ Tempo [h]	Tempo [h]			
	0,0	5,0	25,17	26,17
C_{So} [g/L]	0,0	200,0	100,0	200,0
C_{xo} [g/L]	0,0	0,0	0,0	0,0
C_{Po} [g/L]	0,0	0,0	395,0	0,0
C_{eo} [g/L]	0,0	0,0	0,0	0,0
D [h^{-1}]	0,0	0,05798	0,11596	0,05798

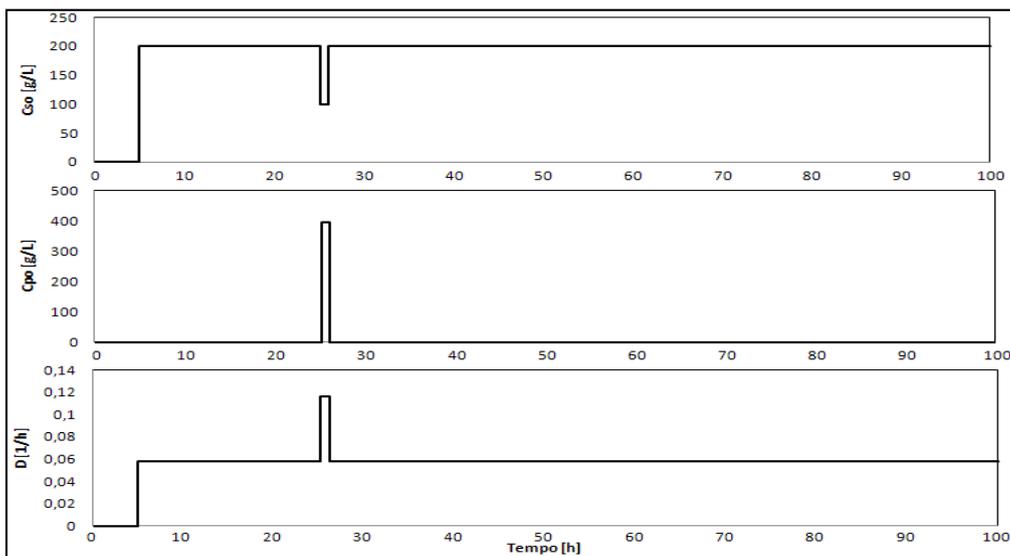


Figura 4.1: Comportamento das correntes C_{So} , C_{Po} e D ao longo da fermentação, as variáveis C_{xo} e C_{eo} não são mostradas por não apresentarem variações.

A Figura 4.2 apresenta a variação da concentração de substrato (açúcar redutor) e produto (etanol) com o tempo para a Fermentação 1. Na Figura 4.3 é apresentada a concentração de biomassa (concentração celular) desta fermentação ao longo do tempo. Em ambas as figuras, as retas 1 e 2 representam respectivamente, os instantes onde foi iniciado o processo contínuo e a adição de etanol.

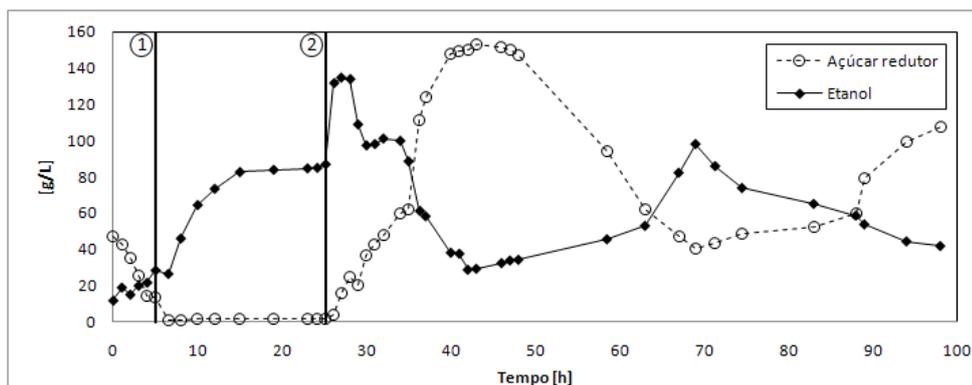


Figura 4.2: Fermentação 1, concentrações de substrato e etanol ao longo do tempo de fermentação. As retas 1 e 2 representam, respectivamente, os instantes de início do processo contínuo e adição de etanol.

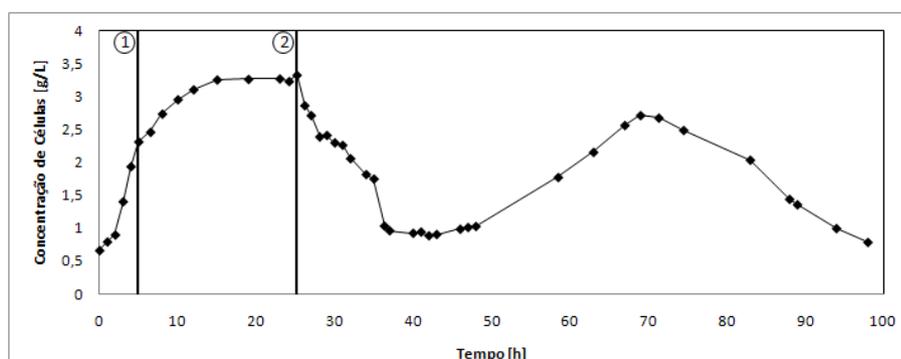


Figura 4.3: Fermentação 1, concentração celular ao longo do tempo de fermentação. As retas 1 e 2 representam, respectivamente, os instantes de início do processo contínuo e adição de etanol.

Através das figuras acima é possível perceber claramente os comportamentos característicos do crescimento bacteriano. Do tempo zero até o início da alimentação contínua (instante 1), a bactéria apresenta o comportamento de fermentações em batelada. Quando a alimentação contínua foi iniciada, o sistema apresentou um período com comportamento dinâmico, mas estabiliza em um estado dito estacionário, onde as concentrações de todos os estados ficam constantes no tempo. No momento da adição de etanol (instante 2), o sistema entra novamente em um regime transitório observando-se claramente a oscilação nos valores dos estados, característica marcante do gênero *Z. mobilis*. Entretanto, nas condições testadas não foi possível afirmar o tipo de oscilação apresentado, se estável ou amortecida, devido à fermentação ter sido interrompida em 98 horas de processo.

A Figura 4.4 apresenta o consumo cumulativo de hidróxido de sódio 5 M, utilizado para manter o pH do meio reacional estável.

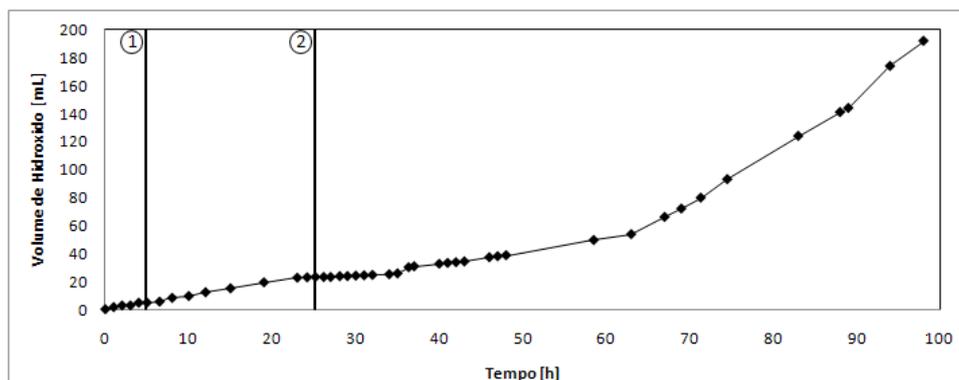


Figura 4.4: Fermentação 1, consumo cumulativo de hidróxido de sódio 5 M para controle do pH do meio reacional. As retas 1 e 2 representam, respectivamente, os instantes de início do processo contínuo e adição de etanol.

4.2.2 Fermentação 2

O processo fermentativo 2, foi iniciado com concentração de substrato na ordem de 40 g/L para a operação em regime descontinuo. A Tabela 4.3 apresenta os valores das variáveis de estado no início do processo. A corrente de alimentação possuía concentração de glicose igual a 150 g/L e fator de diluição igual a $0,07971 \text{ h}^{-1}$. Neste processo, o período compreendido entre o início do processo contínuo e a geração do distúrbio foi de aproximadamente 50h, de forma a propiciar a determinação clara do regime estacionário alcançado pelo sistema.

Tabela 4.3: Condições iniciais da Fermentação 2.

Estados	Valor
$C_S(0)$	41,1 g/L
$C_x(0)$	0,603 g/L
$C_P(0)$	6,55 g/L
$C_e(0)$	3,015 g/L

Às 53 horas do início do processo, foi provocado um distúrbio no sistema, através da adição de etanol, na mesma quantidade que a adicionada na Fermentação 1, entretanto, em diferente intervalo de tempo. Ao invés de adicionar etanol a um alto fator de diluição, optou-se por adicionar etanol a um baixo fator de diluição, porém por um período prolongado. Com o término da adição de etanol o sistema passou apenas por monitoramento, sendo estimadas as concentrações de cada uma das variáveis de estado. A Tabela 4.4 apresenta o comportamento das variáveis de entrada nos

momentos onde ocorreram mudanças significativas no processo e na Figura 4.5 é mostrado o comportamento das variáveis C_{So} , C_{Po} e D ao longo do período de fermentação.

Tabela 4.4: Valores assumidos pelas variáveis de entrada em momentos característicos da Fermentação 2.

Tempo [h]	0,0	5,0	52	55
C_{So} [g/L]	0,0	150,0	123,17	150,0
C_{xo} [g/L]	0,0	0,0	0,0	0,0
C_{Po} [g/L]	0,0	0,0	162,72	0,0
C_{eo} [g/L]	0,0	0,0	0,0	0,0
D [h^{-1}]	0,0	0,07971	0,09971	0,07971

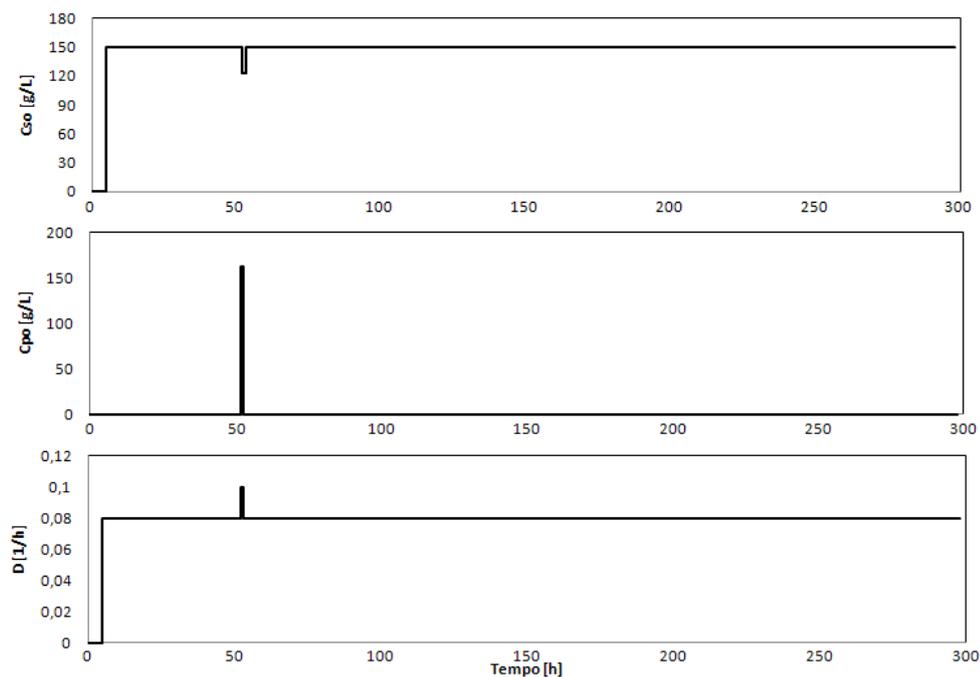


Figura 4.5: Comportamento das variáveis de entrada C_{So} , C_{Po} e D ao longo da fermentação 2, as variáveis C_{xo} e C_{eo} não são graficadas por assumirem valor zero durante todo período de fermentação.

O cultivo foi encerrado após aproximadamente 300 horas a partir do seu início, novamente atingindo estado estacionário, precedido de um período com oscilações amortecidas nas variáveis de estados.

A Figura 4.6 apresenta o gráfico da concentração de substrato (açúcar redutor) e produto (etanol) ao longo do tempo para a fermentação 2, enquanto que a Figura 4.7 apresenta a concentração de biomassa (concentração celular) desta fermentação ao longo do tempo. Em ambas as figuras, as retas 1 e 2 representam respectivamente, os instantes onde foi iniciado o processo contínuo e o instante onde foi iniciada a adição de etanol.

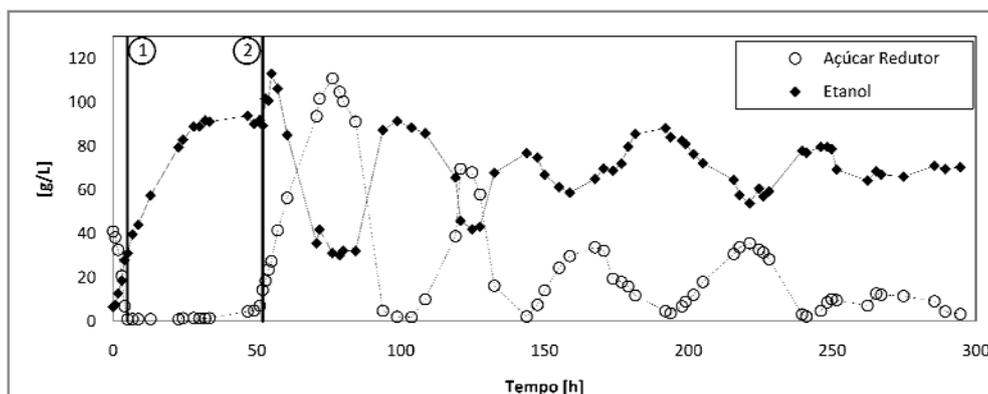


Figura 4.6: Fermentação 2, concentrações de substrato e etanol ao longo do tempo de fermentação. As retas 1 e 2 representam, respectivamente, os instantes de início do processo contínuo e adição de etanol.

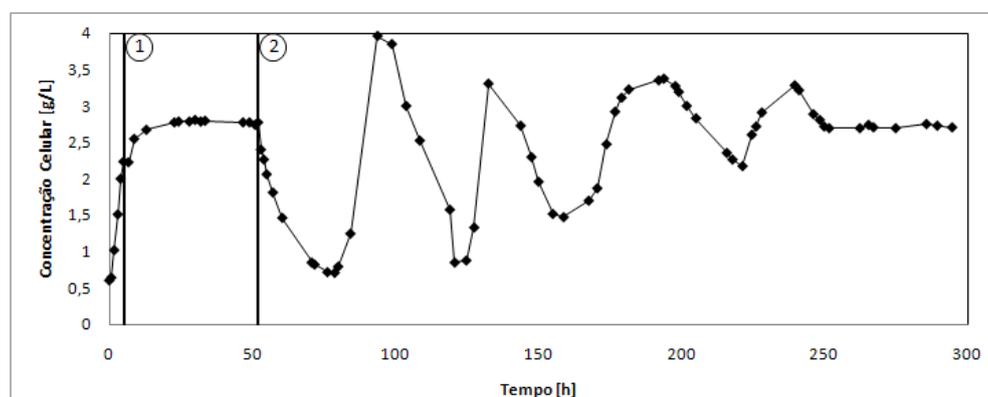


Figura 4.7: Fermentação 2, concentração celular ao longo do tempo de fermentação. As retas 1 e 2 representam, respectivamente, os instantes de início do processo contínuo e adição de etanol.

As variações no crescimento celular em função do tempo são evidenciadas nas Figuras 4.6 e 4.7. No instante em que a alimentação contínua é iniciada (instante 1), o sistema rapidamente assume um regime estacionário, onde as concentrações das variáveis de estado não variam com o tempo. Este regime é mantido por um longo período de tempo para evidenciar a estabilidade do sistema antes do distúrbio provocado pela adição de etanol. No momento da adição de etanol (instante 2), o sistema assume um comportamento oscilatório amortecido, pois com o decorrer da

fermentação o sistema retorna a um estado de equilíbrio estável, similar ao assumido antes do distúrbio.

A Figura 4.8 apresenta o consumo cumulativo de hidróxido de sódio 5 M, utilizado para manter o pH do meio reacional estável. No capítulo 6 esta informação será discutida e utilizada na proposta de inferidores de estado.

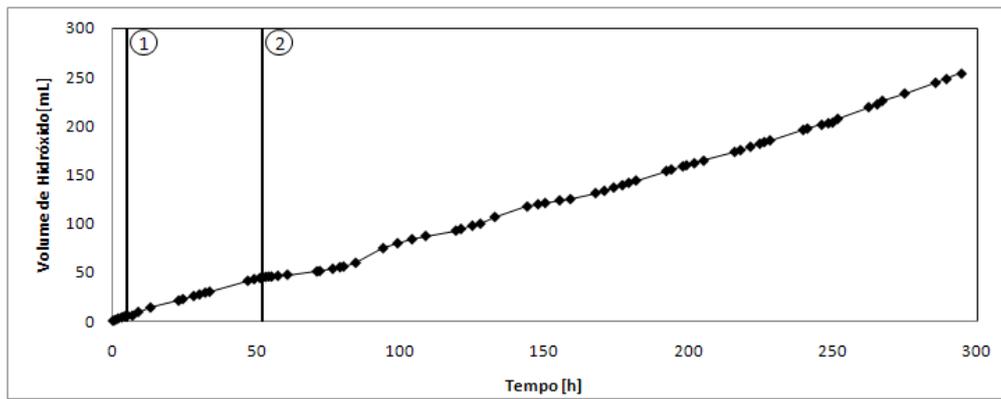


Figura 4.8: Fermentação 2, consumo cumulativo de hidróxido de sódio 5 M para controle do pH do meio reacional. As retas 1 e 2 representam, respectivamente, os instantes de início do processo contínuo e adição de etanol.

4.3 Descrição do modelo

O modelo optado como foco de estudo deste trabalho foi o proposto por Jöbses *et al* (1986), escolhido, dentre os demais apresentados no capítulo 2, devido a sua simplicidade de implementação além de obter resultados significativos no processo de predição do comportamento de fermentações de glicose através da bactéria *Z. mobilis*.

Através de análise dimensional do modelo, constatou-se que o modelo apresentava algumas incoerências dimensionais em três de suas quatro equações diferenciais. As equações que apresentam inconsistência são as que representam a variação das concentrações de substrato, biomassa e produto com o tempo.

Neste modelo, os estados x são representados na forma das quatro equações diferenciais a seguir:

$$\frac{dC_S}{dt} = -\frac{\mu_{\max} C_S C_e}{Y_{SX}(K_S + C_S)} - m_S C_x + D(C_{S0} - C_S) \quad (2.32)$$

$$\frac{dC_x}{dt} = \frac{\mu_{\max} C_S C_e}{(K_S + C_S)} + D(C_{x0} - C_x) \quad (2.33)$$

$$\frac{dC_e}{dt} = \frac{K_E(C_P - c_1)(C_P - c_2)C_S C_e}{(K_S + C_S)} + D(C_{e0} - C_e) \quad (2.34)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = \frac{\mu_{\max} C_S C_e}{Y_{PX}(K_S + C_S)} + m_p C_x + D(C_{P0} - C_P) \quad (2.35)$$

Neste modelo, a variável C_S representa a concentração de substrato (glicose), C_x representa a concentração celular ou concentração de biomassa (*Z. mobilis*), C_P é a concentração de produto (etanol) e C_e é uma variável auxiliar que faz referencia a concentração de um pseudo componente e , sendo esta, responsável por expressar o efeito inibitório provocado pela concentração de etanol no modelo cinético. O fato de cultivos contínuos com *Z. mobilis* apresentarem oscilações sustentadas, para baixos valores de fator de diluição, é possível de ser representado devido à inserção da parcela $K_E(C_P - c_1)(C_P - c_2)$ associada com C_e . Os parâmetros originais propostos por Jöbses para o seu modelo são apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Parâmetros originais do modelo de Jöbses

Parâmetro	Valor	Unidade
K_E – Constante de Monod	0,00383	$m^6 / kg^2 h$
K_S – Constante de Monod	0,5	kg / m^3
c_1 – Constante empírica	59,2085	kg / m^3
c_2 – Constante empírica	70,5565	kg / m^3
μ_{\max} – Taxa máxima de crescimento	1	h^{-1}
m_S – Fator de manutenção baseado no consumo de substrato	2,16	kg / kgh
m_P – Fator de manutenção baseado na formação de produto	1,10	kg / kgh
Y_{Sx} – Fator de rendimento da conversão de biomassa em substrato	0,02445	kg / kg
Y_{Px} – Fator de rendimento da conversão de biomassa em produto	0,05263	kg / kg

Desta forma o modelo torna-se capaz de descrever o comportamento oscilatório da bifurcação Hopf. Esta forma fatorada explicita mais facilmente as possíveis trocas de sinal que podem ocorrer no termo. Observe que $C_1 \leq C_P \leq C_2$ apresenta uma taxa negativa, enquanto que fora desta faixa os valores serão positivos. A oscilação está vinculada à concentração de C_P próximo a uma destas fronteiras, pois nesta situação teremos uma troca de sinal da taxa. Concentrações fora da faixa geram estados estáveis, enquanto que dentro da faixa estados instáveis.

As variáveis de entrada no modelo do processo fermentativo são D (fator de diluição), C_{So} , C_{xo} , C_{Po} , e C_{eo} , respectivamente, concentração de substrato, biomassa, produto e pseudo componente e , todas na corrente de alimentação.

4.4 Método de Gauss

Como visto anteriormente, a estimativa de parâmetros é baseada na função erro, definida por: $e = y - g(x; \theta)$, seja de forma direta ou indireta. Assim, podemos afirmar, de forma mais abrangente, que a estimativa de parâmetros é baseada na diferença: $\varepsilon = y_\varepsilon - g_\varepsilon(x; \theta)$. A Equação (4.3) pode ser utilizada a fim de ilustrar esta abrangência.

$$\min_{\theta} \sum_{i=1}^{ne} \sum_{j=1}^{ny} [y_{ij} - g(x_i^{sim}; \theta)]^2 + \sum_{i=1}^{ne} \sum_{j=1}^{ny} \left[\frac{dy_{ij}}{dt} - \frac{dg(x_i^{sim}; \theta)}{dt} \right]^2 \quad (4.3)$$

Para a resolução desta equação foi adotado o método de Gauss Newton (Bard, 1974). Como valores de referência iniciais para o algoritmo de otimização, foram tomados os valores dos parâmetros propostos por Jöbsses, isto com o objetivo de refinar a busca, já que o método de Gauss Newton consiste em método analítico com a aproximação da Hessiana negligenciando o termo da segunda derivada da função g .

A implementação deste método é apresentada por Schweinberger (2009), que aborda a descrição da implementação do método de Gauss Newton, feita em Maple[®], e aplicada a um sistema diferencial proposto para prever o comportamento de uma planta de seis tanques esféricos.

4.5 Estimativa de Parâmetros utilizando dados experimentais

A estimativa de parâmetros para o modelo de Jöbsses foi feita através da metodologia de Trierweiler e Machado (2004), onde busca-se a minimização da derivada do erro através do método de Gauss Newton, utilizando os dados experimentais da Fermentação 2. Apenas esta fermentação foi escolhida para esta etapa do processo devido ao seu comportamento ser considerado completo. Isto significa que podemos identificar claramente as fases do processo - estacionárias e dinâmicas - ao contrário do ocorrido com a Fermentação 1, onde o período estacionário inicial não foi mantido por muito tempo e o sistema não retornou ao estado estacionário após o distúrbio aplicado.

A Figura 4.9 apresenta os estados da Fermentação 1 em conjunto com a simulação do modelo de Jöbses, alimentado com as mesmas condições aplicadas na Fermentação 1 para as variáveis de entrada do modelo, e utilizando o conjunto de parâmetros original publicado para este modelo. Apenas os estados C_S , C_x e C_P são apresentados, já que o estado C_e não apresenta possibilidade de ser mensurado fisicamente, o que impossibilita sua comparação com dados teóricos de simulação.

Através da avaliação desta figura, é possível concluir que o modelo teórico não é capaz de prever de forma satisfatória o comportamento dos estados. Da forma como foi implementado, utilizando o conjunto original de parâmetros, este modelo não tem a capacidade preditiva necessária para propor estratégias de controle e/ou avaliar singularidades na produção de etanol.

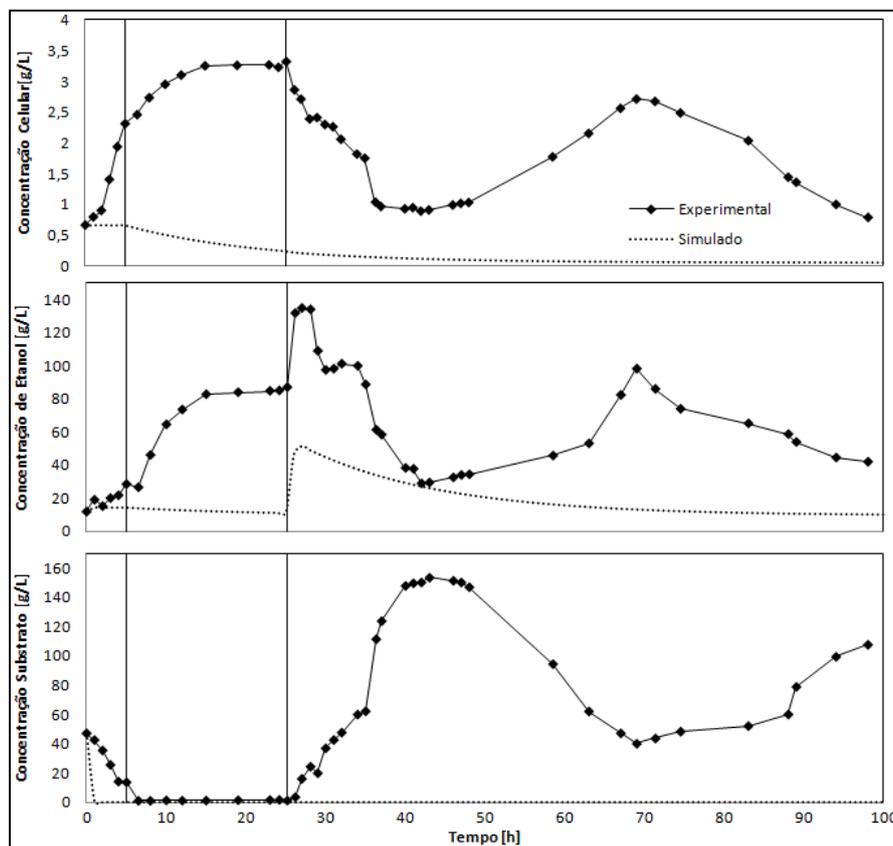


Figura 4.9: Fermentação 1, concentrações de substrato, etanol e biomassa experimental e simulação dos respectivos estados com o conjunto de parâmetros originais propostos por Jöbses. As retas transversais representam instantes onde ocorreram variações nas variáveis de entrada.

A Figura 4.10 também apresenta a comparação entre resultados experimentais e a simulação dinâmica do modelo de Jöbses original. Nesta figura são apresentados os resultados experimentais para a fermentação 2 e a simulação dinâmica alimentada com variáveis de entrada equivalentes ao ocorrido no processo laboratorial. Neste caso, novamente, o modelo alimentado com o conjunto

original de parâmetros não é capaz de prever com relativa precisão o sistema fermentativo desejado.

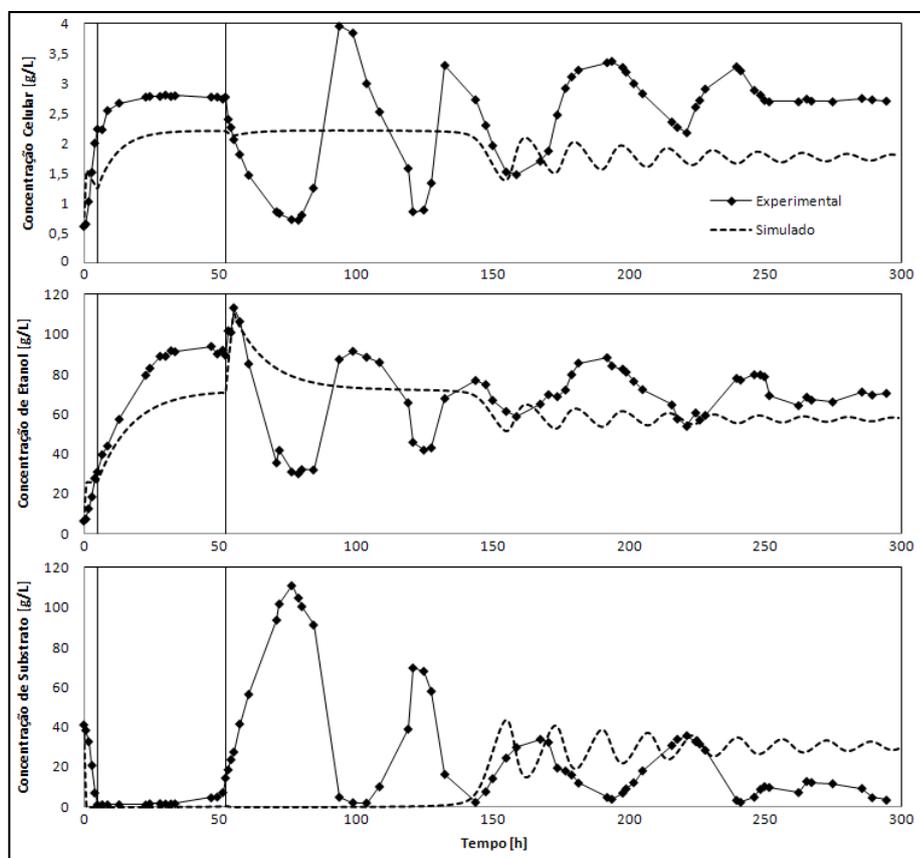


Figura 4.10: Fermentação 2, concentrações de substrato, etanol e biomassa experimental e simulação dos respectivos estados com o conjunto de parâmetros original propostos por Jöbses. As retas transversais representam instantes onde ocorreram variações nas variáveis de entrada.

O modelo proposto por Jöbses não é capaz de reproduzir o comportamento dinâmico das fermentações experimentais, além de ser incapaz de prever, quantitativamente, os estados estacionários atingidos pelos experimentos.

O novo conjunto de parâmetros a ser estimado deve ser capaz de reproduzir de forma mais precisa possível o comportamento apresentado experimentalmente pela fermentação, além de permitir o desenvolvimento de estratégias de controle mais apropriadas ao processo fermentativo realizado no laboratório.

4.5.1 Cálculo de derivadas

Para a aplicação do método de Gaus Newton, além de ser fornecido ao método os valores experimentais dos estados, deve ser fornecida a derivada destes no tempo. Como os dados são obtidos de forma discreta e em intervalos aleatórios, o cálculo da derivada exige que seja utilizado algum método de cálculo de derivadas discretas e com intervalos variados.

Neste trabalho foi feito o cálculo das derivadas de forma analítica com o auxílio do aplicativo *Curve Fitting Toolbox* implementado em Matlab. Neste aplicativo os dados experimentais são ajustados através da utilização de *B-Splines*, que convertem dados discretos em funções contínuas e diferenciáveis. Entretanto, este método tende a representar os pontos experimentais, e não a tendência do processo.

As *B-Splines* são funções *spline* construídas a partir de polinômios de baixa ordem, conectados em certos valores de x , através de nós. A representação da *spline* utilizada neste trabalho é apresentada na Equação (4.4). Nesta equação, a_j são os coeficientes de peso da correspondente *B-spline* função base $B_{j,k}(t)$, k é a ordem da *spline* e N são os números de nós.

$$f(t) = \sum_{j=1}^N a_j B_{j,k}(t) \quad (4.4)$$

Os coeficientes a_j são obtidos por métodos de mínimos quadráticos. Para a diferenciação de cada forma polinomial, $B_{j,k}(t)$, as derivadas são encontradas através de *piecewise-polynomial sense*. Isto significa que, efetivamente, cada região polinomial é diferenciada separadamente, e espaços descontínuos entre os polinômios são ignorados durante a diferenciação. Entretanto, para avaliar o desempenho da regularização suavizada aplicada, antes e depois da diferenciação, é utilizado aproximação da derivada por diferenças finitas centrais.

Na Figura 4.11 são apresentados os resultados obtidos ao diferenciar o resultado obtido pela aplicação de *B-Splines* aos dados experimentais da Fermentação 2. Ao analisar esta curva, percebe-se que apesar dos resultados serem constantes, estes possuem inúmeras regiões onde ocorrem picos e vales que não são esperados devido a característica dos dados experimentais. Estes picos e vales aparecem devido ao fato dos intervalos de medida entre os pontos serem demasiadamente elevados e variados, ocasionando a ocorrência de regiões onde a função *spline*, associada aos pontos experimentais, apresenta pontos de inflexão, máximos ou mínimos nos intervalos entre pontos experimentais. Apesar destes resultados apresentarem uma visão qualitativa das derivadas de

variáveis dos estados, estes resultam em parâmetros estimados não representativos do processo fermentativo.

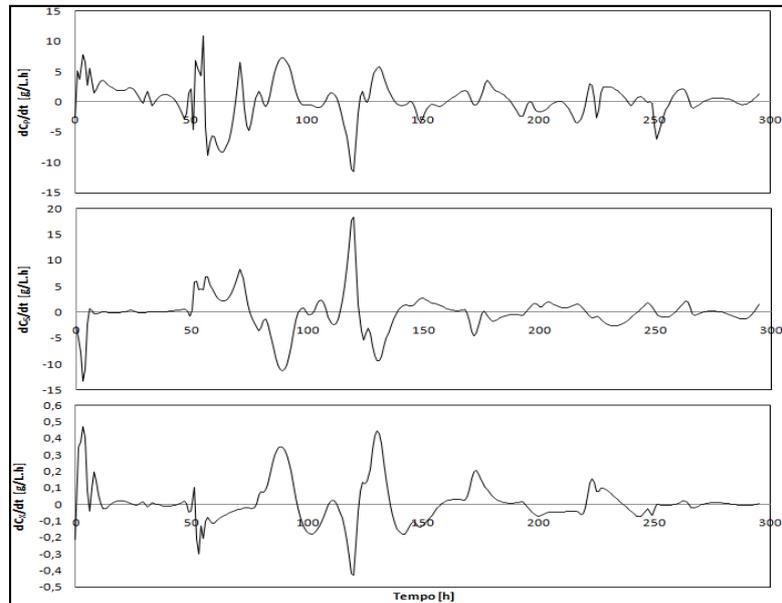


Figura 4.11: Derivada das variáveis de estado, obtidas com a aplicação da técnica de *Cubic Spline* diretamente aos dados experimentais.

Para resolver o problema foi proposto fazer manualmente o ajuste de funções contínuas polinomiais ou com outras estruturas, como a utilização de séries de Fourier, para representar as variáveis de estado da Fermentação 2 e então fazer o ajuste com *splines* e o subsequente cálculo das derivadas. A partir destas funções, foram gerados novos conjuntos de dados experimentais, igualmente espaçados e com alta representatividade do processo dinâmico de fermentação, para cada uma das variáveis analisadas em função do tempo. Estes ajustes também foram feitos através do toolbox *Curve Fitting Toolbox*.

A Figura 4.12 apresenta os estados observados na Fermentação 2 e, além destes, são apresentados os resultados do processo de representação de dados na forma de funções contínuas e diferenciáveis. Nesta imagem são apresentadas as segmentações usadas para subdividir os dados experimentais. Tanto a divisão das regiões, quanto a escolha do tipo de função a ser ajustada foi efetuada de forma manual, através de tentativa e erro, sendo o resultado apresentado o que melhor se adéqua aos dados desta fermentação. A tabela apresentando as estruturas de funções associadas a cada intervalo, os parâmetros estimados para cada, além do valor de R^2 podem ser obtidos no Apêndice C.

O conjunto de dados originais da Fermentação 2 compreende aproximadamente 75 pontos, coletados em intervalos aleatórios. Em contrapartida, os pontos obtidos através da utilização de funções contínuas são indefinidos. Cada ponto é composto pelas informações de tempo,

concentrações de biomassa, substrato e etanol, além do valor da derivada no tempo de cada um dos estados.

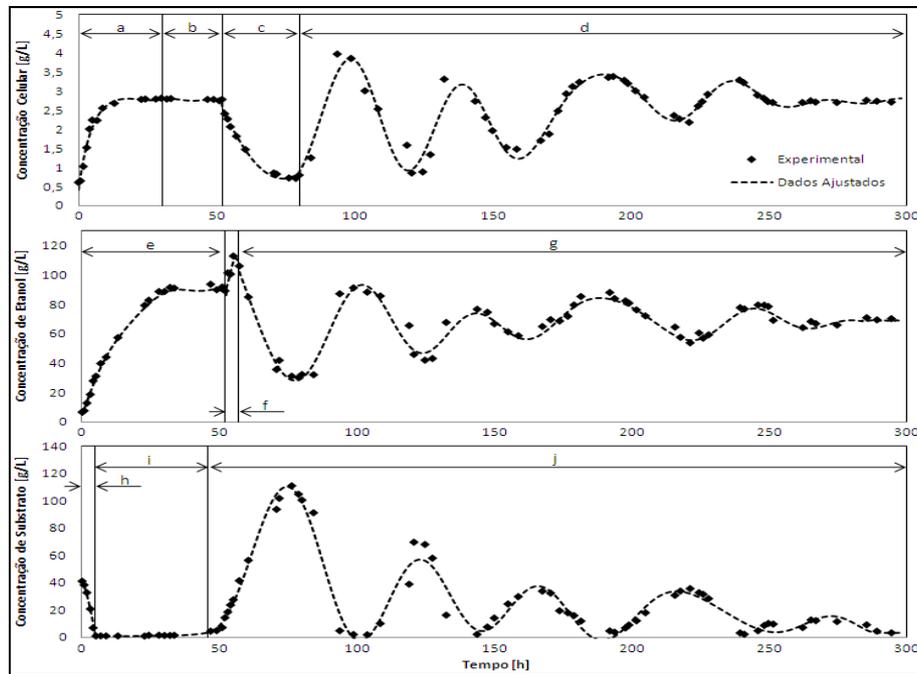


Figura 4.12: Resultado obtido através da aplicação de funções contínuas para representar os dados experimentais da Fermentação 2. As regiões especificadas de *a* a *j* compõe os diferentes intervalos usados para representar cada estado.

Para obter a informação das derivadas dos estados, foram gerados dados com intervalos constantes e iguais à 1 hora, totalizando cerca de 300 pontos experimentais. A Figura 4.13 apresenta o resultado alcançado para a derivada dos estados, obtida com os novos conjuntos de dados experimentais.

A Figura 4.13 demonstra de forma clara o comportamento da derivada de cada um dos estados da fermentação em questão. Em comparação com os gráficos das derivadas obtidos diretamente dos dados experimentais (Figura 11), percebe-se uma mudança significativa na representatividade obtida por estes novos dados de derivadas.

De acordo com Mejía, Farias e Trierweiler (2010), outras técnicas poderiam ser aplicadas para a determinação das derivadas dos estados, dentre elas podemos citar as técnicas de suavização (*Smoothing Techniques*) ou versões regularizadas de técnicas de suavização (*Regularized versions of Smoothing Techniques*). As técnicas de suavização referem-se aos métodos de GCV-Butterworth (*Butterworth Smoother based on Generalized Cross – Validation Criterion*), AIC-BSP (*B-Spline Smoother based on Akaike Information Criterion*) e ADAPT-SG (*Savitzky-Golay Smoother based on correlation of the residues*).

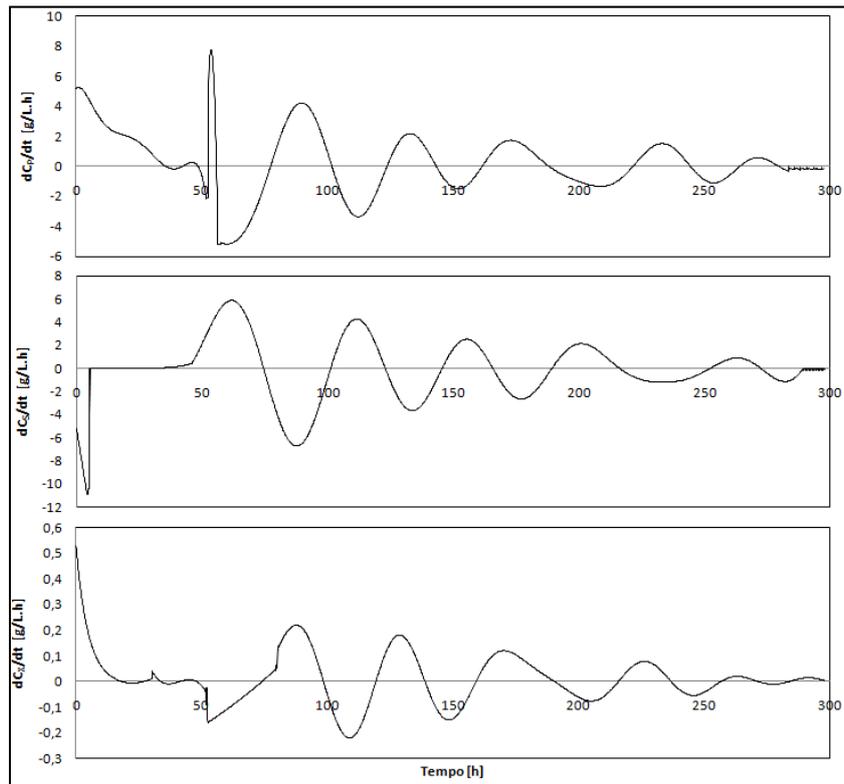


Figura 4.13: Derivada das variáveis de estado, obtidas com a aplicação da técnica de derivação no conjunto de dados ajustados aos resultados experimentais.

Testes foram feitos com o uso da técnica de AIC-BSP, onde a regularização e diferenciação intrínseca podem ser aplicadas simultaneamente. O princípio deste método consiste em obter uma função estimada, definida no intervalo $t_j \leq t \leq t_{j+k}$, que seja contínua e continuamente diferenciáveis. Como a função a ser estimada não é conhecida de antemão, é interessante representar esta através de superposição de funções base, neste caso, *B-Splines*. Apesar da facilidade em obter resultados significativos, os resultados obtidos com a utilização do *Curve Fitting Toolbox* aparentemente apresentam melhor representatividade.

4.5.2 Conjunto de parâmetros estimados

Com os dados experimentais ajustados, podemos partir para a etapa de obter uma estimativa para o conjunto de parâmetros do modelo de Jöbses. Nesta etapa do processo é aplicada a metodologia descrita acima até se obter uma estimativa definitiva.

A metodologia utilizada para a resolução dos problemas de otimização foi a de Gauss Newton, buscando-se a minimização quadrática total da derivada do erro, método este considerado

o mais apropriado por Machado e Trierweiler (2004), devido à capacidade deste método de capturar a tendência do processo ao invés de tentar passar por todos os pontos experimentais.

Diversas configurações para a função objetivo foram testadas durante o processo de estimativa, dentre elas podem ser citadas a utilização apenas das variáveis de estados e combinações entre estas, combinações entre as derivadas das variáveis de estado, ou então combinações entre variáveis de estado e suas derivadas. A importância deste processo é discutida em Schweinberger (2009).

Como valores iniciais para o conjunto de parâmetros foi utilizado o conjunto original ajustado por Jöbses *et al.* (1986), e a partir deste foram obtidos novas estimações para os parâmetros do modelo, todos eles utilizando a mesma configuração para a função objetivo. A Equação (4.9) apresenta a formulação adotada para a função objetivo a ser minimizada. Esta formulação foi a que gerou melhores resultados, sendo que a multiplicação da derivada da concentração de biomassa por um fator de 10 foi usado com o objetivo de manter a mesma ordem de grandeza de todas as variáveis.

$$g = [dC_p/dt \quad dC_s/dt \quad 10dC_x/dt] \quad (4.9)$$

A Tabela 4.6 apresenta os valores encontrados para os parâmetros do modelo através da utilização da metodologia Gauss Newton. Nesta tabela, além do conjunto original de parâmetros, apresentam-se três conjuntos de parâmetros ajustados, que apresentam boa representatividade da Fermentação 2.

Tabela 4.6: Conjuntos de parâmetros estimados para o modelo de Jöbses *et al.* (1986)

Parâmetro	θ_0	θ_1	θ_2	θ_3	Unidade
K_E	0,00383	0,0005135	0,678949	0,023607	$m^6 / kg^2 h$
K_S	0,5	0,00001	0,009033	2,705952	kg / m^3
c_1	59,2085	34,4714	8,254957	8,282814	kg / m^3
c_2	70,5565	52,30161	14,809833	254,1585	kg / m^3
μ_{max}	1,0	0,50000	0,8683252	0,548366	h^{-1}
m_S	2,16	1,44408	1,2030694	1,233941	kg / kgh
m_P	1,10	0,41769	7,5330876	8,625015	kg / kgh
Y_{Sx}	0,02445	0,45000	6,503156	5,513703	kg / kg
Y_{Px}	0,05263	0,19313	1,333914	1,236171	kg / kg

No processo iterativo, a partir do conjunto inicial de parâmetros, diversos outros conjuntos foram gerados e reutilizados para refinar o chute inicial, desta forma, o processo foi sendo repetido e os conjuntos apresentados como resultados, obtidos após diversas tentativas.

Com os novos conjuntos de parâmetros obtidos é necessário determinar qual deles seria o mais promissor para a predição de fermentações contínuas de glicose com a bactéria *Z. mobilis*. A Figura 4.14 apresenta os dados experimentais juntamente com simulações dinâmicas do modelo de Jöbses e dos três modelos obtidos por estimativa de parâmetros.

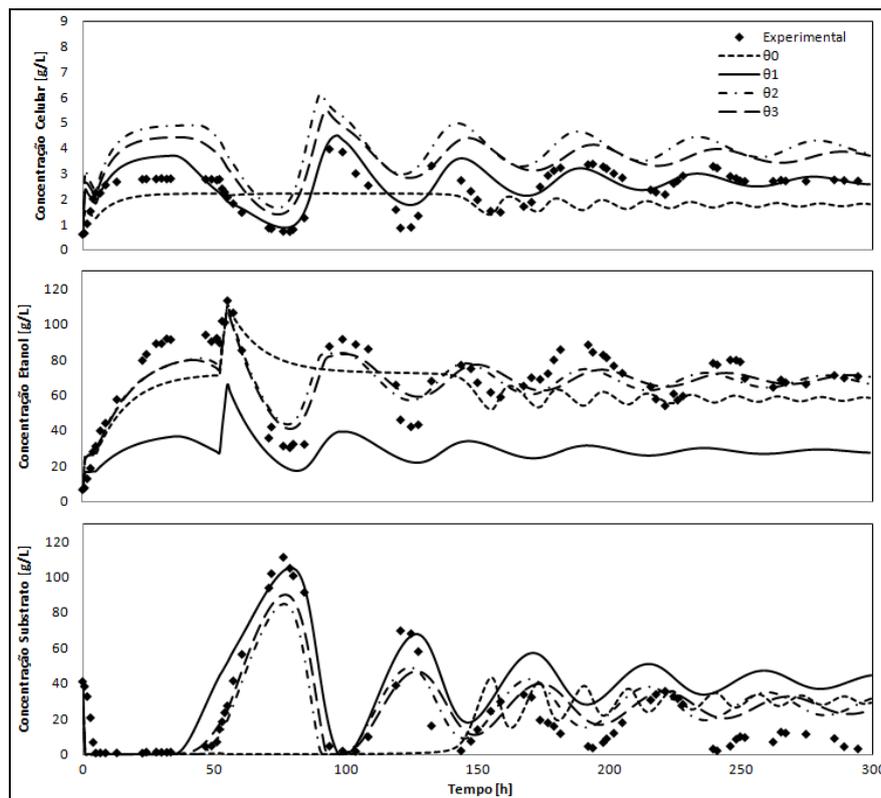


Figura 4.14: Dados experimentais e simulações dinâmicas do modelo original de Jöbses (θ_0) e dos três conjuntos obtidos (θ_1 , θ_2 e θ_3) para a Fermentação 2.

Graficamente pode ser concluído que os quatro conjuntos de parâmetros apresentam resultados significativamente diferentes, excetuando o conjunto θ_2 e θ_3 . O conjunto θ_0 é o que demonstrou menor aproximação ou apresentou maior diferença aos dados experimentais, sendo este o motivo utilizado para a busca de novos parâmetros. Os conjuntos θ_1 , θ_2 e θ_3 apresentam melhor representatividade dos dados experimentais, sendo que o conjunto θ_1 encontra-se muito bem ajustado para prever o comportamento da concentração de células, sendo, portanto, este o conjunto que melhor se adaptou aos dados desta variável, entretanto, para prever o comportamento das demais variáveis de estado ele não apresentou ser o mais adequado. Os conjuntos θ_2 e θ_3 foram mais

adequados que os anteriores para prever o comportamento das concentrações de etanol e de substrato, sendo o conjunto θ_3 o que melhor representa estes estados.

Apesar do conjunto θ_1 representar muito bem o comportamento apresentado pela concentração de biomassa na Fermentação 2, os conjuntos θ_2 e θ_3 podem ser considerados mais significativos na representação geral da fermentação, e dentre ambos, o conjunto θ_3 apresentou melhores resultados.

Todos os parâmetros passaram por processo de estimação e analisando os valores numéricos atingidos, θ_0 é significativamente diferente, em todos os parâmetros, dos demais conjuntos. Os conjuntos θ_2 e θ_3 diferem basicamente nos valores de K_E , K_S e c_2 , sendo que a variação em c_2 foi que apresenta maior diferença relativa, onde o valor deste parâmetro foi cerca de 20 vezes maior no conjunto θ_3 .

Estimar bons parâmetros não significa obter valores que reproduzam satisfatoriamente os dados experimentais. A estimativa de bons parâmetros envolve a obtenção de valores que representem a realidade do sistema. Para avaliar a eficiência dos parâmetros obtidos e sua representatividade da realidade do sistema, foram feitas simulações dinâmicas do processo fermentativo adotado na Fermentação 1 e graficadas juntamente com os dados experimentais (Figura 4.15).

Na Figura 4.15 percebe-se que apesar de não representar de modo fiel os resultados obtidos experimentalmente, os conjuntos θ_2 e θ_3 são capazes de representar a dinâmica do processo como um todo, apresentando oscilações com amplitudes similares, embora apresente dinâmica mais lenta que a experimental. De forma geral, estes dois conjuntos representam satisfatoriamente a fermentação avaliada, sendo o conjunto θ_3 o que aparenta apresentar melhores resultados. Por outro lado, nos conjuntos θ_0 e θ_1 observaram-se comportamentos não condizentes com o experimental, assumindo valores negativos para os estados, além de apresentarem dinâmica completamente diferente.

A obtenção de melhores conjuntos de parâmetros e com melhor representatividade da realidade deste sistema só será possível com a aquisição de novos conjuntos de dados e associação dos mesmos para o refinamento de cada parâmetro, aumentando assim o conhecimento sobre este sistema.

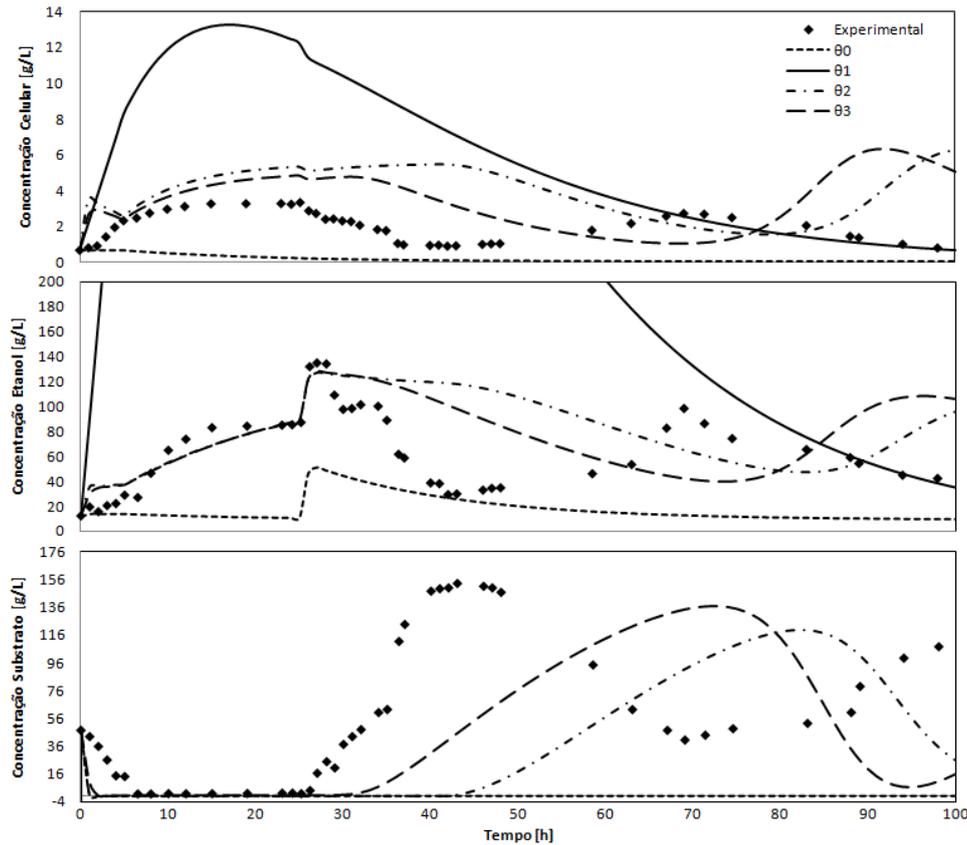


Figura 4.15: Dados experimentais e simulações dinâmicas do modelo original de Jöbsses (θ_0) e dos três conjuntos obtidos (θ_1 , θ_2 e θ_3) para a Fermentação 1.

Com base nos resultados obtidos dos conjuntos de parâmetros ajustados frente os resultados experimentais, é válido assumir que os conjuntos que melhor representam o sistema fermentativo em questão são θ_2 e θ_3 , com destaque para o conjunto θ_3 é o que representou uma dinâmica mais próxima do real. Este modelo obtido pode ser utilizado em diversos estudos, seja no desenvolvimento de novas tecnologias referentes ao processo de produção de etanol por *Z. mobilis* no desenvolvimento de novas estratégias de controle, otimização do processo de produção, etc. No capítulo a seguir serão feitas análises de bifurcação deste novo modelo, afim de determinar singularidades no processo de fermentação, caracterizando o sistema frente mudanças em variáveis chave do processo, como a taxa de diluição ou ainda a concentração de glicose na corrente de alimentação do reator.

Capítulo 5

Análise de bifurcação do modelo de JöbSES

5.1 *Sistemas não Lineares*

Antigamente, era assumido que modelos matemáticos possuíam comportamentos simples e preditivos, contudo, desde o final do século 19 com os trabalhos de Poincaré e na década de 60 do século passado com o trabalho de Lorenz, ficou claro que modelos simples poderiam apresentar uma incapacidade de predição para longos períodos de tempo. Essa característica, até então desconhecida, é provocada pela alta sensibilidade desses sistemas às condições iniciais (CIs) (Bequette, 1998). Condições iniciais podem ser caracterizadas como sendo os valores assumidos pelas variáveis do modelo no tempo inicial de integração. Um exemplo clássico é o modelo de Lorenz para predição das condições climáticas, composto por três equações diferenciais ordinárias (EDOs) não lineares.

Em 1880, o francês Poincaré introduziu o conceito de bifurcação, definindo o termo como uma mudança qualitativa no diagrama de fase de um sistema dinâmico, decorrente da variação de algum parâmetro de controle. Em um sistema de equações diferenciais uma bifurcação no estado estacionário ocorre se há alterações no número de soluções de equilíbrio ou na estabilidade do sistema (Bequette, 1998). Na realidade Poincaré foi o verdadeiro descobridor do caos ao analisar um problema envolvendo três corpos. Considerou como simples a determinação do movimento planetário gravitacional em um sistema de dois corpos e no entanto, quando considerados três corpos, o sistema de equações tornava-se não integrável.

Bifurcações e caos são fenômenos observados em sistemas não lineares. Não linearidade significa que a saída não é diretamente proporcional a entrada, ou que a mudança em uma variável não produz uma mudança proporcional na variável relacionada. Em outras palavras os valores do sistema não são proporcionais aos valores em tempos próximos (Williams, 1997). Nesses sistemas, análises baseadas em simulação dinâmica podem ser incapazes de captar comportamentos característicos relevantes ou mesmo ser inconclusivas. Sendo assim análises, da dinâmica não linear, fazem-se necessárias para sistemas complexos como reatores químicos e biorreatores (Bequette, 1998). Em geral, modelos matemáticos utilizados em engenharia são contínuos, sendo comum sua representação através de equações diferenciais (EDs) (Kusnetsov, 1998), porém modelos discretos também são eventualmente utilizados. Segundo Bequette (1998) modelos discretos compostos por uma única equação podem apresentar comportamentos complexos como o caos. Já modelos contínuos, necessitam de pelo menos três EDs para que haja a possibilidade da ocorrência de caos. Williams (1997) define caos como sendo o aspecto desordenado da evolução, em

longo prazo, que satisfaz certos critérios matemáticos especiais e que ocorre em sistemas dinâmicos, determinísticos e não lineares.

Uma das técnicas mais importantes, no estudo de sistemas não lineares, é a análise do diagramas de fase. Através dessa técnica é possível caracterizar comportamentos como o efeito das condições iniciais e da estabilidade de soluções estacionárias.

5.1.1 Estabilidade de Sistemas Dinâmicos

A teoria da estabilidade representa um papel fundamental em sistemas de engenharia, com ênfase na área de controle de processos e dispositivos. Chen (2004) afirma que, de uma maneira geral, estabilidade significa que a saída de um sistema apresenta uma trajetória com limites definidos ou com tendência a atingir um estado de equilíbrio. Segundo o autor, conceitualmente existem diversos tipos de estabilidade, entre essas três noções básicas são de interesse na dinâmica não linear: a estabilidade em relação ao equilíbrio, a estabilidade orbital e a estabilidade estrutural.

Se a dinâmica de um sistema, no espaço de estado, muda radicalmente, por exemplo, pelo surgimento de um novo equilíbrio ou uma nova órbita periódica, devido a uma pequena perturbação externa, então o sistema é considerado estruturalmente instável. Kusnetsov (1998) define estabilidade estrutural como a invariância qualitativa do retrato de fase em relação a uma pequena perturbação. Em outras palavras, estabilidade estrutural significa que a família de órbitas de uma figura geométrica é similar.

A linearização de um sistema de equações diferenciais, ou seja, a obtenção de sua matriz Jacobiana (J), permite a análise de sua estabilidade local através dos autovalores dessa matriz (Kusnetsov, 1998). Caso todos os autovalores da Jacobiana (comumente representados por λ_i , onde i representa o número de autovalores) apresentarem a parte real valores negativos, para determinado equilíbrio, diz-se que a solução é assintoticamente estável (*stable node* ou *sink*). Caso contrário a solução é dita assintoticamente instável, onde o surgimento de autovalores com parte real negativa e positiva aponta para pontos sela instáveis (*saddle point*) e autovalores com parte real maior que zero indicam nodos instáveis (*unstable node* ou *source*) (Wiggins, 2003).

5.1.2 Diagramas de fase e Bifurcação

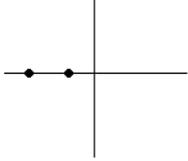
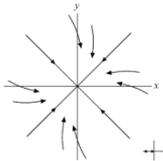
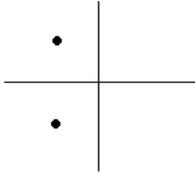
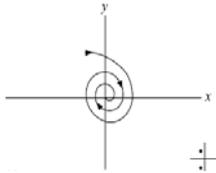
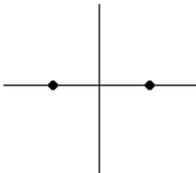
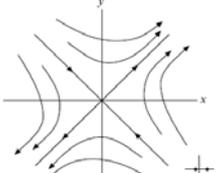
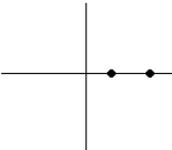
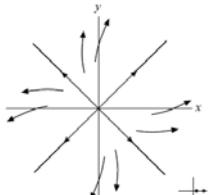
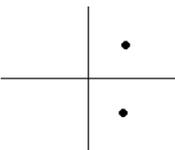
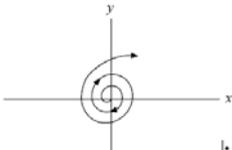
O termo bifurcação foi definido por Poincaré como uma mudança qualitativa no retrato de fase de um sistema dinâmico, conforme a variação de algum parâmetro de controle (Bequette, 1998). Um diagrama de fase, muitas vezes referido como retrato de fase, plano de fase ou espaço de fase, é uma representação geométrica da estrutura orbital de um sistema dinâmico e consequentemente uma ferramenta muito usual na análise de suas propriedades qualitativas (Médio e Lines, 2001). Em outras palavras, é uma técnica utilizada para o estudo de comportamentos transientes no domínio do tempo.

Consiste em se graficar curvas de uma variável de estado versus outra variável de estado, onde cada curva é baseada em uma condição inicial (Bequette, 1998). Um plano de fase pode ser uma curva no R^2 ou no R^3 , que permite análises relativas à convergência do sistema em relação às condições iniciais. Com vistas a generalizar comportamentos de sistemas planos, é apresentada a classificação topológica de equilíbrios da Tabela 5.1 (Médio e Lines, 2001; Kusnetsov, 1998; Bequette, 1998). Desta forma é possível relacionar os autovalores de um sistema com suas características em um espaço de fase. Pontos estáveis são atratores e pontos instáveis repulsores de soluções. O surgimento de autovalores complexos conjugados é a causa da ocorrência de retratos de fase com o formato de espiral ou foco.

Kusnetsov (1998) define bifurcação como o surgimento de um retrato de fase de topologia não equivalente, sob a variação de alguma variável, chamada parâmetro de bifurcação (μ). Sendo assim, bifurcação é uma mudança topológica em um sistema quando μ atravessa um valor crítico chamado de ponto de bifurcação (μ_c), sendo μ_c localizado onde ambas função e sua primeira derivada são iguais a zero (Bequette, 1998).

Quando um parâmetro de bifurcação é varrido e os pontos de equilíbrio referentes à variável de estado são graficados, obtém-se um diagrama de bifurcação. Tais diagramas são gerados a partir de análises lineares pontuais da estabilidade (Bequette, 1998), onde regiões estáveis são representadas por linhas contínuas e regiões instáveis por linhas pontilhadas. Setas podem ser adicionadas para enfatizar convergência ou divergência. O tipo de transição que ocorre em μ_c determina a sua classificação quanto ao tipo de bifurcação. Em sistemas contínuos de primeira ordem eles podem ser de três tipos: sela, transcritical e *pitchfork* (forquilha ou tridente).

Tabela 5.1: Classificação topológica de equilíbrios no plano. Fonte: Médio e Lines, 2001.

Autovalor no Plano Complexo	Espaço de Fase	Nome do Espaço de Fase	Estabilidade
		Nodo	Estável
		Foco	Estável
		Sela	Instável
		Nodo	Instável
		Foco	Instável

A bifurcação do tipo *saddle-node* ou simplesmente sela também é classificada como *fold bifurcation* por alguns autores. A bifurcação sela é dita ser uma bifurcação descontínua ou catastrófica, porque o ponto crítico μ_c representa o fim de um ramo estável. Se houver um caminho sobre o ramo estável através de μ_c então a bifurcação é dita contínua e deixa de ser um *saddle-node*. A Figura 5.1 apresenta um exemplo de ocorrência de bifurcação tipo sela. Nesta figura são graficados a equação analisada e o diagrama de bifurcação da mesma, apresentando a ocorrência da bifurcação sela.

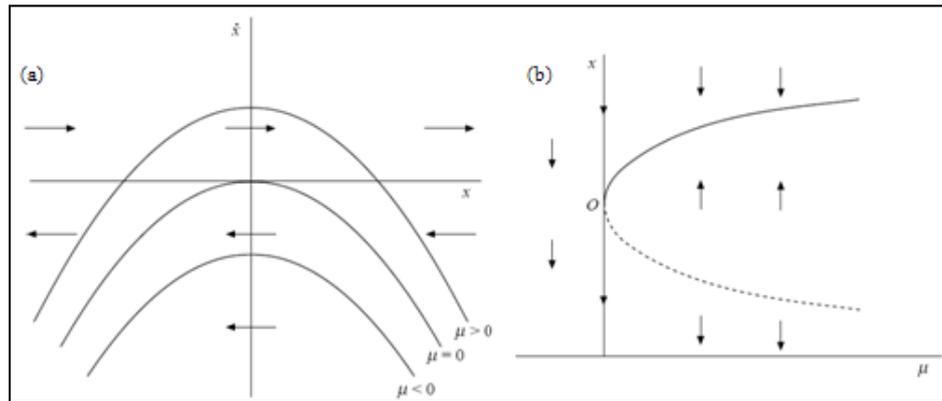


Figura 5.1: Bifurcação sela: equação graficada (a) e diagrama de bifurcação (b). *Fonte: Médio e Lines, 2001.*

Na bifurcação transcritical ocorre a mudança de estabilidade das soluções. A Figura 5.2 apresenta uma bifurcação do tipo transcritical.

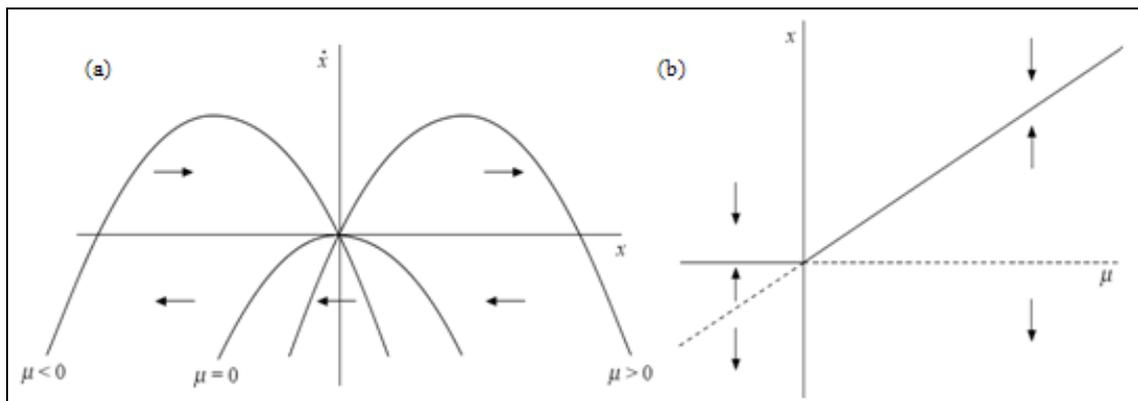


Figura 5.2: Bifurcação transcritical: equação graficada (a) e diagrama de bifurcação (b). *Fonte: Médio e Lines, 2001.*

O terceiro tipo de bifurcação, chamado de *pitchfork*, é caracterizada pelo aparecimento ou desaparecimento de equilíbrios e pela ocorrência de mudança da estabilidade (Médio e Lines, 2001).

Quando o equilíbrio não trivial aparece para $\mu > \mu_c$ se diz haver uma bifurcação *pitchfork* supercrítica (Figura 5.3). O inverso indica a existência de uma bifurcação *pitchfork* subcrítica.

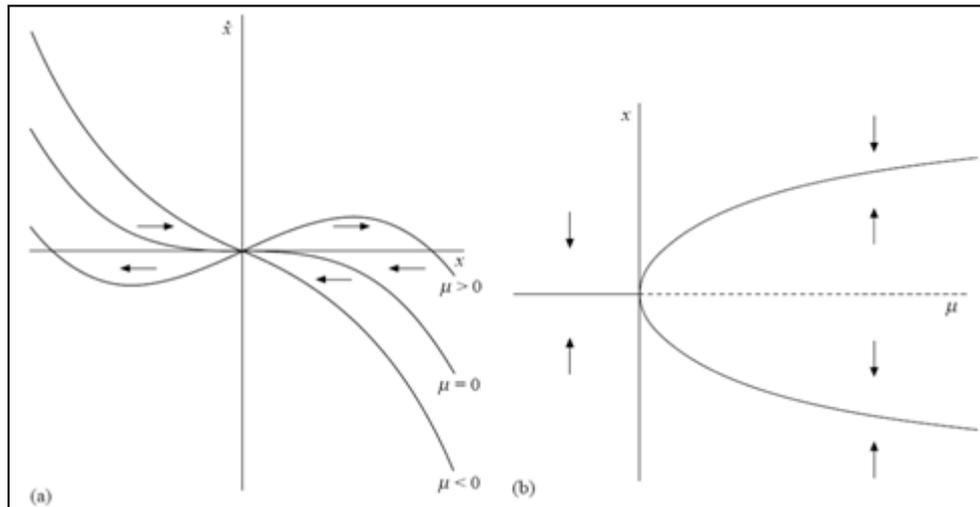


Figura 5.3: Bifurcação *pitchfork*: equação graficada (a) e diagrama de bifurcação (b). *Fonte: Médio e Lines, 2001.*

A mudança de característica monotônica para periódica, ou seja, o surgimento de um ciclo limite, em um sistema contínuo, é chamado de bifurcação Hopf. É um fenômeno que vem sendo identificado em inúmeros reatores químicos e bioquímicos (Strogatz, 1994). Essa bifurcação só é possível, em sistemas contínuos, quando há mais de uma equação diferencial envolvida.

Há dois métodos genéricos que podem fazer sistemas de equações diferenciais perderem sua estabilidade, uma delas é a bifurcação sela e a outra a bifurcação Hopf (Médio e Lines, 2001). Neste caso a perda da estabilidade se dá ao variar um parâmetro de bifurcação, fazendo com que a parte real negativa, do par complexo conjugado dos autovalores, atravesse a ordenada do plano imaginário tornando-se positiva. Uma bifurcação Hopf surge quando a parte real dos autovalores se anula em função de um parâmetro μ . Como pode ser visto na Figura 5.4, o ponto Hopf surge quando $\mu = 0$. O retrato de fase da formação de uma bifurcação Hopf supercrítica pode ser visualizado na Figura 5.5(a), onde α é o parâmetro de bifurcação. Para $\alpha \leq 0$ o equilíbrio é um foco, enquanto que para $\alpha > 0$ o sistema apresenta uma órbita periódica, ambos estáveis (Kusnetsov, 1998). Na Figura 5.5(b) ocorre o inverso surgindo uma bifurcação Hopf subcrítica. Em outras palavras o termo supercrítico é definido como o surgimento de um ciclo limite no ponto de bifurcação e o termo subcrítico como o desaparecimento do ciclo limite no ponto de bifurcação (Kusnetsov, 1998). Obviamente este conceito é relativo à direção de varredura da variável de controle.



Figura 5.4: Localização dos autovalores no plano complexo em função de μ . Adaptado: Bequette, 1998.

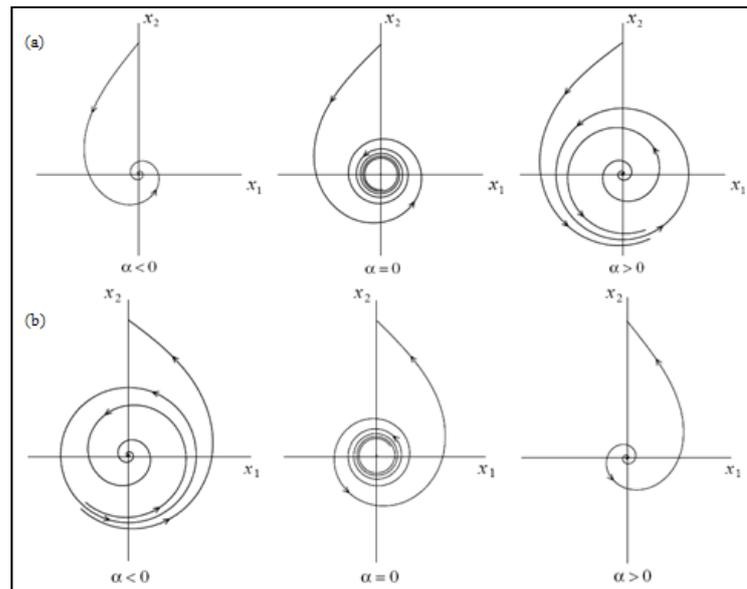


Figura 5.5: Retrato de fase da formação de uma bifurcação Hopf: (a) supercrítica e (b) subcrítica. Fonte: Kusnetsov, 1998.

A revisão completa sobre estabilidade de sistemas não lineares e diagramas de bifurcação pode ser obtida no Apêndice B. Neste são apresentados de forma mais ampla os diversos conceitos aqui abordados, além de apresentar uma revisão mais detalhada sobre os diversos tipos de bifurcação.

5.2 Análise Sistemática de Modelos

A utilização de análise de bifurcação, como ferramenta para promover a classificação entre os modelos obtidos no Capítulo 4, será efetuada através da implementação de algoritmos nos softwares Matlab® e Maple®. Os parâmetros de bifurcação avaliados foram a taxa de diluição e a concentração de substrato na corrente de alimentação do biorreator. O método numérico utilizado para a obtenção de simulações dinâmicas em Matlab® foi o ode45, um método não rígido de precisão média, baseado na formulação de Runge-Kutta explícito com coeficientes de Dormand-

Princes. Em Maple®, o método numérico utilizado foi o de Rosenbrock implícito de terceira/quarta ordem, também baseado na formulação de Runge-Kutta.

A caracterização estático/dinâmica do modelo original de Jöbses (θ_0) foi feita utilizando-se o *continuation toolbox* Matcont, que é baseado na experiência do desenvolvimento e uso do CONTENT por Dhooge, Govaerts, Kuznetsov, Mestrom, Riet e Souttois, implementado em software Matlab® (Dhooge *et al.*, 2006). O método numérico implementado neste *toolbox* necessita dos valores de um equilíbrio (C_e , C_S , C_x e C_P) para iniciar a construção dos diagramas de bifurcação, de modo que resoluções do sistema de equações diferenciais foram feitas, para determinados valores das variáveis de entrada (D , C_{S_0} , C_{e_0} , C_{P_0} e C_{x_0}), a fim de obter estes valores.

Historicamente, sabe-se que fermentações contínuas de glicose, utilizando a bactéria *Z. mobilis* apresentam multiplicidades de saída quando avaliados em determinadas regiões operacionais (Elnashaine *et al.*, 2006; Maheca-Botero *et al.*, 2006; Garhyan e Elnashaine, 2004; Garhyan *et al.*, 2003). Análises do modelo de Jöbses indicam o aparecimento de três ramos de soluções, dois deles estáveis e um intermediário instável. A Figura 5.6 apresenta o espaço de fase para simulações dos quatro modelos avaliados, apresentando a biestabilidade presente nos modelos, com exceção de Jobses θ_1 . O ramo de estados estacionários instáveis interliga-se com um dos ramos estáveis, de forma que, apenas duas soluções no estado estacionário são necessárias para a construção do diagrama de bifurcação deste modelo, uma em cada ramo estável.

A estrutura do modelo estudado é composta pelo conjunto de equações diferenciais apresentadas abaixo (Equações (2.32) à (2.35)), e os conjuntos de parâmetros originais e estimados no Capítulo 4 são apresentados na Tabela 5.2. Descrições acerca do modelo e dos conjuntos de parâmetros podem ser encontradas, respectivamente, nos Capítulos 3 e 4.

$$\frac{dC_S}{dt} = -\frac{\mu_{\max} C_S C_e}{Y_{SX}(K_S + C_S)} - m_S C_x + D(C_{S_0} - C_S) \quad (2.32)$$

$$\frac{dC_x}{dt} = \frac{\mu_{\max} C_S C_e}{(K_S + C_S)} + D(C_{x_0} - C_x) \quad (2.33)$$

$$\frac{dC_e}{dt} = \frac{K_E (C_P - c_1)(C_P - c_2) C_S C_e}{(K_S + C_S)} + D(C_{e_0} - C_e) \quad (2.34)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = \frac{\mu_{\max} C_S C_e}{Y_{PX}(K_S + C_S)} + m_P C_x + D(C_{P_0} - C_P) \quad (2.35)$$

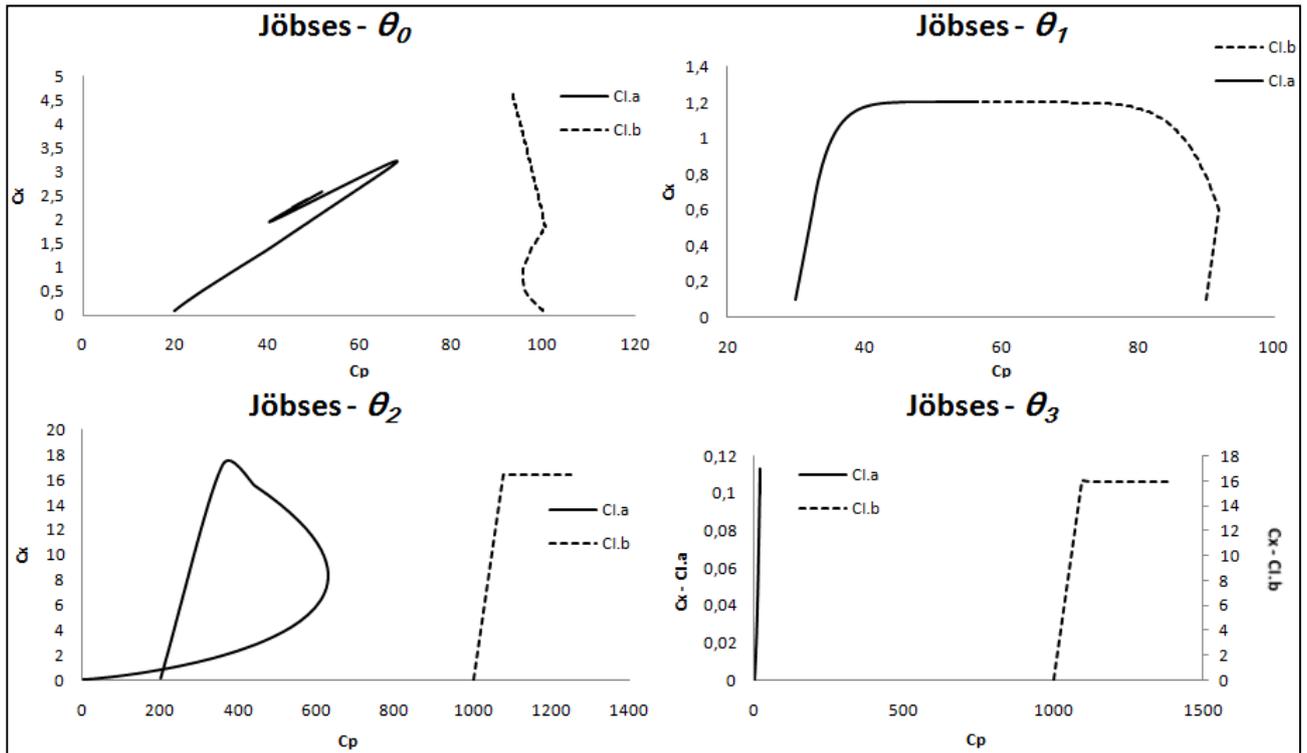


Figura 5.6: Espaços de fase: biestabilidade para o modelo original de Jöbbses (θ_0) e dos modelos ajustados (θ_1 , θ_2 e θ_3).

Tabela 5.2: Conjuntos de parâmetros para o modelo de Jöbbses: original (θ_0) e ajustados (θ_1 , θ_2 e θ_3).

Parâmetro	θ_0	θ_1	θ_2	θ_3	Unidade
K_E	0,00383	0,0005135	0,678949	0,023607	$m^6 / kg^2 h$
K_S	0,5	0,00001	0,009033	2,705952	kg / m^3
c_1	59,2085	34,4714	8,254957	8,282814	kg / m^3
c_2	70,5565	52,30161	14,809833	254,1585	kg / m^3
μ_{max}	1,0	0,50000	0,8683252	0,548366	h^{-1}
m_S	2,16	1,44408	1,2030694	1,233941	kg / kgh
m_P	1,10	0,41769	7,5330876	8,625015	kg / kgh
Y_{Sx}	0,02445	0,45000	6,503156	5,513703	kg / kg
Y_{Px}	0,05263	0,19313	1,333914	1,236171	kg / kg

5.2.1 Simulações Dinâmicas

A Figura 5.7 apresenta o resultado de duas simulações dinâmicas do modelo de Jöbses para cada conjunto de parâmetros, totalizando 8 simulações. São apresentados os comportamentos da concentração de produto (C_P) e de biomassa (C_X). Através destas foi possível verificar a dependência do sistema em convergir para uma das soluções estáveis, característica presente em quase todos os modelos avaliados, com exceção do Jöbses θ_1 , onde ambas as simulações convergiram para a mesma resposta. Para alterar o ponto de convergência, a condição inicial (CI) manipulada foi a concentração de etanol no interior do reator. Quando esta grandeza é baixa, o sistema tende a convergir para um estado de menor conversão de substrato (glicose) em produtos (etanol), enquanto que altas concentrações de etanol conduzem o sistema a altas conversões. Os valores adotados para as condições iniciais foram idênticas para todas as simulações, com exceção dos valores de $C_P(0)$, que foi ajustado de acordo com a característica de cada modelo. As condições iniciais de cada uma das simulações são apresentadas na Tabela 5.3.

Tabela 5.3: Condições iniciais para a realização de simulações dinâmicas para os modelos ajustados.

Modelo		C_e [g/L]	C_S [g/L]	C_X [g/L]	C_P [g/L]	C_{S0} [g/L]	D [h^{-1}]
Jöbses	CI.a	3	10	0,1	20	200	1
θ_0	CI.b	3	10	0,1	100	200	1
Jöbses	CI.a	3	10	0,1	30	200	0,01
θ_1	CI.b	3	10	0,1	90	200	0,01
Jöbses	CI.a	3	10	0,1	200	200	0,1
θ_2	CI.b	3	10	0,1	1000	200	0,1
Jöbses	CI.a	3	10	0,1	20	200	0,1
θ_3	CI.b	3	10	0,1	1000	200	0,1

Diferentes condições iniciais, além de diferentes valores para as variáveis de entrada do modelo foram aplicados nas simulações devido à característica de cada modelo. Apesar dos modelos terem sido propostos para representar o mesmo sistema, cada um possui uma característica específica quanto a seu comportamento e região de validade. Isso significa que apesar dos modelos apresentarem multiplicidade de estados estacionários, fato que será comprovado através do mapeamento de soluções estacionárias, não possuem o mesmo retrato de fase, fazendo que

simulações dinâmicas não convergirem, ou então, o método numérico não se mostra capaz de resolver a simulação.

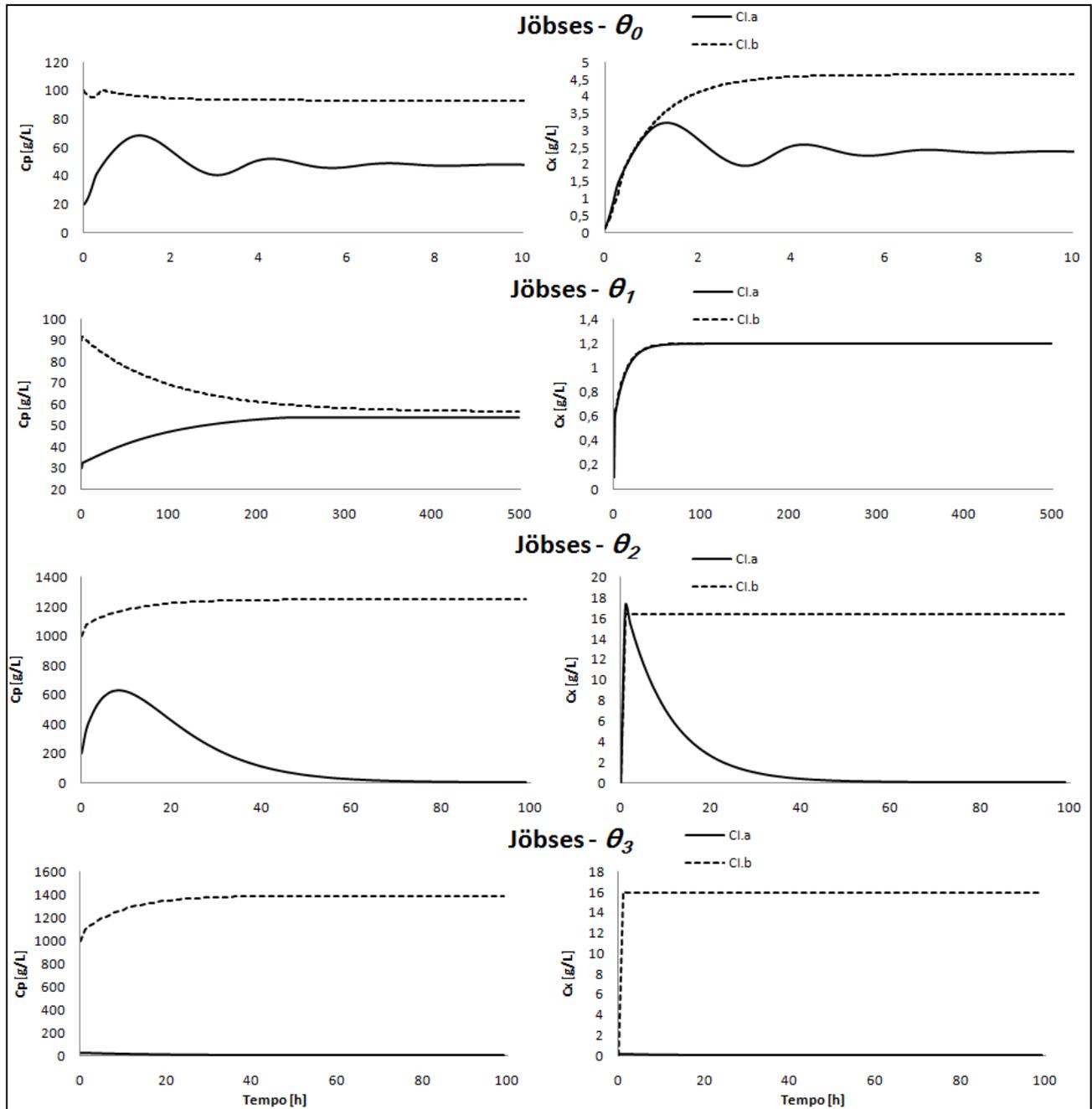


Figura 5.7: Simulação dinâmica do modelo original de Jöbkes (θ_0) e dos modelos ajustados (θ_1 , θ_2 e θ_3), para diferentes CI (a e b).

5.2.2 Análise de Bifurcação

Para avaliação de cada modelo, foram construídos os diagramas de bifurcação de forma a possibilitar avaliação do comportamento específico no estado estacionário.

A Figura 5.8 apresenta o diagrama de bifurcação do modelo original proposto por Jöbbses. O parâmetro de bifurcação escolhido para ser variado foi D , mantendo C_{S_0} constante e igual a 200 g/L. Nesta figura foram mapeadas todas as variáveis de estado. A Tabela 5.4 mostra as coordenadas de cada singularidade apresentada. O diagrama revela algumas características do sistema fermentativo, como a multiplicidade de estados estacionários e a existência de bifurcações Hopf e Sela.

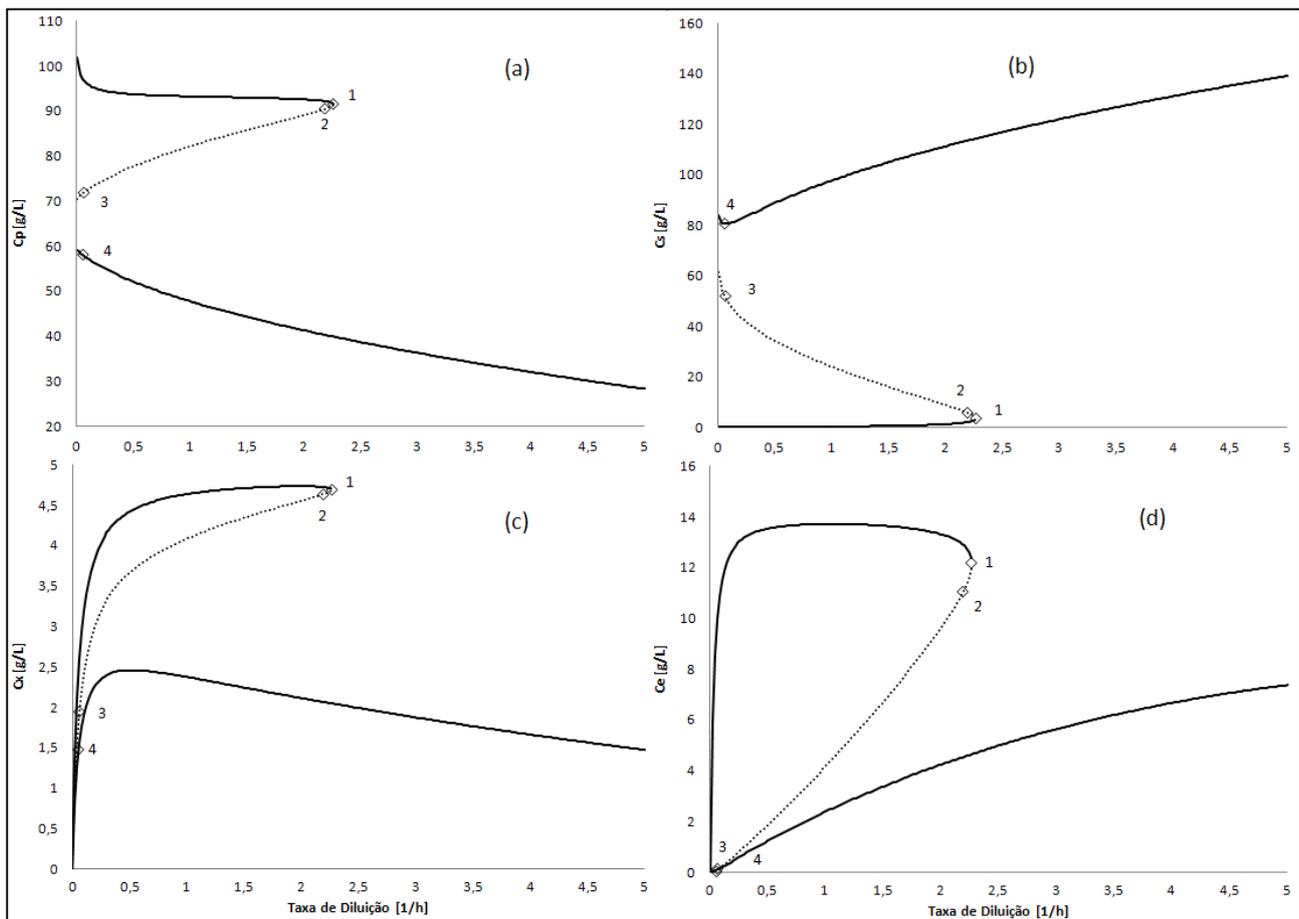


Figura 5.8: Diagrama de Bifurcação para o modelo de Jöbbses original, $C_{S_0} = 200$ g/L.

A multiplicidade de estados estacionários ocorreu para uma faixa de taxa de diluição que compreende de 0 a $2,2636 \text{ h}^{-1}$. Para valores de D acima deste intervalo, existe a ocorrência de apenas um ramo de soluções para o sistema, ou seja, desaparecendo a multiplicidade de equilíbrios. Este único ramo de soluções é considerado estável e mostra a tendência de quanto maior a taxa de diluição aplicada, menor a conversão de substrato em produtos.

A região com multiestabilidade ($D \leq 2,2636 \text{ h}^{-1}$), é caracterizada pelo surgimento de dois ramos estáveis e um instável. Dentre os ramos estáveis (representados por linhas cheias na Figura 5.8), surge um ramo de soluções de equilíbrio considerado de alta conversão e outro de baixa conversão. Para fator de diluição de $0,5 \text{ h}^{-1}$, o ramo de alta conversão apresenta significativa melhora

em comparação ao de baixa produção, melhora esta da ordem de 79,89% para Y_P (conversão de substrato em produto) e 79,67% para X_S (conversão de substrato em biomassa).

Entre os dois ramos estáveis existe uma seqüência de equilíbrios que forma um ramo instável. Neste ramo encontram-se as bifurcações 2 e 3, classificadas como Hopf virtuais. Nestes casos, eles são um caso de *neutral saddle*, ou bifurcação Hopf imaginária. Este tipo de singularidade surge quando a soma da parte real de dois autovalores é igual a zero ($\lambda_1 = -\lambda_2$) (Pellegrini e Possio, 1996). O ponto Hopf, propriamente dito, ocorre quando dois autovalores são puramente imaginários. Nos diagramas acima o ponto 4, situado no ramo de baixa conversão, trata-se de um ponto Hopf real, que ocorre quando $D = 0,0536 \text{ h}^{-1}$. Para valores de D superiores ao ponto de Hopf real a resposta dinâmica do sistema é subamortecida, enquanto que para valores de taxa de diluição menores que D do ponto Hopf, a resposta oscilatória diverge.

O ponto de bifurcação 1 representa a mudança qualitativa do comportamento do sistema, caracterizada por uma inversão da estabilidade do sistema. O equilíbrio torna-se instável ao passar pelo ponto 1, vindo através do ramo de soluções estáveis. Este tipo de singularidade é denominado bifurcação tipo sela (*saddle point*).

Tabela 5.4: Singularidades presentes no modelo original de Jöbses para $C_{S0} = 200 \text{ g/L}$.

Ponto	Tipo de Bifurcação	D (h^{-1})	C_P (g/L)	C_S (g/L)	C_x (g/L)	C_E (g/L)
1	Sela	2,2636	91,5058	3,4526	4,6959	12,1692
2	Hopf Virtual	2,1889	90,4443	5,7468	4,6375	11,0339
3	Hopf Virtual	0,0609	71,8299	51,9883	1,9392	0,1193
4	Hopf	0,0536	58,0793	80,6748	1,4699	0,0793

A Figura 5.9 apresenta os diagramas de bifurcação em duas dimensões para o modelo de Jöbses, alimentado com o primeiro conjunto de parâmetros ajustados (θ_1). O procedimento empregado para a construção destes diagramas foi o mesmo utilizado anteriormente. Novamente a taxa de diluição foi escolhida como parâmetro a ser varrido e a variável C_{S0} foi mantida constante em 200 g/L. A Tabela 5.5 apresenta as coordenadas das singularidades apresentadas por estes diagramas. Este modelo também apresenta multiplicidade de estados estacionários, além de singularidades como bifurcações Hopf e sela.

Em comparação com os diagramas do modelo original (Figura 5.8), o novo modelo analisado apresentou uma menor região com multiplicidade de equilíbrios, compreendida para valores de taxa de diluição entre 0 e $0,025061 \text{ h}^{-1}$. Para valores acima desta faixa, ocorre a

existência de apenas um ramo de soluções, desaparecendo a multiplicidade de equilíbrios. Apesar de este modelo analisado apresentar comportamento similar ao modelo original de Jöbses, o modelo original não apresentava a característica de *wash-out*, que é o fenômeno de carregamento de toda biomassa e produto para fora do biorreator. Este comportamento pode ser visto através da Figura 5.9e-g, que apresenta o diagrama de bifurcação para a concentração de produto, biomassa e substrato em função da taxa de diluição (parâmetro de bifurcação), para uma faixa maior de análise.

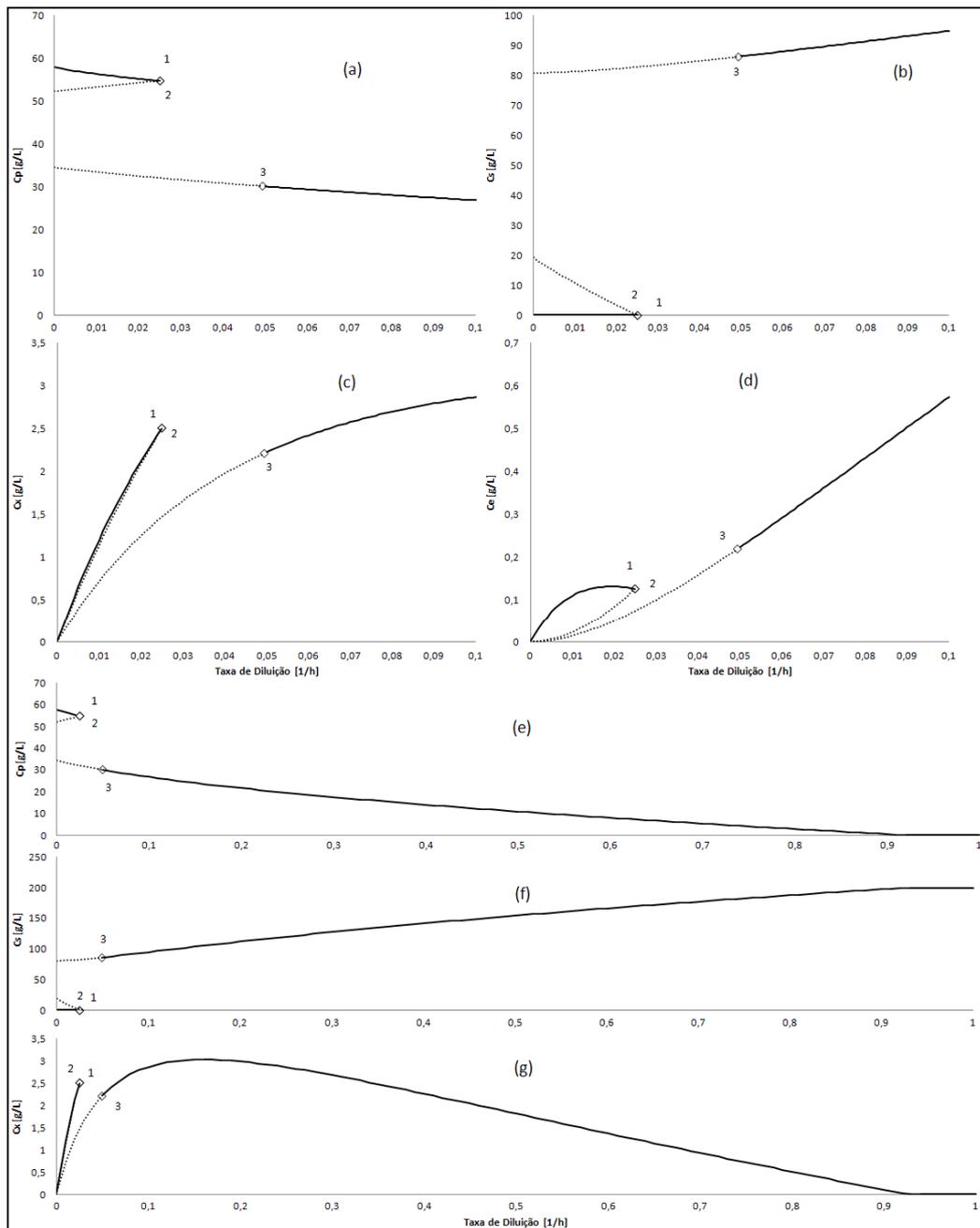


Figura 5.9: Diagrama de Bifurcação para o modelo de Jöbses θ_1 , $C_{S0} = 200$ g/L. Subgráficos (e) e (g) mostram o efeito de lavagem do reator (*washout*).

Na Figura 5.9 acima, pode ser constatado que para valores de taxa de diluição acima de $0,925811 \text{ h}^{-1}$, o sistema não apresentou soluções diferentes da trivial, indicando que para valores de D acima deste valor, as concentrações dos estados no interior do reator tendem a zero, com exceção da concentração de substrato que tende à C_{S0} . Este fenômeno é facilmente observado na prática, entretanto o modelo de Jöbses com os parâmetros originais não é capaz de prevê-lo.

Tabela 5.5: Singularidades presentes no modelo de Jöbses θI para $C_{S0} = 200 \text{ g/L}$.

Ponto	Tipo de Bifurcação	D (h^{-1})	C_P (g/L)	C_S (g/L)	C_x (g/L)	C_E (g/L)
1	Sela	0,025061	54,7153	0,00887	2,5048	0,12569
2	Hopf Virtual	0,025059	54,7142	0,01366	2,5045	0,1256
3	Hopf	0,049366	30,1346	86,2679	2,2094	0,21814

Similar ao modelo original, dentre os ramos estáveis existe o surgimento de um ramo de soluções considerado de alta conversão e um de baixa conversão. Entre estes ramos, existe o surgimento de um ramo de soluções instáveis, no qual está localizado o ponto de bifurcação 2 classificado como Hopf virtual classificado como *neutral saddle*.

O ponto 3, classificado como Hopf “real”, está situado no ramo de baixa conversão e ocorre em $D = 0,049366 \text{ h}^{-1}$ (D_{Hopf}). Para valores $D > D_{Hopf}$ o sistema apresenta respostas subamortecidas, e para valores de $D < D_{Hopf}$ as respostas do sistema no ramo inferior foram oscilatórias divergentes.

O ponto de bifurcação 1 representa a mudança qualitativa do comportamento do sistema, caracterizada por uma inversão da estabilidade do sistema. O equilíbrio torna-se instável ao passar pelo ponto 1, vindo através do ramo de soluções estáveis superior. Este tipo de singularidade é denominado bifurcação tipo sela (*saddle point*).

Um fato interessante ocorre ao analisarmos os conjuntos de soluções apresentados pelo modelo analisado anteriormente (Jöbses θ_I), para valores compreendidos entre $0,02506 \text{ h}^{-1} < D < 0,049366 \text{ h}^{-1}$, o sistema apresenta uma faixa onde o sistema não exibe soluções estáveis, apenas um ramo instável. Simulações dinâmicas nesta região geram respostas oscilatórias com altos períodos de oscilação (da ordem de 10^5 horas), com baixas amplitudes e com resultados muito próximos ao conjunto de soluções do ramo instável.

Como o ramo de menor conversão não possui regiões estáveis na mesma faixa que o ramo de alta conversão, ocorre que simulações dinâmicas deste sistema não migram entre diferentes ramos, já que não existem dois ramos de soluções estáveis que se sobrepujam. O que ocorre,

portanto, é que o sistema não apresenta regiões com multiplicidade de equilíbrios estáveis, apenas sobreposição entre equilíbrios estáveis e instáveis.

O diagrama de bifurcação do modelo ajustado Jöbses θ_2 , apresentado na Figura 5.10 apresenta um comportamento muito distinto com relação aos dois outros modelos analisados anteriormente. Apesar deste modelo também apresentar multiplicidade de equilíbrios, este apresenta um conjunto de equilíbrios estáveis, mas que não possuem representatividade prática, já que se trata de um ramo com respostas com ordem de grandeza muito acima do que é visto em fermentações reais. Este ramo é apresentado na forma de traço/ponto nos diagramas de bifurcação da Figura 5.10. Este ramo está associado à escala presente no lado direito de cada gráfico (5.10a-d).

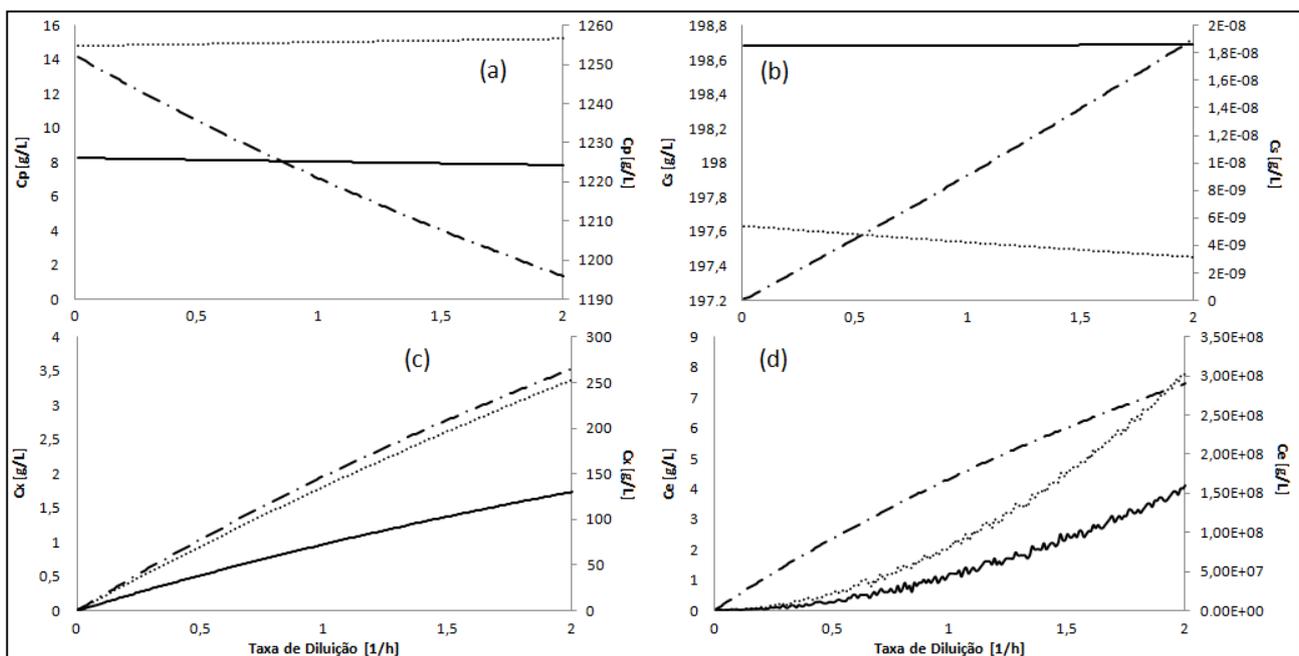


Figura 5.10: Diagrama de Bifurcação para o modelo de Jöbses θ_2 , $C_{S0} = 200$ g/L.

Apesar desta resposta com significância puramente matemática, sem representatividade prática, o sistema apresenta um conjunto de equilíbrios instáveis e um segundo conjunto de equilíbrios estáveis, este com representatividade prática. A representação destes equilíbrios é feita, respectivamente, pela linha descontinua e pela linha cheia, ambos associados à escala presente na lateral esquerda de cada diagrama.

Diferentemente da análise aplicada aos modelos anteriores, o modelo de Jöbses alimentado com o segundo conjunto de parâmetros ajustados (Jöbses θ_2) não possibilita a análise de singularidades, apenas o mapeamento de soluções estacionárias. O mapeamento de singularidades não é factível devido a não convergência do método de otimização implementado no Matcont para

o mapeamento de singularidades. Desta forma, a única análise associada a este modelo é a de estabilidade dos ramos de soluções.

A Figura 5.11 apresenta o diagrama de bifurcação do modelo de Jöbkses alimentado com os parâmetros ajustados θ_3 (Jöbkses θ_3). Este diagrama apresenta características similares aos diagramas obtidos para Jöbkses θ_2 , com multiplicidade de equilíbrios. Esta multiplicidade de equilíbrios é marcada pela ocorrência de dois ramos de equilíbrios estáveis, e entre estes existe um conjunto de equilíbrios ditos instáveis.

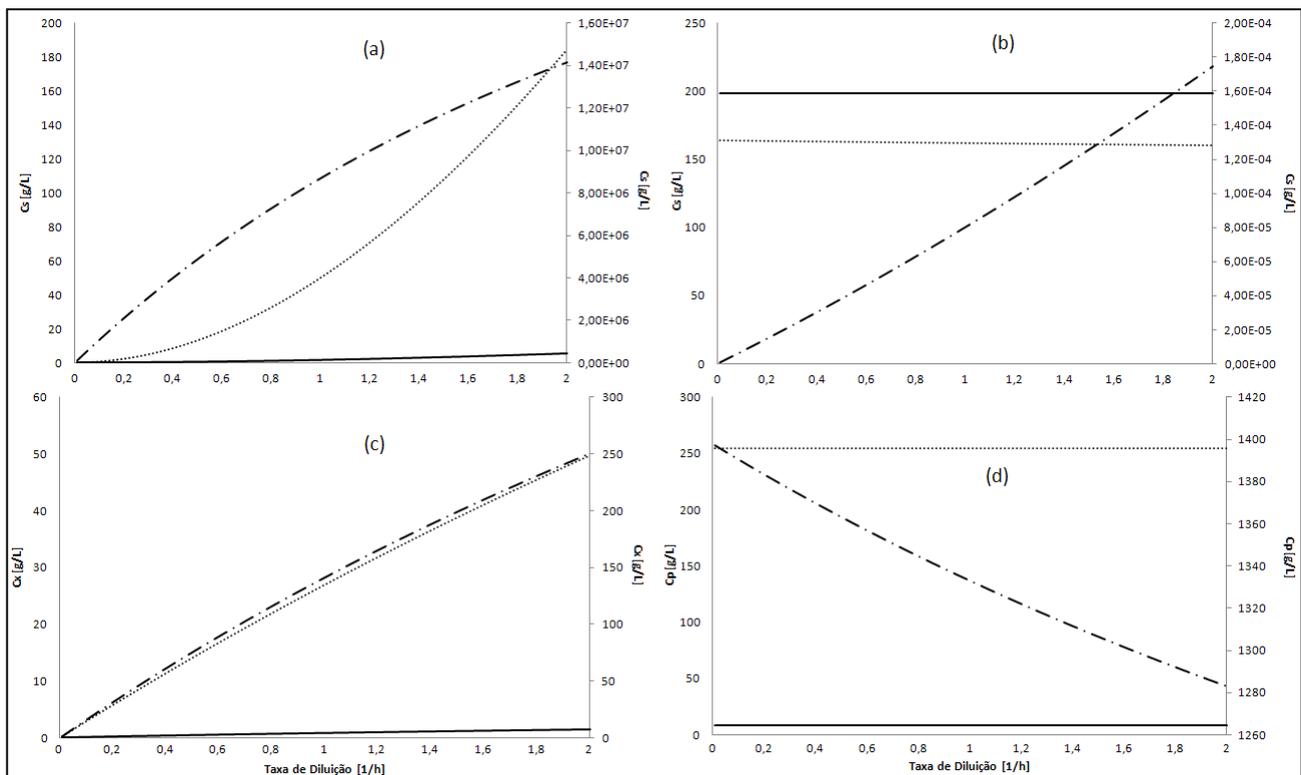


Figura 5.11: Diagrama de Bifurcação para o modelo de Jöbkses θ_3 , $C_{S0} = 200$ g/L.

A mudança entre os ramos de equilíbrios estáveis pode ser obtida facilmente através da manipulação das condições iniciais da simulação, como visto na Figura 5.10. Entretanto, o conjunto de soluções que compõe o ramo superior, de maior conversão, não apresenta representatividade física. Este conjunto de soluções trata-se de uma resposta puramente com significado matemático, já que suas grandezas são infactíveis na prática.

Nos diagramas apresentados para o modelo de Jöbkses θ_3 , o ramo de equilíbrios estável que apresenta significância física, e o ramo de soluções instável são apresentados, respectivamente, através de linha cheia e de linha descontínua, ambos associados ao eixo das ordenadas situado no lado esquerdo de cada gráfico. O ramo de soluções estáveis, mas sem representatividade é graficado

na forma de linha traço/ponto e devido a sua diferença elevada em comparação aos demais ramos de soluções, este é associado ao eixo das ordenadas situado no lado direito de cada gráfico, de forma a possibilitar a visualização do comportamento de ambos os conjuntos de soluções, o que não seria possível devido à perda de resolução caso ambos os gráficos se encontrassem associados à mesma escala.

A análise de singularidades para este modelo não foi possível novamente pelo problema de não convergência do método implementado no *toolbox* Matcont. Desta forma, apenas a análise de estabilidade dos conjuntos de soluções pode ser aplicada.

5.2.3 Análise de Bifurcação Codimensão-2

A construção dos diagramas de bifurcação das Figuras 5.12 a 5.15 foi feita através da variação da taxa de diluição, no mesmo intervalo que o executado na construção dos diagramas de bifurcação apresentados anteriormente, respectivamente para cada modelo, e também foi variada a concentração de substrato na corrente de alimentação, de 150 g/L a 220 g/L. Desta forma é possível a obtenção dos diagramas de bifurcação de codimensão-2 dos estados de cada modelo analisado.

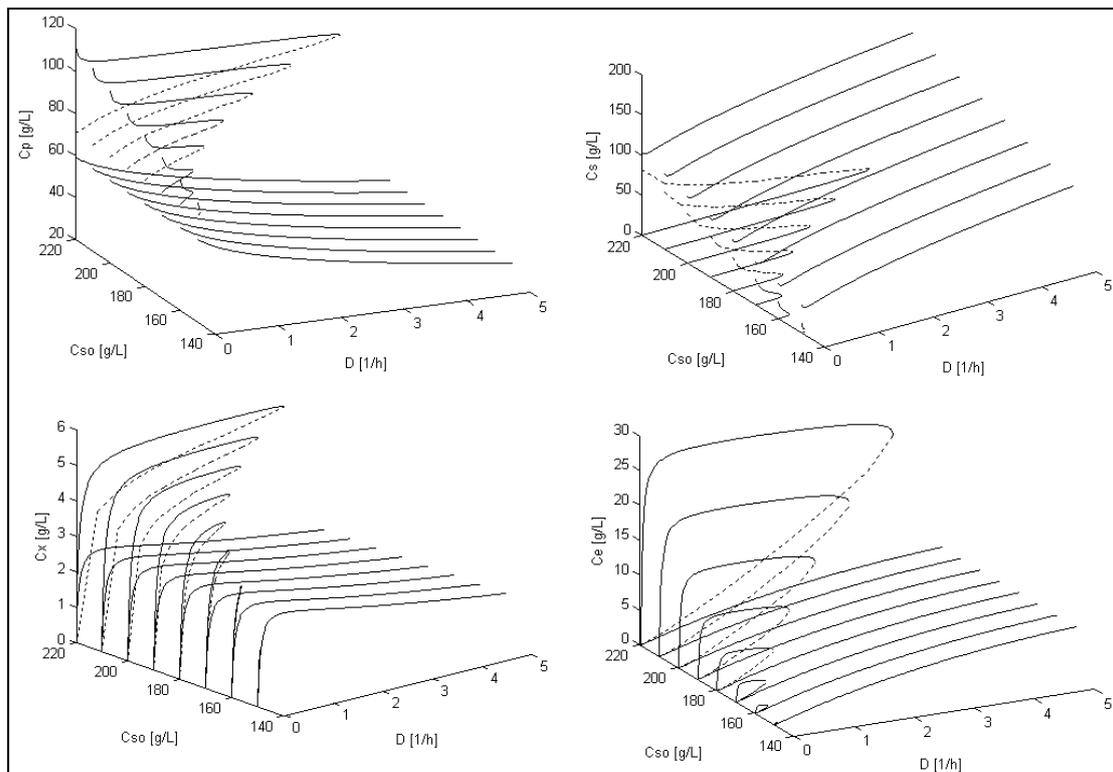


Figura 5.12: Diagramas de Bifurcação de codimensão-2 para o modelo de Jöbses θ_0 .

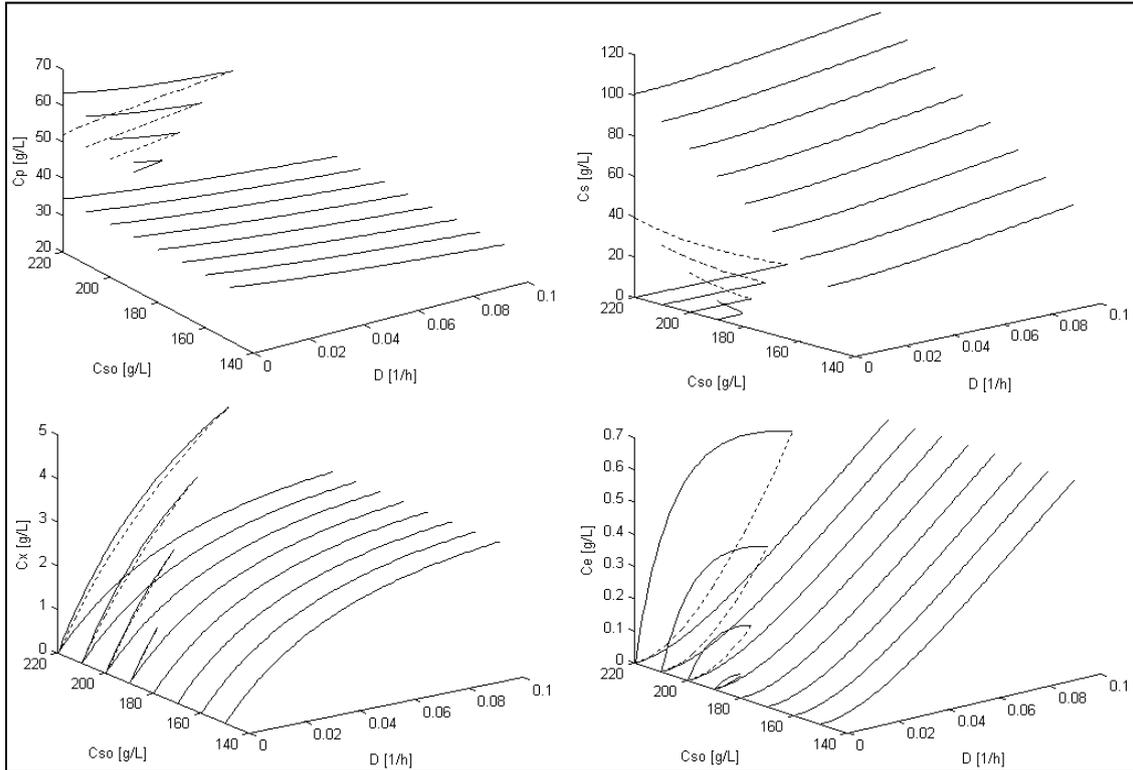


Figura 5.13: Diagramas de Bifurcação de codimensão-2 para o modelo de Jöbbses θ_1 .

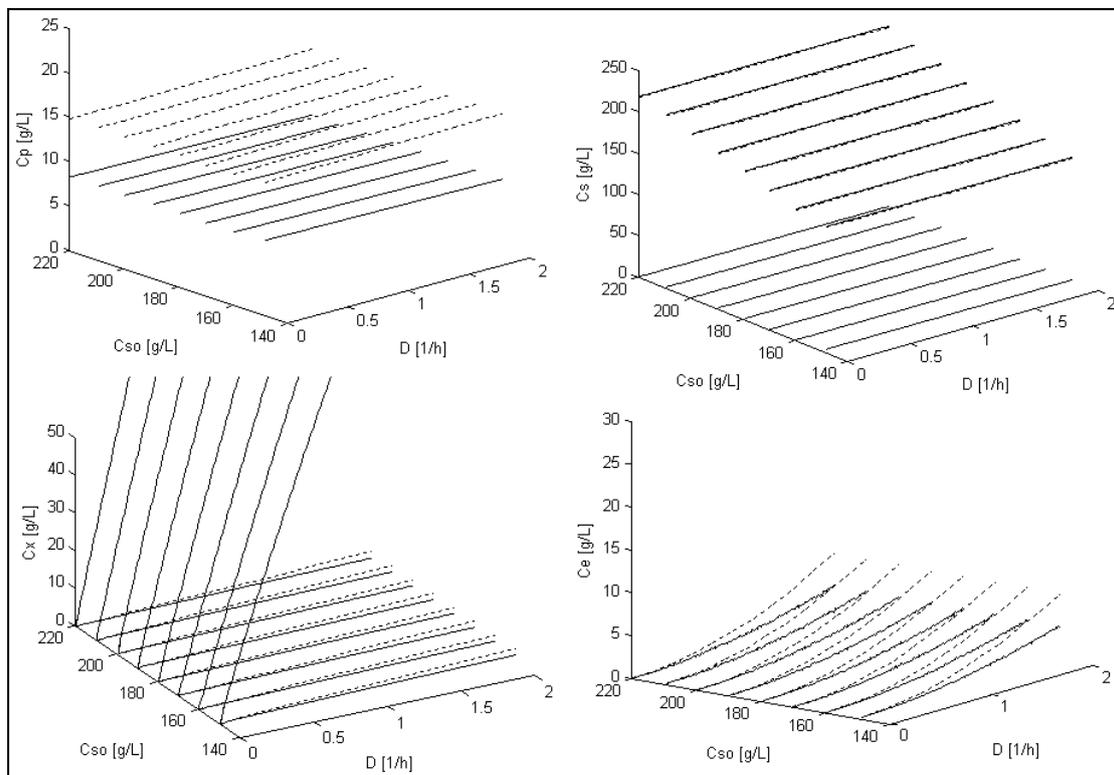


Figura 5.14: Diagramas de Bifurcação de codimensão-2 para o modelo de Jöbbses θ_2 .

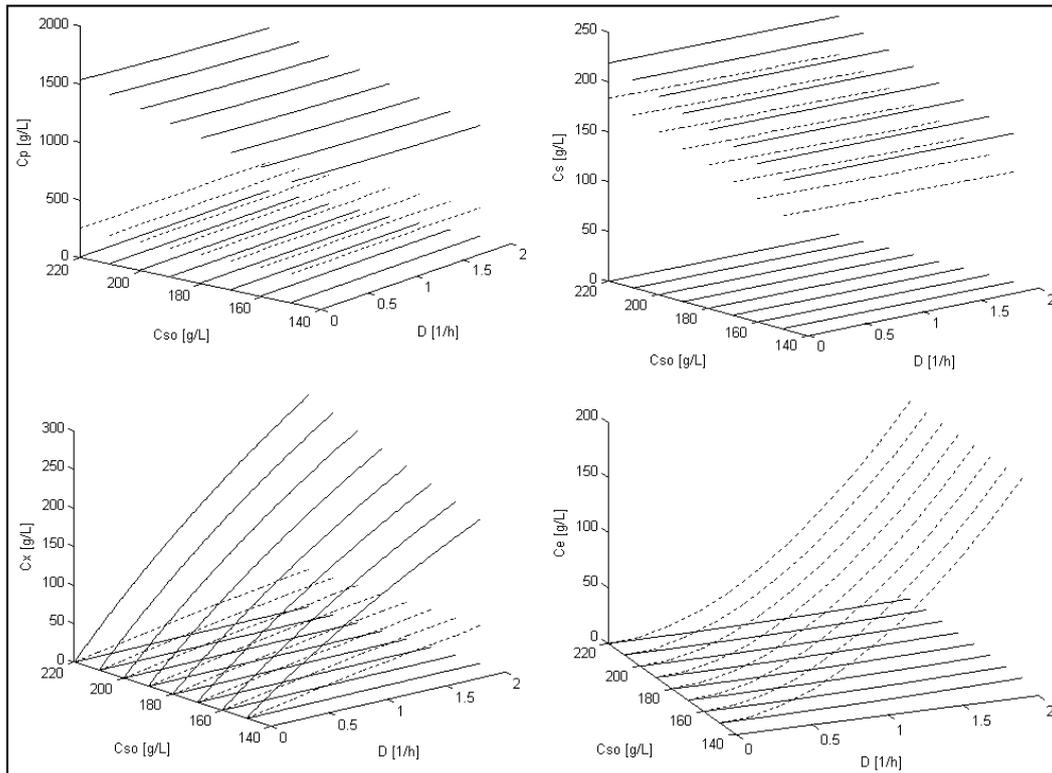


Figura 5.15: Diagramas de Bifurcação de codimensão-2 para o modelo de Jöbbses θ_3 .

Nas Figuras 5.12 e 5.13 é possível observar claramente a tendência de extinção da multiplicidade de estados com a diminuição da concentração de substrato na corrente de alimentação. Em contrapartida, o ramo de baixas conversões não apresenta sensibilidade à variações de C_{S0} . Este fato, somado a tendência proporcional de aumento da região de alta conversão com C_{S0} , está possivelmente associado à característica do modelo de não levar em consideração a inibição por substrato. Esta característica também foi apresentada pelos modelos de Jöbbses θ_2 e θ_3 , sendo este um dos principais pontos negativos em relação à estrutura de modelo. Entretanto o modelo de Jöbbses θ_1 apresentou a capacidade de prever *wash-out*, característica que não ocorre nos demais modelos ajustados.

Nos diagramas de C_P e C_E da Figura 5.14, bem como no diagrama de C_E da Figura 5.15, os ramos de solução de maiores conversões não foram graficados, a fim de melhorar a resolução gráfica dos ramos com significância prática.

Como apresentado no capítulo 4 através da comparação entre o comportamento dinâmico de cada modelo ajustado e do modelo original, frente os resultados experimentais obtidos em fermentações laboratoriais, o modelo ajustado Jöbbses θ_3 foi o modelo que aparentemente era o mais indicado a representar fermentações de *Z. mobilis*, entretanto, através do mapeamento de seus estados de equilíbrio é constatado que este não apresenta as principais características observadas em

fermentações de *Z. mobilis*, que seriam a existência de multiplicidade de estados estacionários, inibição por substrato e existência de *wash-out*.

Ao levar em consideração todas estas características, associadas ao ajuste apresentado pelo modelo aos dados experimentais, sugere-se que o melhor modelo para a representação deste tipo de sistema seria o modelo de Jöbses alimentado com o conjunto de parâmetros θ_1 . Apesar deste modelo não ser capaz de representar de forma satisfatória os dados da Fermentação 1, apresentou maior representatividade que o modelo original de Jöbses. Adicionalmente quando analisado através de diagramas de bifurcação, este foi capaz de representar de forma efetiva o fenômeno de *wash-out*, além de apresentar multiplicidade de equilíbrios estáveis e possuir um ponto de bifurcação do tipo Hopf, característico de sistemas oscilantes.

O fato do sistema apresentar multiestabilidade abre grandes implicações do ponto de vista operacional. A operação do sistema em regiões com maior conversão de substrato em produtos implica em uma grande economia de matéria prima e obtenção de maiores margens de lucro. Para tanto, gestões como *start up* devem ser analisadas de forma a conseguir migrar o sistema para zonas de maior rentabilidade. Além disto, a análise de possíveis estratégias capazes de migrar entre os ramos durante a operação do processo devem ser propostas e avaliadas.

Capítulo 6

Inferência de Variáveis de Estado

“If you can't measure it, you can't manage it.”

Peter Drucker

6.1 Uma visão geral acerca de Bioprocessos

Microrganismos são capazes de crescer na natureza, em uma grande diversidade de substratos, sendo capazes de produzir um grande espectro de produtos. Os recentes avanços relativos a manipulação genética *in vitro* têm aumentado os produtos que podem ser obtidos através de microrganismos, além de gerado novos métodos para obtenção de novas cepas a partir das existentes. A exploração comercial da diversidade de compostos de microrganismos resultou no desenvolvimento da indústria de fermentação, que tem mostrado grande viabilidade para sobrepujar métodos de produção já consolidados (Stanbury, 1995).

Pode-se assumir que a biotecnologia teve seu marco revolucionário com a descoberta da penicilina, por Alexandre Fleming, em 1928, fato que possibilitou o desenvolvimento de uma série de antibióticos em todo o mundo. Antes disso, no final do século XX, a fermentação industrial já era uma realidade na síntese de etanol e ácido lático. Entretanto, foram as grandes guerras que motivaram a busca por bioprocessos capazes de substituir as rotas de produção convencionais (Stanbury *et al.*, 1995).

Atualmente, o desenvolvimento da indústria de bioprocessos é crescente, apresentando fortes relações de multidisciplinaridade que envolve uma grande diversidade de áreas da biologia, química e engenharia. Além disto, a reestruturação e otimização da indústria convencional de fermentações para a produção de bioenergia e biomateriais, em substituição à petroquímica, conduzirá a indústria a um novo paradigma a ser superado, as biorrefinarias (Koutinas *et al.*, 2006).

6.2 Incremento Produtivo

Historicamente, o caminho mais eficaz para a obtenção de incremento produtivo, em uma planta de bioprocessos está ligado à evolução das cepas utilizadas nos processos fermentativos (Aynsley *et al.*, 1993). Entretanto, os últimos anos apresentaram significantes avanços na área de supervisão e controle dos bioprocessos, pelo fato de possibilitar reduções nos custos de produção, incremento na conversão das reações, além de manter a qualidade do produto desejado (Yamuna Rani & Ramachandra Rao, 1999).

Atualmente, quando se trata de sistemas de controle computacional para bioprocessos, existem comercialmente uma infinidade de plataformas para análise de dados e produtos, geralmente representativos para variações genéricas da estrutura geral associada a sistemas fermentativos (Alford, 2006). A Figura 6.1 ilustra um típico sistema de monitoramento e controle

de um processo de fermentação apresentado por Liu et al. (2001), onde o controle de inventário é realizado em tempo real enquanto que as concentrações das variáveis chave são determinadas por cromatografia líquida (HPLC).

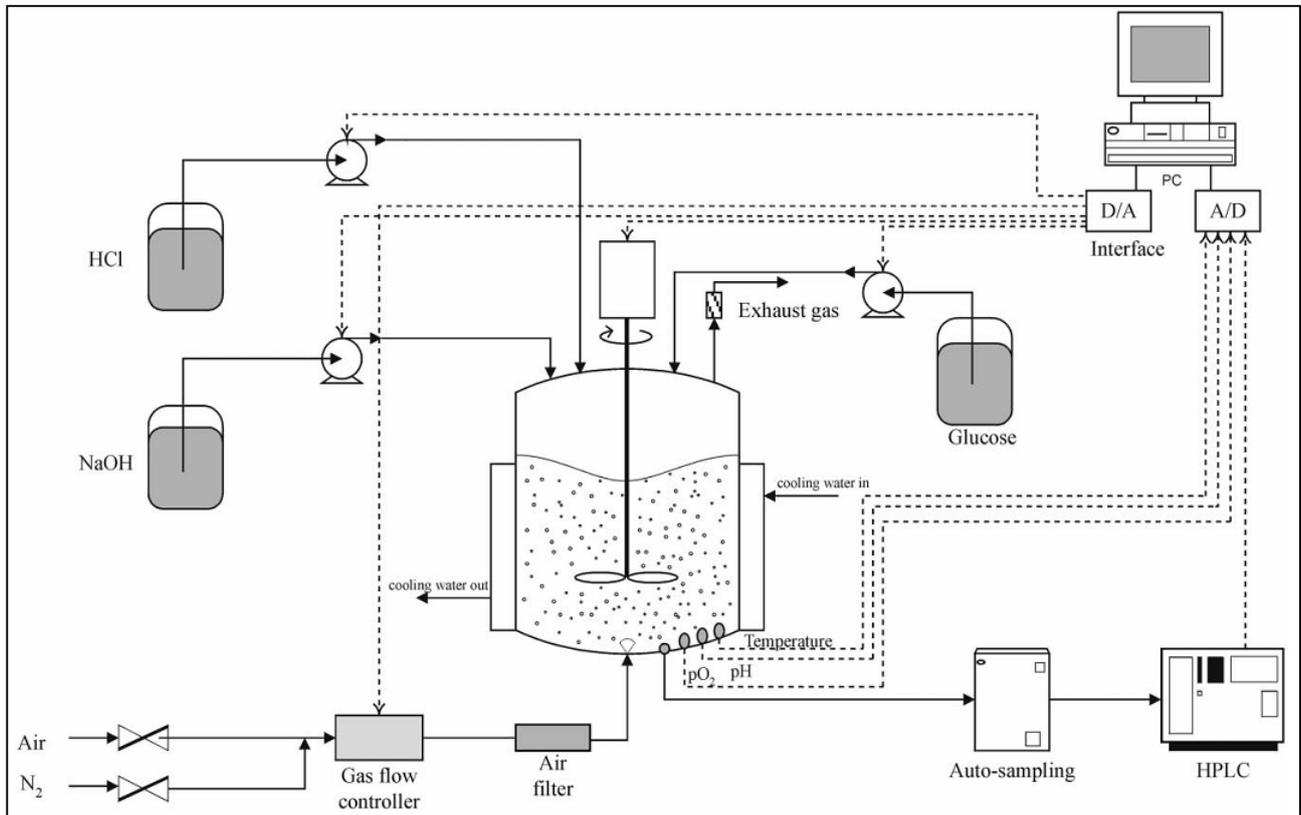


Figura 6.1: Típico monitoramento e controle de um bioprocesso. Fonte: LIU *et al.* (2001).

Com poucas exceções, a etapa de controle de biorreatores de bancada, de sistemas mais simples, é feita através de computadores pessoais com sistemas operacionais Linux ou Windows e que incorporam softwares de comunicação comerciais (e.g. Lab View). Sistemas de controle intermediários de bioprocessos, envolvem controladores lógicos programáveis (e.g. Rockwell) associados a uma máquina com interface humana e a um histórico do processo, enquanto que, sistemas de controle avançados (utilizados em plantas piloto) utilizam sistemas de controle distribuídos (e.g. Fox IA, Emerson Delta V, Fisher Provox) que são conectados a históricos pessoais ou comerciais (e.g. Aspen Tech, OSI-PI). Em alguns casos, DCS/sistema de históricos são interfaceados com produtos de terceiros (e.g. gerenciador de alarmes, software de análise avançada de dados) para gerar funcionalidades adicionais (Aford, 2006).

Controle de bioprocessos é definido como sendo o provedor de um ambiente de crescimento ótimo para microrganismos e obtenção de um determinado produto desejado. Esta função inclui o

provimento da quantidade certa de nutrientes para a cultura (e.g. carbono, nitrogênio, oxigênio, fósforo, enxofre, dentre outros minerais), remoção de qualquer produto tóxico ao metabolismo (e.g. CO₂) e controle de importantes parâmetros celulares internos (e.g. temperatura, pH).

Teoricamente, o objetivo do controle e intensificação de bioprocessos inclui não apenas a seqüência de etapas que conduzem até o início do processo de fermentação e a fermentação propriamente dita, mas também as etapas de pós-tratamento para a recuperação e purificação dos produtos. A Figura 6.2 apresenta algumas etapas de pós-tratamento para sistemas de fermentação, iniciando o processo nos produtos obtidos da fermentação e finalizando na obtenção de matérias primas para as mais diversas indústrias. Por exemplo, seguindo da fermentação etapas subseqüentes podem envolver a ruptura da parede celular, liberando no meio reacional os produtos desejados e gerados no interior da célula. Após a eliminação destes produtos, especialmente para bioprocessos com células animais, existe uma seqüência de operações unitárias que devem ser aplicadas para extinguir vírus que possam existir nas correntes de produto como resultado do uso de certas linhagens de células animais (Aford, 2006).

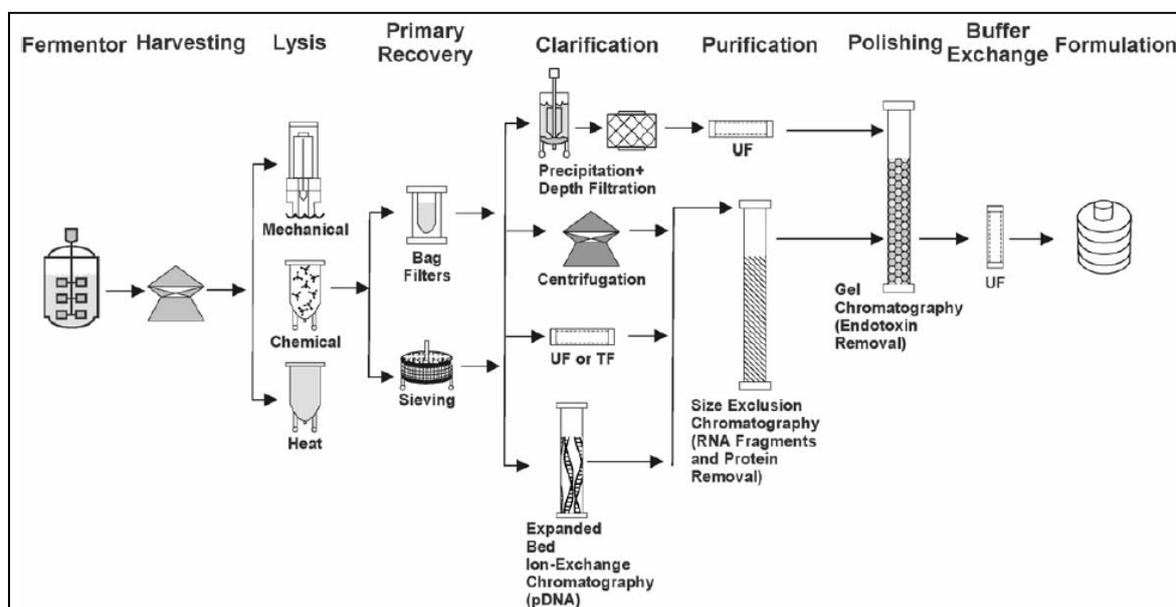


Figura 6.2: Exemplo de pós-tratamento genérico aplicado a fermentações. Fonte: Aford (2006).

6.3 Variáveis de processo

Em processos químicos ou bioquímicos, certas propriedades são de difícil aquisição, seja pelos custos proibitivos de analisadores em linha ou pela inexistência de técnicas de determinação

on line (Diehl *et al.*, 2009). Assim torna-se comum quantificar as variáveis chaves de bioprocessos através de análises laboratoriais ou cromatográficas, o que é responsável por limitar o desempenho em malha fechada devido ao elevado atraso de tempo para a realimentação. Isto porque os controladores requerem uma realimentação mínima de informações do processo. Para minimizar esse problema de realimentação deve ser considerado principalmente:

- Desenvolvimento de biosensores;
- Melhora nos sistemas de amostragem e sistemas de análise automática;
- Utilização de técnicas de estimação *on line*.

Grandes pesquisas são feitas no desenvolvimento de sensores aplicáveis a bioprocessos, já que grande parte dos sensores existentes não são aplicáveis à grande variedade de processos que utilizam algum tipo de microrganismo. Bioprocessos usualmente oferecem um ambiente severo para sensores, já que o crescimento da cultura pode infiltrar no sensor e invalidar seus resultados. Além disto, meios de cultura com características desconhecidas podem conter substâncias que interferem com as leituras dos sensores. Sensores *in situ* não devem oferecer chances de contaminação ao meio de cultura, portanto, devem ser passíveis de esterilização e seus componentes não devem oferecer perigo de contaminação para a cultura. Os sensores que satisfazem apenas em partes estes requisitos são desqualificados por não serem válidos para a utilização neste tipo de processo. Devido a estes obstáculos, os sensores necessitam de certo nível de maturidade antes de serem habilitados para a utilização no monitoramento de bioprocessos, e muitos sensores são descartados antes de atingirem este nível (Aford, 2006).

É de suma importância a medida de variáveis críticas de processo de forma rápida e eficiente, especialmente parâmetros que são utilizados em *loops* fechados de controle. Existem diferentes métodos de medir estes parâmetros, cada um com suas vantagens e desvantagens associadas.

6.4 Transdutores associados a Bioprocessos

Segundo Webster (1999) as principais características dos transdutores usados em bioprocessos são a acuracidade, precisão, resolução, sensibilidade, confiabilidade e praticidade. Além disso, quando se fala em bioprocessos é essencial atentar para os riscos de contaminação do

meio. Uma barreira segura deve ser mantida entre o interior e o exterior de fermentadores e tal restrição varia conforme o princípio do medidor utilizado.

Em relação à medição é conveniente separar os diferentes tipos de sensores de acordo com a seguinte classificação: *in situ*, *on line* e *off line*. Sensores *in situ* estão diretamente em contato com o meio, o que torna a medição intrusiva mesmo que o elemento sensor não seja (i.e., existência de membranas). As respostas desse sensor são geralmente rápidas devido a sua proximidade com o meio, porém apresenta certa resistência a esterilização. Sensores *on line* não ficam em contato com o meio, uma amostra é retirada e seu tempo de resposta é maior do que o sensor *in situ*. Contudo o tempo de resposta é consistente com outras constantes de tempo do sistema. Por fim, os sensores *off line* são utilizados para análises mais complexas, as amostras retiradas passam por procedimentos laboratoriais e o tempo de resposta é excessivamente elevado (McMillan, 1999).

Os transdutores também podem ser classificados pelo tipo de variável medida. Sensores físicos medem grandezas físicas (temperatura, pressão, vazão, etc.) e são em geral bem estabelecidos. Já os sensores químicos quantificam espécies químicas básicas (pH, O₂, CO₂, condutividade, etc.). Requerem certa manutenção, mas mesmo assim são considerados bem consolidados. Por último os sensores bioquímicos medem espécies diretamente envolvidas em biorreações (biomassa, substrato, produto, etc.). Um exemplo são os sensores óticos, que permitem monitorar componentes extra e intracelulares, sem interferir no bioprocessos (Scheper *et al.*, 1999).

Nos últimos anos os sensores óticos vêm se tornando cada vez mais importantes em aplicações biotecnológicas. Detectores óticos podem ser interfaceados através do vidro de escotilhas de reatores. Assim sendo, trata-se de um método de medida *in situ*, não-invasivo e em tempo real (Hantelmann *et al.*, 2006; Scheper *et al.*, 1999). Todo tipo de espectroscopia é possível através dessa técnica. Neste contexto os sensores de fluorescência vêm sendo investigados na determinação de biomassa e células viáveis, caracterização do biorreator, estudos metabólicos (i.e. transição aeróbica/anaeróbica) e, principalmente, no monitoramento de bioprocessos. O princípio dos espectrofluorômetros se baseia na re-emissão de luz com mudança espectral, que algumas espécies químicas sofrem. Determinados comprimentos de onda são enviados ao meio reacional, excitando eletronicamente certas substâncias químicas. Ao retornar ao seu estado inicial, tais componentes emitem ondas de diferentes comprimentos que são filtradas por lentes e processadas por um sistema de aquisição de dados (Solle *et al.*, 2003; Hitzmann *et al.*, 1998).

Além da espectroscopia de fluorescência, outras técnicas são descritas na literatura para um monitoramento mais aprimorado em bioprocessos. O mais tradicional é a cromatografia que permite quantificar a concentração de diversas espécies químicas simultaneamente (Vogel e Todaro, 1997).

A cromatografia gasosa é mais utilizada para componentes leves, enquanto que a líquida é mais utilizada em bioprocessos. As maiores desvantagem da cromatografia estão relacionadas à necessidade de retirada de amostras do meio e ao considerável tempo de atraso inerente ao método de análise.

Dentre os métodos não invasivos, a espectroscopia de fluorescência 2D é a técnica que mais vem chamando atenção, nos últimos anos, quando o assunto é determinação em tempo real de informações ligadas ao estado metabólico de sistemas fermentativos. Essa análise possibilita a geração de inúmeros dados, que associados a técnicas de aprendizagem de máquina e mineração de dados (PCA, ICA, PCR, PLS, QPLS, redes neurais, etc.) podem determinar: transições aeróbicas/anaeróbicas, concentrações de espécies químicas (substrato, produto, etc.) e biológicas (biomassa), através do monitoramento de metabólitos como o NAD(P)H.

Análises de espectroscopia de infravermelho (*infra-red*) também são propostas e baseiam-se no princípio de que cada estrutura química tem uma forma e tamanho característico na banda de absorção (devido a vibrações específicas de ligações químicas que correspondem a níveis de energia ou níveis vibracionais). Devido a interferências e similaridades entre as bandas, são necessários avançados métodos de análise de dados (i.e., calibração de modelos multivariáveis). A espectroscopia de infravermelho de baixo comprimento de onda (700-1100 nm) pode ser utilizada para monitoramento da concentração de etanol em fermentadores, por exemplo, com a utilização de cabos de fibra ótica (Mazarevica *et al.*, 2004). Outro método de identificação é a chamada espectroscopia de Raman, que se baseia numa técnica fotônica de alta resolução baseada na dispersão de luz monocromática em determinada frequência. A luz que se mantém na frequência original é chamada de dispersão de Rayleigh e não revela informações sobre a estrutura química do material. A luz que muda de frequência é chamada de dispersão de Raman e revela informações sobre a composição do material analisado (Shaw e Kell, 1999). A característica comum entre essas técnicas é que praticamente todas necessitam da análise de dados por métodos avançados (i.e., regressões multivariáveis) e existem poucos trabalhos na literatura que descrevem o monitoramento em tempo real de bioprocessos por espectroscopia de infravermelho ou de Raman.

6.5 Medidas de Processo

A descrição das metodologias comumente utilizadas para a caracterização de processos aqui apresentados foi baseada em Alford (2006). Mais detalhes podem ser obtidos no referido trabalho deste autor.

6.5.1 Sensores Primários *in situ*

Um pequeno número de diferentes sensores *in situ* é comumente utilizado em bioprocessos. Dentre estes estão incluídos sensores de temperatura, pressão, fluxos de gás, agitação, gases dissolvidos e pH. Algumas outras medidas são utilizadas em fermentações específicas, como índice redox (oxidação redução), densidade óptica, dentre outros. Além destas, em certas situações, sensores redundantes são utilizados como sondas eletroquímicas de pH e oxigênio dissolvido).

O desafio acerca do desenvolvimento de novos sensores *on-line* esta na necessidade deste operar em ambientes demasiadamente complexos, mantendo sua calibração por um período elevado de tempo.

6.5.2 Sensores Primários *em linha*

Diversas medidas analíticas adicionais são obtidas através de sensores em linha, gerando informações em períodos específicos de tempo, de grande importância na caracterização do bioprocessos. Comercialmente, são encontrados diversos mecanismos de amostragem automática, entretanto, suas limitações ainda são a utilização de operações manuais para a coleta e preparo de amostras, além dos elevados custos de aquisição, manutenção e operação destes equipamentos.

6.5.3 Tecnologias analíticas aplicadas a bioprocessos

Diversas tecnologias analíticas apresentam aplicações em bioprocessos. Estas ferramentas apresentam grande importância na caracterização de processos, em tempo real ou próximo a isto. Dentre as técnicas mais empregadas podemos ressaltar a análise gasosa e determinação da composição do meio reacional.

Um analisador de gases utiliza normalmente o processo de espectrometria de massa para determinar a composição da atmosfera do reator. Este sistema usualmente fornece informações acerca da concentração de oxigênio, nitrogênio e dióxido de carbono no interior do reator, além de também poder informar concentrações de outros possíveis componentes destes gases, como alcoóis, hidrogênio, etc. As informações deste tipo de equipamento são normalmente associadas com as informações de outros sensores *on line* de forma a possibilitar a obtenção de informações em tempo

real acerca do bioprocesso. A Figura 6.3 apresenta um gráfico de captação de oxigênio versus tempo para um dado processo. Através desta figura pode ser exemplificada a utilização de uma medida de processo com o objetivo de inferir a característica geral do crescimento microbiano. Através da avaliação do comportamento do gráfico de captação de oxigênio no tempo é determinado o instante onde termina o crescimento microbiano exponencial.

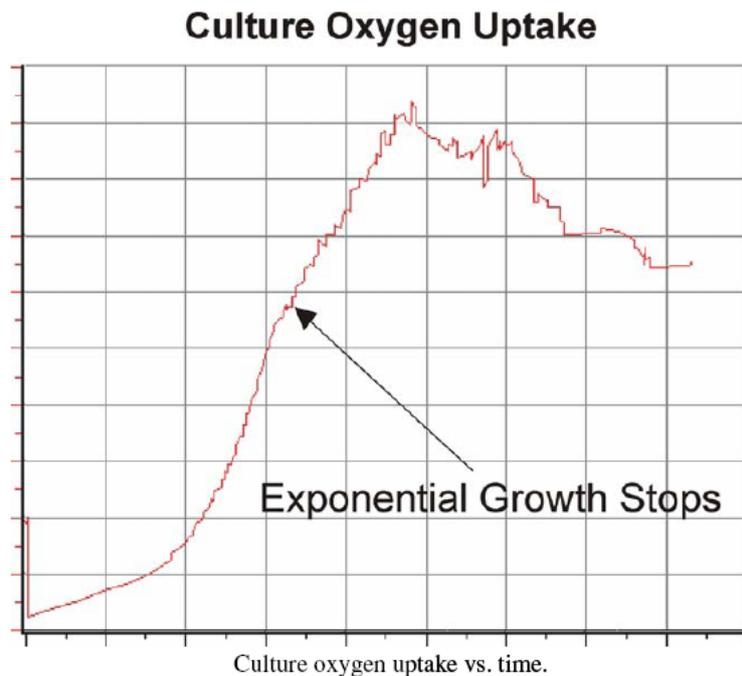


Figura 6.3: Captação de oxigênio versus tempo. Fonte: Aford, (2006).

6.5.4 Sensores virtuais

Apesar das tecnologias citadas anteriormente para a obtenção de informações quantitativas e qualitativas sobre bioprocessos, ainda existem alguns desafios a serem solucionados. Dentre os mais críticos podemos destacar a necessidade de determinar a concentração de células, substrato e produto em tempo real durante fermentações que utilizam meios complexos ou até mesmo compostos por particulados sólidos. Acuracidade na estimação destes parâmetros é importante, já que a maioria dos modelos publicados para bioprocessos incluem as concentrações de biomassa, substrato e produto como variáveis de estado primárias. A utilização de sensores virtuais tem apresentado resultados positivos para a estimação de parâmetros de fermentação. Estes sensores utilizam informações disponíveis *on line*, associadas a modelos (e.g., regressão estatística, redes neurais, dentre outros modelos) para prever os parâmetros da fermentação, que de outra maneira seriam impraticáveis de determinação direta. Muitos dos sensores virtuais utilizados atualmente

fazem uso da informação de oxigênio ou dióxido de carbono captado durante a cultura, como variáveis chave de entrada para o cálculo dos estados da fermentação, isso porque estas variáveis são intimamente correlacionadas ao metabolismo celular.

A Equação (6.1) apresenta um claro exemplo aplicado a bioprocessos onde a determinação de um estado, concentração de células, é feita através da utilização de uma variável *on line* - atividade de respiração celular - como variável de entrada.

$$CER = k_1 \cdot \frac{dC_X}{dt} + k_2 \cdot C_X \quad (6.1)$$

Na equação acima, a variável *CER* (atividade de respiração celular) é dependente de duas atividades realizadas pela população de células. A primeira atividade é referente ao crescimento celular, proporcional à dC_X/dt , e a segunda é referente ao metabolismo de manutenção das células, sendo esta proporcional à C_X . O ajuste da Equação (6.1) ao histórico de C_X e a resultados experimentais de *CER* permite a determinação das constantes k_1 e k_2 . Com o modelo de *CER* já ajustado e com medições *on line* da variável *CER*, é possível inferir o valor de C_X e utilizá-lo como fonte de informações contínuas a serem utilizadas para a tomada de decisões através de sistemas de controle.

Como processos em batelada ocorrem em tempo real, pequenos erros na estimação de C_X no início do processo são aceitáveis, como no momento quando o inóculo é transferido ao fermentador. Apesar de sensores virtuais apresentarem boa acuracidade durante as fases de crescimento celular, existem etapas do processo onde o sensor perde a sensibilidade, principalmente em fases onde ocorre a geração de produtos. Isto ocorre porque as atividades celulares envolvidas no processo de geração de produtos ainda não são entendidas completamente e fenômenos de morte celular e/ou inibição por produtos podem ocorrer.

6.6 Metabolismo de *Z. mobilis* e manutenção do pH

Z. mobilis promove o catabolismo anaeróbico de glicose através da via de Entner-Doudoroff, via esta usualmente atribuída a microrganismos aeróbios. Ao contrário dos microrganismos aeróbios, *Z. mobilis* apresenta o ciclo do ácido cítrico incompleto (Doelle *et al.*, 1993). A Figura 6.4 apresenta as reações ocorridas na via de Entner-Doudoroff, além das principais rotas secundárias

observada no metabolismo desta bactéria. A lista contendo o nome de cada enzima presente nas etapas da via metabólica é apresentada no Anexo A.

As reações chave da via avaliada são a degradação de 6-P-gluconato para 2-ceto-3deoxi-6-P-gluconato (KDGP), pela enzima 6-P-gluconato desidratase, e a clivagem de KDGP pela enzima 2-ceto-3-deoxi-6-P-gluconato aldose, gerado um mol de piruvato e um mol de gliceraldeído-3-P. Posteriormente, gliceraldeído-3-P é parcialmente oxidado a piruvato, promovendo a redução do NADP^+ a NADPH . O balanço final para cada mol de glicose ou frutose degradado é de 2 moles de ATP, gerados através da oxidação parcial de gliceraldeído-3-P a piruvato, para um mol de ATP consumido na fosforilação de glicose a glicose-6-P. O saldo energético é de um mol de ATP, ocorrendo duas reduções de NADP^+ a NADPH , o que gera um desequilíbrio no balanço de NADP^+ a NADPH . O equilíbrio necessário é restabelecido pela re-oxidação de NADPH a NADP^+ , pela descarboxilação de piruvato a acetaldeído, seguida da redução deste à etanol. Outros produtos, em menores quantidades, também podem ser gerados, como lactato, acetaldeído, acetato, formato e glicerol (Swings e Deley, 1977).

A glicose metabolizada a etanol por *Z. mobilis* fornece rendimentos de 95 a 98% do máximo teórico, sendo a equação estequiométrica, em base molar, da fermentação de glicose por esta bactéria apresentada na Equação (6.2). Esta equação foi obtida de forma empírica para a linhagem ATCC 10988 (Kluyver e Hoppenbrouwers, 1931).



Dependendo do meio de crescimento empregado, apenas 1,5 a 5% da fonte de carbono é usada para o crescimento celular. O desacoplamento energético do metabolismo com o crescimento bacteriano pode explicar a maximização da formação de etanol (Rogers *et al.*, 1982).

Através do metabolismo de *Z. mobilis*, a liberação de moles de ácido acético promove a diminuição do pH do meio, e como todo microrganismo possui uma faixa ideal para a operação ótima, é necessário promover o monitoramento do pH do meio, bem como sua manipulação. Como o pH tende a baixar durante o processo de fermentação é comum utilizar soluções de hidróxido de sódio, adicionada de forma discreta para elevar e manter o pH estável em 5,5, valor considerado ideal para cultivos da linhagem ATCC 29191 de *Z. mobilis*. Além dos moles de ácido acético gerados, os moles de CO_2 também são adicionados ao meio devido ao metabolismo celular, entretanto, estes são removidos através do mecanismo de agitação do reator e eliminados através do condensador acoplado ao reator. Caso quantidades de água, etanol ou demais substâncias sejam

arrastadas para fora do sistema, estas tendem a condensar no condensador e retornar ao meio reacional, de forma que apenas o CO_2 seja eliminado do reator (Malvessi, 2008).

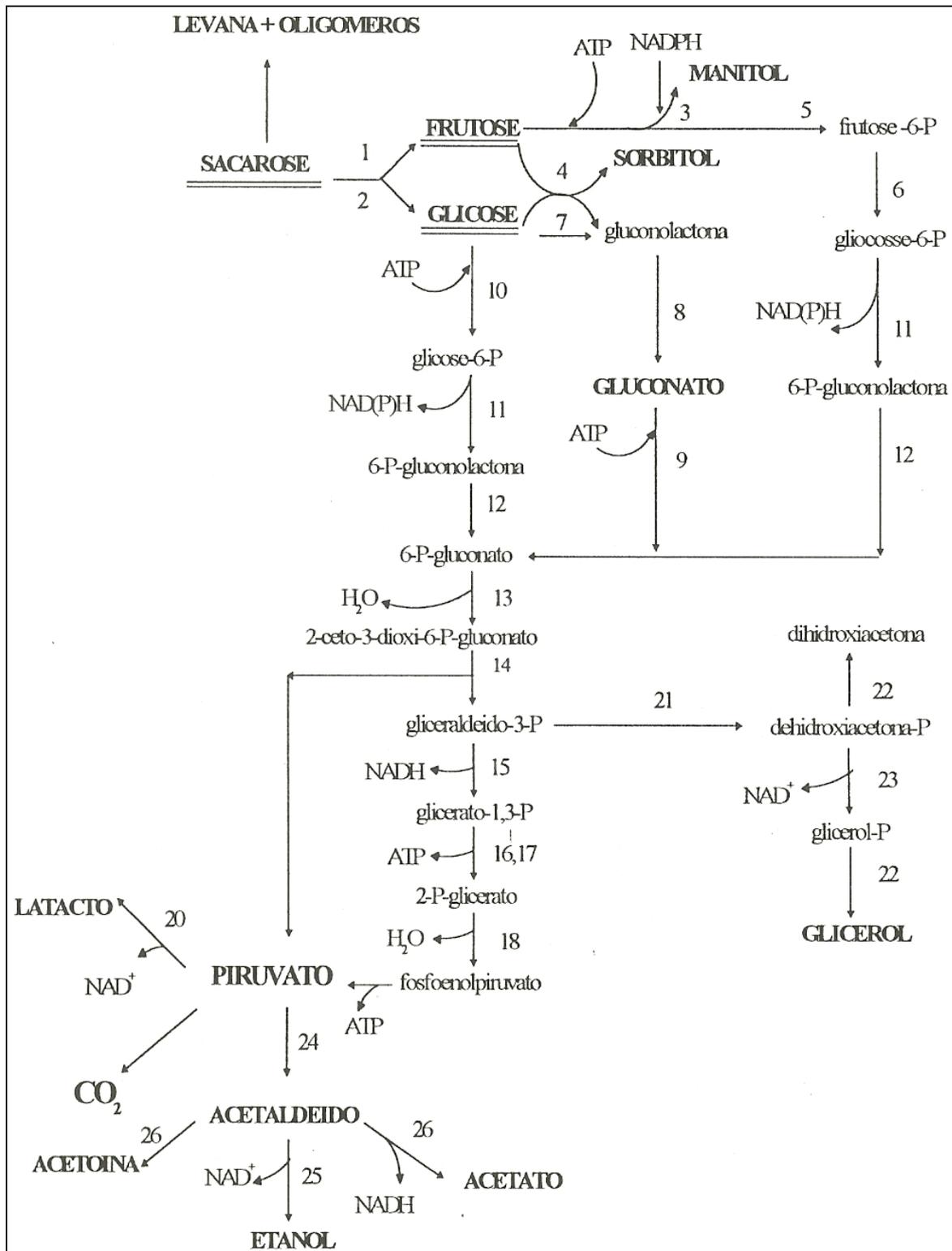


Figura 6.4: Vias metabólicas de formação de produtos da fermentação de carboidratos por *Z. mobilis*. A lista de enzimas encontra-se no ANEXO A. Fonte: Bertasso (1996).

6.7 Inferência de estados associada ao controle de pH

Como pode ser visto através da Equação (6.2), o crescimento celular está nitidamente associado à produção de etanol, dióxido de carbono e ácido acético. Esta relação direta implica em possibilitar a construção de um sensor virtual capaz de relacionar alguma variável secundária tal como as grandezas de inventário, capaz para ser monitorada *on line*, e associá-la as variáveis de estado.

Como variáveis de inventário usualmente monitoradas em processos fermentativos, encontram-se a temperatura, velocidade de agitação, pH, O₂ / CO₂ dissolvido, dentre outras. O controle do sistema de agitação é associado ao monitoramento de O₂ / CO₂ dissolvido. O monitoramento de temperatura é feito para promover o controle desta grandeza através de banhos de aquecimento ou refrigeração, dependendo das condições ambientais as quais o reator esta sujeito. O controle de pH porém, é feito através da adição de soluções alcalinas que promovem o incremento desta grandeza, anulando o efeito de diminuição provocado pelos moles de ácidos excretados pelas bactérias durante o metabolismo (Liu; Wang e Lee, 2001).

Dentre as variáveis de inventário apresentadas, nem todas são obrigatoriamente encontradas em fermentadores, afinal, sistemas de monitoramento de gases como sondas de O₂ e CO₂ dissolvido apresentam um elevado custo de aquisição, entretanto, significativamente menores do que sensores em linha como HPLC, o que não inviabiliza sua utilização em sensores virtuais, como apresentado na Figura 6.3. Apesar de estas informações apresentarem potencial para serem utilizadas em sensores virtuais, o objetivo é a busca por soluções com melhor custo/benefício e aplicabilidade prática.

O parâmetro que também é comumente medido em bioprocessos é o pH. O crescimento celular ótimo é fortemente dependente da faixa de operação do pH e muitas células produzem ácidos como sub-produtos do metabolismo. Sondagens de vidro, esterilizáveis com vapor, são consideradas o “estado da arte” para a utilização em bioreatores, entretanto, sua baixa estabilidade mecânica motiva a busca por novos métodos de medida, como sensores ópticos baseados em absorvância ou fluorescência (Harms; Kostov e Rao, 2002). O fato de, salvo exceções, todo sistema fermentativo fazer uso do monitoramento e controle de pH, associado ao consumo do hidróxido ou ácido utilizado em seu controle, torna esta informação uma grande alternativa/opção a ser utilizada como variável de entrada em um sensor virtual capaz de inferir concentrações de variáveis chave de processos fermentativos.

6.8 Estudo de caso

A proposta a ser avaliada é a utilização de um sensor virtual onde a variável de entrada está de alguma forma associada ao controle de pH, e a saída é composta pelas informações acerca das variáveis de estado do sistema.

A escolha do controle de pH com sendo o fomentador da entrada do sensor virtual foi feita devido a facilidade com que sistemas deste tipo são encontrados em plantas reais, além da existência de uma profunda relação entre o metabolismo celular e a variação de pH do meio.

A Fermentação 2, apresentada no Capítulo 4 é utilizada para a estimação de conjuntos de parâmetros, sendo avaliada a viabilidade de utilizar as informações advindas do sistema de controle de pH para a inferência das variáveis de estado do sistema. Apesar desta fermentação não ter sido idealizada para este fim, o fato da informação de consumo de hidróxido ter sido obtida apenas como informação adicional, habilita a utilização destes dados para a utilização nesta análise de viabilidade do método sugerido.

O controle do pH reacional foi realizado através de um controlador (*pHstat*) que, ao avaliar o sinal da sonda de pH, acionava a bomba peristáltica ligada a um compartimento (bureta) contendo hidróxido de sódio 5M. No controlador foi informado o *setpoint* do processo como sendo 5,5, o qual era mantido efetivamente entre 5,5 e 5,52, faixa aceitável para o processo fermentativo. O reservatório de hidróxido de sódio, conectado ao controlador tratava-se de uma proveta de 50 mL. A saída desta proveta alimentava a bomba peristáltica que por sua vez, ao ser acionada adicionava o conteúdo desta ao bioreator. O fato do reservatório de hidróxido ser um instrumento analítico, com graduação volumétrica, foi escolhido propositadamente de forma a possibilitar a obtenção do volume de hidróxido adicionado ao meio reacional em cada instante de tempo. A leitura do nível de NaOH consumido era feita periodicamente, juntamente com a amostragem do meio fermentado. Apesar deste conjunto de dados, especificamente, ser pequeno, a possibilidade deste tipo de informação ser obtida de forma *on line*, com leitura independente do restante do processo, pode ser facilmente implementada através da aquisição de um mecanismo para medida de nível, que se trata basicamente de um medidor de pressão diferencial, medidor este de custo relativamente baixo e fácil instalação, ou ainda, de forma mais fácil e eficiente, na utilização de células de carga que permitirão acompanhar a massa de hidróxido consumida.

A Figura 6.5 apresenta as informações relativas ao consumo cumulativo de hidróxido de sódio durante o período de fermentação. Este gráfico apresenta o volume total de hidróxido de sódio adicionado ao meio reacional em relação ao tempo.

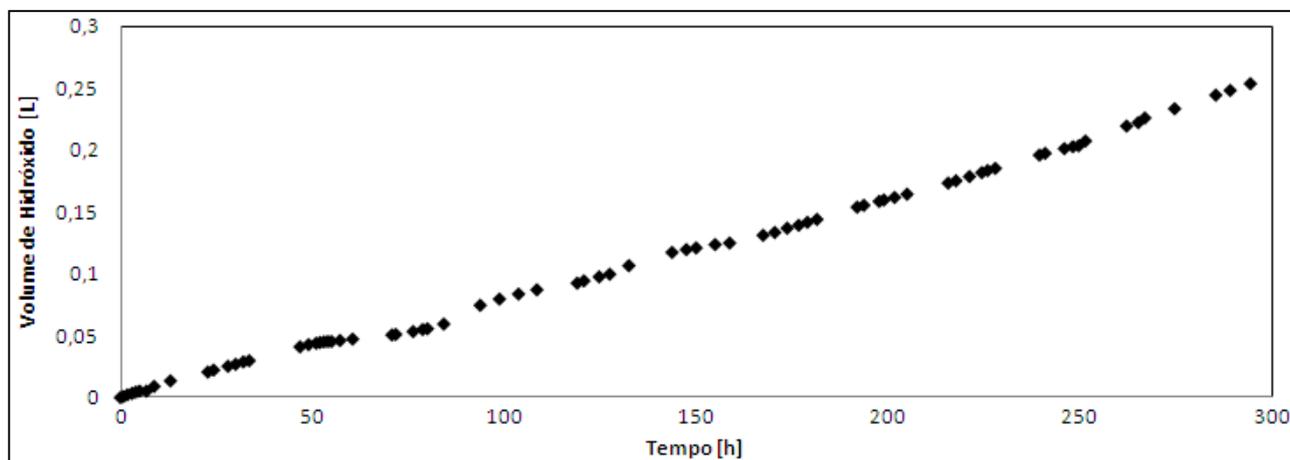


Figura 6.5: Volume cumulativo de hidróxido de sódio adicionado durante a Fermentação 2.

Na Figura 6.6 é apresentado o comportamento dos estados da Fermentação 2. Mais informações acerca da obtenção dos dados desta fermentação podem ser obtidas na seção 4.2.2 e 4.5.1.

O sensor virtual proposto para inferir os estados apresentados na Figura 6.6 deverá ser capaz estimar estes estados fazendo uso das informações contidas na Figura 6.5, além de fornecer informações com características apenas qualitativas, como o observado, por exemplo na Figura 6.3, este sensor deverá ser capaz de apresentar resultados quantitativos acerca dos estados avaliados.

Através de uma análise primária dos dados experimentais, a associação direta entre o consumo cumulativo de hidróxido e as variáveis de estado do sistema fermentativo não foram possíveis, pois ambas as informações apresentam comportamentos característicos muito diferentes. Entretanto, analisando a curva do consumo cumulativo de hidróxido observou-se variações em sua inclinação, o que indica variações na taxa do consumo de hidróxido no decorrer do cultivo.

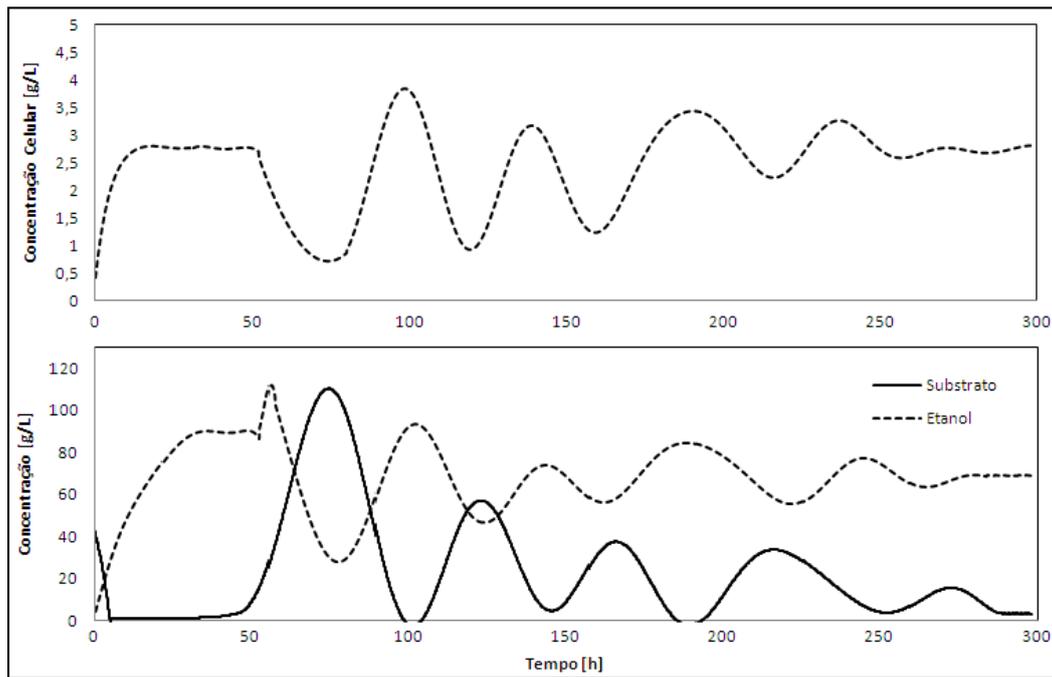


Figura 6.6: Comportamento das variáveis de estado da Fermentação 2. Dados experimentais.

A obtenção da taxa de consumo de hidróxido (T_B) é feita através da diferenciação dos dados de consumo de hidróxido no tempo dada pela Equação (6.3), onde B representa o consumo cumulativo de hidróxido de sódio. Este procedimento é feito de acordo com o procedimento adotado para promover a diferenciação das variáveis de estado adotado na seção 4.5.1. Como os dados experimentais do consumo de hidróxido apresentam uma amostragem irregular, além de serem compostos por poucos pontos para representar a dinâmica do processo, foi promovido o ajuste de funções contínuas a estes dados experimentais, de forma a obter melhores resultados para a taxa de consumo de hidróxido. Esta etapa é necessária apenas devido a baixa quantidade de dados experimentais. Caso a amostragem destes dados fosse maior, a obtenção T_B poderia ser feita através da aplicação direta de alguma técnica de diferenciação, como *B-Spline*.

$$T_B = \frac{dB}{dt} \quad (6.3)$$

Como a taxa de consumo de hidróxido apresenta variações no tempo, aparentemente, esta informação pode vir a representar melhor a dinâmica do processo. A Figura 6.7 apresenta o resultado obtido para o processo de diferenciação dos dados de consumo de hidróxido durante o período da Fermentação 2, graficados juntamente com o comportamento dos estados para esta fermentação. Através desta figura é possível perceber que a informação da taxa de consumo de hidróxido apresenta dinâmica similar ao observado nos estados, principalmente para regiões onde

existe o aparecimento de oscilações, indicando que esta informação, aparentemente, pode ser utilizada para a inferência das variáveis de estado de fermentações contínuas de glicose com a bactéria *Z. mobilis*. Apesar desta dinâmica semelhante, o sinal da taxa de consumo de hidróxido parece ser adiantado em relação aos demais estados, provavelmente devido a mudança no metabolismo celular ser sinalizada mais rapidamente como resposta do pH do que pelas variáveis de estado. Este fenômeno pode ser corrigido através da utilização de um modelo que leve em consideração esta dinâmica distinta entre as variáveis.

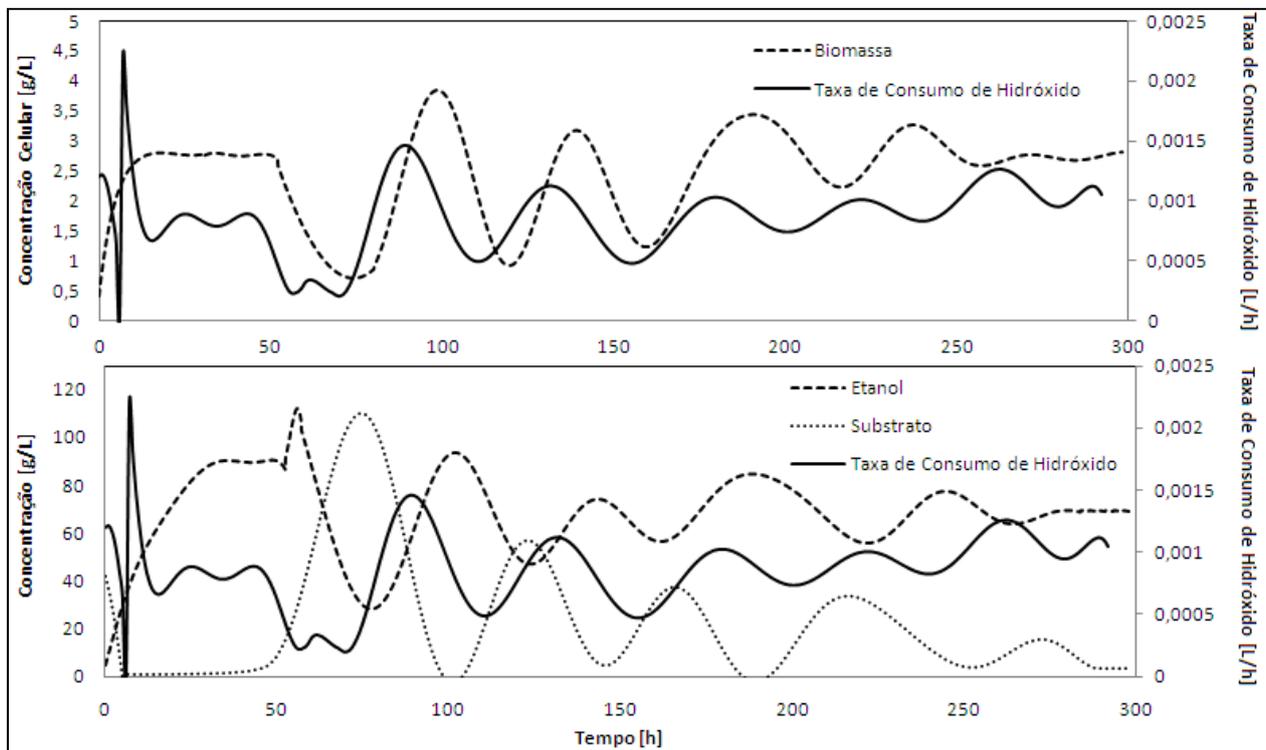


Figura 6.7: Comportamento das variáveis de estado e da Taxa de consumo de hidróxido da Fermentação 2.

Caso o sistema não apresentasse este comportamento defasado, seria possível propor funções estáticas para serem utilizadas nos sensores virtuais, mas que neste caso resultariam em maiores diferenças entre as variáveis de estado medidas e inferidas. Por este motivo optou-se pela utilização de funções dinâmicas para representação dos sensores virtuais.

6.9 Ajuste de modelos dinâmicos

O sensor virtual consiste basicamente de um modelo contínuo, capaz de converter as entradas, usualmente variáveis de obtenção mais simples, em variáveis com características mais importantes ao processo, seja devido à necessidade da utilização destas no sistema de controle ou para a própria caracterização do sistema fermentativo. Diversas estruturas de modelo foram testadas para converter o sinal da taxa de consumo de hidróxido nos estados característicos do sistema, entretanto, serão apresentados apenas os modelos que melhor estimaram os estados a partir da informação da taxa de consumo de hidróxido.

A estrutura de modelo que proporcionou a obtenção de melhores resultados na inferência das concentrações de etanol e biomassa foi a de função de transferência de primeira ordem, com adição do termo de representação do tempo morto. As Equações 6.4 e 6.5 apresentam os modelos genéricos a serem ajustados para os inferidores de concentração de biomassa e substrato.

A variável $G(s)$ indica a divisão entre $\Delta Y / \Delta U$, onde Y representam as variáveis de saída, e U as variáveis de entrada. A obtenção de cada sensor virtual consiste em obter a função $G(s)$ para cada um dos estados a serem inferidos. O sensor virtual para a concentração de substrato também trata-se de uma função de transferência, entretanto o modelo utilizado neste caso foi do tipo linear. A Equação (6.6) apresenta a estrutura genérica deste modelo.

$$G_1(s) = \frac{\Delta C_X}{\Delta T_B} = \frac{K_{p1}}{1 + \tau_{p1}s} e^{-\tau_{d1}s} \quad (6.4)$$

$$G_2(s) = \frac{\Delta C_P}{\Delta T_B} = \frac{K_{p2}}{1 + \tau_{p2}s} e^{-\tau_{d2}s} \quad (6.5)$$

$$G_3(s) = \frac{\Delta C_S}{\Delta T_B} = \frac{a_3s^3 + a_2s^2 + a_1s + a_0}{b_4s^4 + b_3s^3 + b_2s^2 + b_1s + b_0} \quad (6.6)$$

O *System Identification Toolbox* foi utilizado na geração das funções de transferência que relacionam T_B com as composições de interesse (i.e., C_X , C_P e C_S). Este *toolbox* é implementado em *Matlab* e tem por objetivo a identificação de modelos a partir de dados de entrada e saída conhecidos. Os resultados obtidos para os modelos dos inferidores de estados são apresentados na Tabela 6.1.

Tabela 6.1: Sensores virtuais gerados

Sensor Virtual	$G_1(s) = \frac{\Delta C_X}{\Delta T_B}$			
<i>Variável de entrada</i>	T_B			
<i>Variável inferida</i>	C_X			
<i>Estrutura de modelo</i>	$\frac{\Delta C_X}{\Delta T_B} = \frac{K_{p1}}{1 + \tau_{p1}s} \cdot e^{-\tau_{d1}s}$			
<i>Parâmetros</i>	$K_{p1} = 3041.6$	$\tau_{p1} = 8,2055$	$\tau_{d1} = 8,8 \times 10^{-10}$	
<i>Modelo Ajustado</i>	$\frac{\Delta C_X}{\Delta T_B} = \frac{3041,6}{1 + 8,2055s} \cdot e^{-8,8 \times 10^{-10} s}$			
Sensor Virtual	$G_2(s) = \frac{\Delta C_P}{\Delta T_B}$			
<i>Variável de entrada</i>	T_B			
<i>Variável inferida</i>	C_P			
<i>Estrutura de modelo</i>	$\frac{\Delta C_P}{\Delta T_B} = \frac{K_{p2}}{1 + \tau_{p2}s} \cdot e^{-\tau_{d2}s}$			
<i>Parâmetros</i>	$K_{p2} = 79748$	$\tau_{p2} = 13,974$	$\tau_{d2} = 1,3 \times 10^{-10}$	
<i>Modelo Ajustado</i>	$\frac{\Delta C_P}{\Delta T_B} = \frac{79748}{1 + 13,974s} \cdot e^{-1,3 \times 10^{-10} s}$			
Sensor Virtual	$G_3(s) = \frac{\Delta C_S}{\Delta T_B}$			
<i>Variável de entrada</i>	T_B			
<i>Variável inferida</i>	C_S			
<i>Estrutura de modelo</i>	$\frac{\Delta C_S}{\Delta T_B} = \frac{a_3s^3 + a_2s^2 + a_1s + a_0}{b_4s^4 + b_3s^3 + b_2s^2 + b_1s + b_0}$			
<i>Parâmetros estimados</i>	$a_0 = 1,436$	$a_1 = 16,79$	$a_2 = 18,19$	$a_3 = 31,82$
	$b_0 = 4,7 \times 10^{-5}$	$b_1 = 2,7 \times 10^{-4}$	$b_2 = 0,019$	$b_3 = 0,028$ $b_4 = 1,0$
<i>Modelo</i>	$\frac{\Delta C_S}{\Delta T_B} = \frac{31,82s^3 + 18,19s^2 + 16,79s + 1,436}{s^4 + 0,028s^3 + 0,019s^2 + 2,7 \times 10^{-4}s + 4,7 \times 10^{-5}}$			

A Figura 6.8 apresenta o resultado da aplicação dos sensores virtuais para inferir as concentrações de cada uma das variáveis de estado da Fermentação 2. Através desta figura é possível concluir que os sensores virtuais ajustados para as variáveis de estado da Fermentação 2 apresentam resultados satisfatórios no procedimento de inferência de estados.

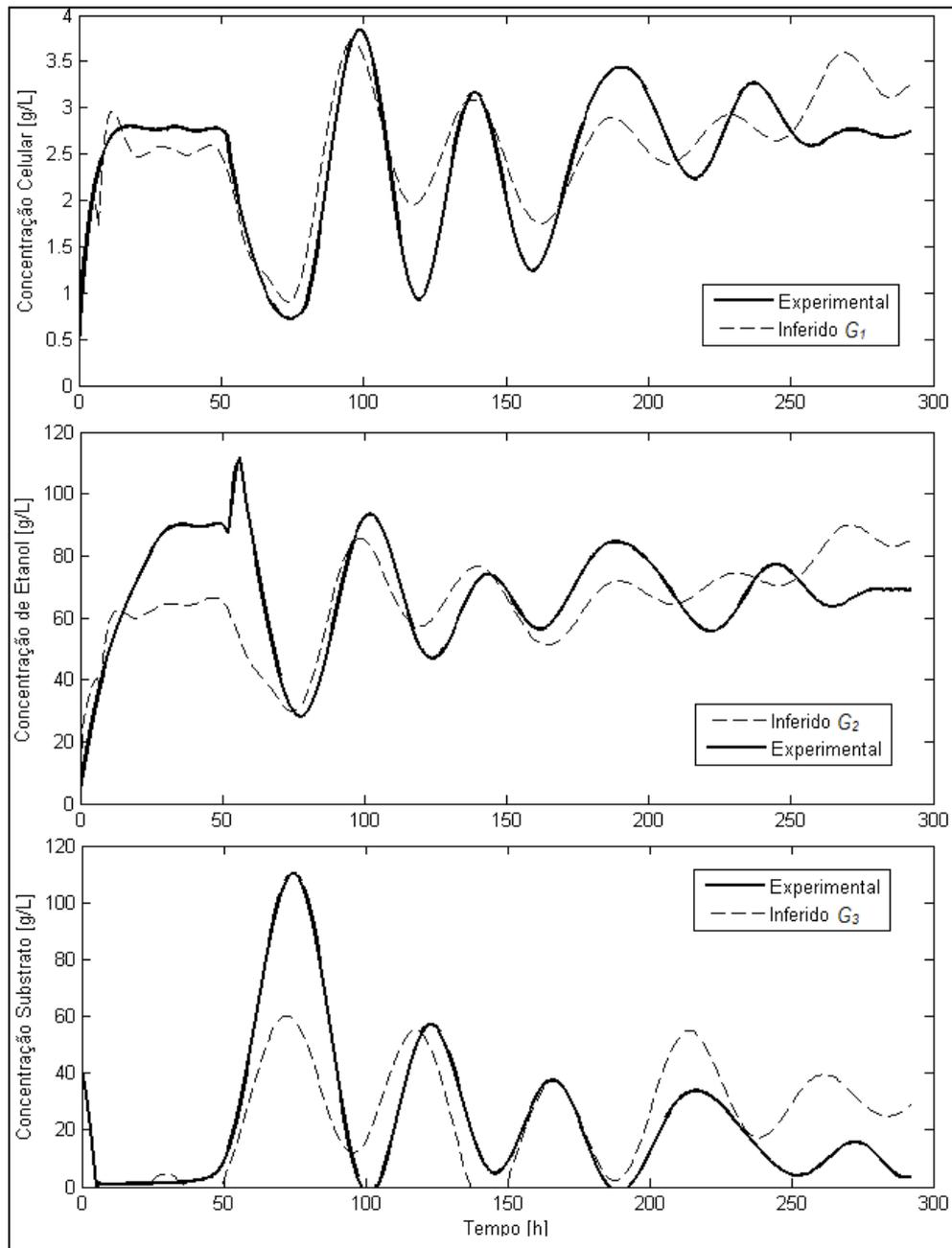


Figura 6.8: Sensores virtuais aplicados às variáveis de estado da Fermentação 2.

Todos os sensores foram capazes de reduzir significativamente a defasagem existente entre os sinais de T_B e as variáveis inferidas. O sensor virtual G_1 apresentou resultado muito satisfatório para períodos inferiores a 100 horas. Neste intervalo de tempo o erro existente entre os valores da variável inferida e da variável medida era praticamente nulo. Apesar de não apresentar uma concordância semelhante para instantes de tempo superiores a 100 horas, manteve-se coerente com as ordens de grandezas esperadas para a concentração de biomassa inferida, não apresentando defasagem significativa entre o resultado da variável inferida e a medida. De forma geral, este sensor virtual teve um bom desempenho para a inferência C_X através do sinal de T_B . A função de

transferência deste sensor possui constante de tempo da ordem de 8 horas, indicando a dinâmica lenta do sistema. A constante de tempo morto é bem pequena quando comparada com a constante de tempo, e o ganho possui um valor elevado, principalmente devido a grande diferença nominal entre a taxa de consumo de hidróxido e a concentração de biomassa.

O resultado obtido para o sensor virtual G_2 foi semelhante ao obtido com G_1 , entretanto, os valores inferidos foram mais representativos da realidade para a região onde ocorre o aparecimento de oscilações. Embora não tenha representando fielmente a variável medida (C_P), este sensor mostrou ser eficiente, capturando o comportamento da variável medida. A estrutura de sua função de transferência foi similar à observada no sensor anterior, com constante de tempo do sistema da ordem de 13 horas, indicando que a concentração de produto possui uma dinâmica de resposta mais lenta quando comparada com a velocidade de resposta da concentração de substrato. A constante de ganho deste sensor foi maior, fato que já era esperado, já que as concentrações de etanol são de ordem de grandeza cerca de 50 vezes superiores as concentrações de biomassa.

Como o modelo escolhido para o sensor virtual G_3 não possuía a mesma estrutura que os anteriores, comparações na dinâmica da concentração de substrato em relação à concentração de produtos e etanol não foi possível através da comparação entre os parâmetros ajustados para os modelos. Este sensor virtual, similarmente aos anteriores, apresentou resultado significativo na tarefa de inferir a concentração de substrato a partir do sinal de T_B . Como o sensor proposto para etanol, este foi mais representativo para a região onde ocorreram oscilações, embora tenha apresentado bom rendimento para as demais regiões.

De forma geral, o desempenho de todos os sensores virtuais propostos foi satisfatório, sendo capazes de inferir os referidos valores reais das variáveis de estado da Fermentação 2 a partir da informação obtida do consumo de base durante o processo de fermentação. Este fato demonstra a viabilidade em utilizar a informação do consumo de base para a obtenção de informações acerca das características do processo fermentativo em questão.

Este sensor apresenta grande viabilidade de implementação, principalmente devido à grande facilidade e praticidade em obter informações sobre o volume de base consumida durante processos fermentativos. Quando comparado a sistemas convencionais para a medição de concentrações - usualmente sistemas que apresentam tempo morto elevado, restringindo a utilização de estratégias de controle eficazes, além de apresentarem custos operacionais e investimentos iniciais muitas vezes impraticáveis para estudos em pequenas escalas - a possibilidade de inferir variáveis chave do processo fermentativo através de medidas relativamente simples e acessíveis, como medidas de

nível em reservatórios, a relação custo/benefício mostra o grande potencial apresentado pelo sensor virtual sugerido neste trabalho.

A utilização de inferências não exclui a necessidade da utilização de técnicas convencionais para a caracterização de bioprocessos. Ambas as técnicas devem ser utilizadas em conjunto de forma a corroborarem os resultados obtidos gerando informações para o aperfeiçoamento e desenvolvimento de novas tecnologias.

O resultado positivo obtido no processo de inferência das variáveis de estado da Fermentação 2 mostrou que o emprego de dados de T_B de melhor qualidade, proporcionaria a obtenção de resultados ainda melhores no ajuste de sensores virtuais para os sistemas avaliados. A obtenção de conjuntos de pontos mais propícios ao ajuste de sensores virtuais, pode ser feita através da utilização de sistemas eletrônicos, capazes de medir variações de volume através de transdutores de pressão diferencial, localizados em recipientes com seção transversal constante, ou através de células de carga, ou até mesmo por medidas manuais em intervalos de amostragem reduzidos. Desta forma, poderiam ser obtidos dados com intervalos de amostragem menores, capturando anuências na variação do consumo de soluções de forma mais precisa do que a obtida no experimento utilizado.

A viabilidade da proposta de caracterização de sistemas fermentativos com a bactéria *Z. mobilis* através da utilização da derivada do consumo de hidróxido ($T_B = dB/dt$) abriria a possibilidade de utilização do valor da derivada do consumo de outras soluções utilizadas para controle de pH em cultivos com diferentes microrganismos, para a inferência do valor das variáveis chave de cada processo. A possibilidade de aplicação desta metodologia em diferentes processos poderia significar a implementação de estratégias de controle mais adequadas promovendo a otimização e a evolução dos bioprocessos, uma vez que o grande limitante na otimização e controle destes processos é a dificuldade em mensurar as variáveis chave envolvidas.

Capítulo 7

Conclusões

O estudo desenvolvido sobre fermentações contínuas de glicose com a bactéria *Z. mobilis* foi baseado inicialmente na obtenção de modelos com representatividade do processo, que possibilitassem um melhor entendimento dos mesmos, além de permitir o desenvolvimento de novas tecnologias de produção.

A utilização da técnica de minimização da derivada do erro no processo de ajuste de parâmetros mostrou ser eficaz, resultando em três conjuntos de parâmetros distintos ajustados à estrutura de modelo proposta por Jöbses *et al.*, (1986) mostraram ser representativos do conjunto de dados experimentais utilizados para ajustá-los.

O uso das derivadas dos estados na função objetivo apresentou resultados satisfatórios no processo de estimação de parâmetros. O tratamento prévio aplicado aos dados experimentais, com o objetivo de melhorar o conjunto de pontos e obter resultados melhores para o cálculo das derivadas dos estados, foi imprescindível para a obtenção de conjuntos de parâmetros relevantes, permitindo que a busca por conjuntos de parâmetros representativos do processo obtivesse melhores resultados.

Os três conjuntos de parâmetros obtidos (θ_1 , θ_2 e θ_3) apresentaram comportamento condizente com o obtido experimentalmente, de forma que todos os conjuntos, aparentemente, poderiam ser utilizados para o estudo de fermentações contínuas de glicose com a bactéria *Z. mobilis*. A utilização de uma ferramenta genérica capaz de comparar as características destes modelos foi de suma importância para a continuidade do trabalho e escolha do melhor conjunto de parâmetros obtidos. A escolha da análise de bifurcação como ferramenta para a seleção de modelos, mostrou ser muito útil e de significativa relevância. A possibilidade de analisar de forma genérica o retrato de fase e dinâmica de um modelo foi essencial para a escolha do modelo ajustado. Este poderá ser aplicado futuramente em planejamento de controladores e otimização de processos produtivos.

O mapeamento das soluções estacionárias e singularidades do modelo original de Jöbses, mostrou as características deste sistema em relação a multiplicidade de equilíbrios e a ocorrência de pontos de bifurcações do tipo Hopf, caracterizado pelo aparecimento de oscilações no processo fermentativo. Estas características foram comprovadas experimentalmente, indicando que a estrutura do modelo, aparentemente, foi capaz de representar fermentações de *Z. mobilis* de forma

satisfatória. Com base neste fato, a análise de bifurcação dos modelos ajustados, possibilitou a comparação com a análise de bifurcação do modelo original e permitiu a escolha do conjunto de parâmetros θ_l como sendo o que melhor representou a dinâmica de fermentações contínuas. Este modelo apresentou retrato de fase muito similar ao apresentado pelo modelo original, possuindo multiplicidade de equilíbrios, a existência de conjuntos de soluções que compõe ramos de produção, com conversão de substratos em produtos, superiores e inferiores, o aparecimento de bifurcações tipo Hopf real, características estas ausentes nos demais conjuntos de parâmetros ajustados, possibilitando assim a escolha do conjunto a ser futuramente utilizado.

A proposta feita acerca da utilização da informação do consumo de hidróxido de sódio, solução adicionada ao meio de fermentação de *Z. mobilis* para controle de pH como variável de entrada de um sensor virtual capaz de inferir variáveis chave do processo, apresentou um grande potencial de aplicação, principalmente devido a relação custo/benefício associada a esta metodologia. Além do fator econômico, grande incentivador de sensores virtuais para bioprocessos, a possibilidade de diminuir significativamente o tempo morto associado a cada medida, viabilizaria a implementação de sistemas de controle eficientes em processos fermentativos, o que poderia implicar na obtenção de maiores produtividades e lucros.

O resultado positivo obtido na inferência das variáveis de estado, através da avaliação dos dados de variação na taxa de consumo de hidróxido, mostraram a viabilidade de aplicação desta técnica. Apesar dos resultados, no processo de inferência dos estados apresentarem erros entre as variáveis medidas e inferidas, a tendência geral do comportamento de cada variável foi claramente alcançada pelos sensores virtuais propostos.

Perspectivas

Trabalhos futuros acerca do estudo de fermentações contínuas de *Z. mobilis* visam a implementação de um sistema de 2D-espectrofluorescência na planta laboratorial em construção no LACIP2/DEQUI/UFRGS como extensão deste trabalho Além de colocar o sistema em operação, propõe-se controlar o mesmo em uma condição de alta conversão através das medidas de etanol, substrato e biomassa. O princípio dos espectrofluorômetros se baseia na re-emissão de luz com mudança espectral, que algumas espécies químicas sofrem. Determinados comprimentos de onda são enviados ao meio reacional, excitando eletronicamente certas substâncias químicas. Ao retornar ao seu estado inicial, tais componentes emitem ondas de diferentes comprimentos que são filtradas

por lentes e processadas por um sistema de aquisição de dados (Solle *et al.*, 2003; Hitzmann *et al.*, 1998).

A continuação dos estudos sobre inferência de estados através da taxa de consumo de hidróxido prevê o desenvolvimento de modelos matemáticos baseados em balanços de massa e/ou íons, que levem em consideração variáveis significativas deste sistema, como concentração da solução de hidróxido, dentre outras, de forma a possibilitar a construção de modelos genéricos e passíveis de transposição a outros processos fermentativos.

Referências Bibliográficas

- ADEN, A. e FOUST, T. “Technoeconomic analysis of the dilute sulfuric acid and enzymatic hydrolysis process for the conversion of corn stover to ethanol”. *Celulose*. **16**: 535-545, (2009).
- ALTERTHUM, F., “Elementos de microbiologia.” *Biotecnologia Industrial – Fundamentos*. **1**, Edgard Blucher Ltda, São Paulo, (2001).
- AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATANI, M., “Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation”. *Biotechnol. Bioeng.* **10**: 845–864, (1968).
- ALFORD, J. S. “Bioprocess control: Advances and challenges”. *Computers and Chemical Engineering*. **30**: 1464-1475, (2006).
- ARIS, R., “Ut Simulacrum”, *Poesis, New Literary History*, **20**: 323-340, (1989).
- ARNOLD, K. J.; BECK, J. V., “Parameter Estimation: in engineering and science”. New York: John Wiley & Sons, (1977).
- AYNSLEY M.; HOLFLAND A.; MORRIS A. J.; MONTAGUE G. A.; DI MASSIMO C. “Artificial intelligence and the supervision of bioprocesses (real-time knowledge-based systems and neural networks)”. *Bioprocess Design and Control*. Springer-Verlag Berlin Haidelberg. Berlin, (1993).
- BAILEY, J. E.; OLLIS; D. F. “Biochemical engineering fundamentals”, 2nd edition. McGraw-Hill, New York, (1986).
- BARATTI, J. e TORRES, F., “The effect of pH, temperature and sucrose concentration on high productivity continuous ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis* ”. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 121-128, (1987).
- BARD, Y., “Nonlinear Parameter Estimation”. New York and London: Academic Press, (1974).
- BATES, D. M.; WATTS, D. G., “Nonlinear Regression Analysis and its Applications”. New York: John Wiley, (1988).
- BEAVEN, M. J.; CHARPENTIER, C.; ROSE, A. H., “Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431”. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 1447-1455, (1982).
- BEAVEN, M. J.; ZAWADZKI, B.; BRONIUK, R.; LAWFORD, H. e FEIN, J., “Comparative performance trials with Yeast and *Zymomonas* for Ethanol Production From Corn”. *Ap. Biotecem. Biotecnol.*, **20/21**: 319-326, (1989).
- BEQUETTE, B. W., “Process dynamics: modeling, analysis and simulation.” Prentice Hall, Inc. New Jersey, (1998).
- BERTASSO, M. “Produção de Sorbitol e Ácido Glucônico por Células Imobilizadas Íntegras de *Zymomonas mobilis* ATCC 29191”. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, (1996).
- BOHLIN, T., “Practical Grey-Box Process Identification: Theory and applications”. *Springer-Verlag London Limited*, (2007).

- BONOMI, A. e SCHMIDELL, W., “Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos.” *Biotechnology Industrial – Engenharia Bioquímica*, **2**, Edgard Blucher Ltda, São Paulo, (2001).
- BRUCE, L. J., AXFORD, D. B., CISZEK, B. e DAUGULIS, A. J., “Extractive fermentation by *Zymomonas mobilis* and the control of oscillatory behavior.” *Biotechnology Letters* **13**, 291-296, (1991).
- BUCCHHOLZ, S. E., DOOLEY, M. M.; EVELEIGH, D. E. “*Zymomonas* – an alcoholic enigma”. *Trends in Biotechnology*, **5**: 199-204, (1987).
- BRUCE, L. J.; AXFORD, D. B.; CISZEK, B.; DAUGULIS, A. J., “Extractive fermentation by *Zymomonas mobilis* and the control of oscillatory behavior”. *Biotechnol. Lett*, **13**: 291-296, (1991).
- BRUN, R.; REICHERT, P.; KÜNSCH, H. R. “Practical Identifiability analysis of large environmental simulation models”. *Water Resources Research*, **37**: 1015-1030, (2001).
- CAMÊLO, A. C., “estudo Computacional-Experimentaldo Comportamento Oscilatório em Fermentações Contínuas com *Zymomonas mobilis*”, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, (2004).
- CHEN, G., “Stability of nonlinear systems.” *Encyclopedia of RF and microwave engineering*. K. Chang, Wiley – Interscience. New York, **2**: 4881-4896, (2004).
- COSTA, F. H. N.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. e TANO, M. S., “Fermentação contínua por *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 em concentrações elevadas de sacarose”. *Revista Ciências Exatas e Naturais*, **3(2)**: 201-207, (2001).
- DAUGULIS, A. J.; MCLELLAN, P. J.; Li, J., “Experimental Investigation and Modeling of Oscillatory Behavior in the Continuous Culture of *Zymomonas mobilis*”. *Biotechnol. Bioeng.* **1**: 99-105, (1997).
- DAWES, E. A.; RIBBONS, D. W. e LARGE, P. J., “The route of Ethanol Formation in *Zymomonas mobilis*”. *Biochem. J.*, **98**: 795-803, (1996).
- DHOOGHE, A.; GOVAERTS, W.; KUZNETSOV Y. A.; MESTROM, W.; RIET, A. M. e SOUTOIS., “MATCONT and CL_MATCONT: Continuation toolboxes im MATLAB”. (2006).
- DIEHL, F. C., “Análise, Controle e Otimização Operacional de um reator de *Zymomonas mobilis* com multiplicidade de equilíbrios”. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, (2009).
- DIEHL F. C.; SECCHI A. R.; LUSA L. P.; MUNIZ L. A. R.; LONGHI L. G. S. “Simulação operacional de uma torre de destilação atmosférica via Aspen Plus e avaliação de modelos de analisadores virtuais”. Publicação aceita na revista Controle & Automação,(2009).
- DIEZ, J. C. e YOKOYA, F., “Effect of temperature and pH on ethanol and levan production during sucrose fermentation by *Zymomonas mobilis*”. *Arq. Biol. Technol.* **39**: 129-137, (1996).
- DOELLE, M. B.; MILLICHIP, R. J. AND DOELLE, H. W., “Production of Ethanol from Corn using Inoculum Cascading of *Zymomonas mobilis*”. *Process Biochem*, **24**: 137-140, (1989).
- DOELLE, M. B.; DOELLE, H. W; KIRK, L., “*Zymomonas mobilis*: science and industrial application”. *Critical Reviews in Biotechnology*, **13**: 57-98, (1993).
- DOELLE, W. e GREENFIELD, P. F. “The production of ethanol from sucrose using *Zymomonas mobilis*”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **22**: 40-41, (1985).
- ELNASHAINE, S. S. E. H., CHEN, Z., GARHYAN, P., PRASAD, P. e MAHECA-BOTERO, A., “Practical implications of bifurcation chaos in chemical and biological reaction engineering.” *International Journal of Chemical Reactor Engineering* **4**, (2006).

- ERZINGER, G. S. "Influencia da concentração de glicose e etanol sobre a atividade de glicose-frutose oxidoreductase em *Zymomonas mobilis* ATCC29191". Dissertação de Mestrado, Escola Politécnica, USP, Brasil, (1996).
- ERZINGER, G. S., SILVEIRA, M. M., LOPES DA COSTA, J. P. C., VITOLO, M. e JONAS, R. "Activity of glucose-fructose oxidoreductase in fresh and permeabilised cells of *Zymomonas mobilis* grown in different glucose concentrations". *Brazilian Journal of Microbiology*, **34**: 329-333, (2003).
- FALCÃO, M. J. O., "Zymomonas mobilis e seu emprego como agente de fermentação alcoólica". *Revista do Instituto de antibióticos*. **1**: 169-182, (1982).
- FEIN, J. E., CHARLEY, R. C., HOPKINS, K. A., LAVERS, B. & LAWFORDE, H. G. "Development of a simple medium for continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis*". *Biotechnology Letters*, **5**: 1-6, (1983).
- FRANÇA, F. P. e RODRIGUES, M. C. S., "Fermentação Alcoólica Desenvolvida por *Zymomonas mobilis* CP3". *Rev. Lat. Amer. Microbiol.* **27**: 55-60, (1985).
- FRANDEN, M. A.; PIENKOS, P. T e ZHANG, M. "Development of a high-throughput method to evaluate the impact of inhibitory compounds from lignocellulosic hydrolysates on the growth of *Zymomonas mobilis*". *Journal of Biotechnology*. **144**: 259-267, (2009).
- GALANI, I.; DRAINAS, C. e TYPAS, M. A., "Growth Requirements and the Establishment of a Chemically defined Minimal, Medium in *Zymomonas mobilis*". *Biotechnol. Lett.*, **9**: 637-678, (1985).
- GARHYAN, P. e ELNASHAIE, S. S. E. H., "Utilization of mathematical models to investigate the bifurcation and chaotic behavior of ethanol fermentors". *Mathematical and Computer Modelling* **39**: 381-427, (2004).
- GARHYAN, P.; ELNASHAINE, S. S. E. H.; AL-HADDAD, S. M.; IBRAHIM, G. e ELSHISHINI, S. S., "Exploration and exploitation of bifurcation/chaotic behavior of a continuous fermentor for the production of ethanol." *Chemical Engineering Science* **58**, 1479-1496, (2003).
- GHOMMIDH, C.; VAIJA, J.; BOLARINWA, S.; NAVARRO, J. M., "Oscillatory behaviour of *Zymomonas* in continuous cultures: A simple stochastic model". *Biotechnol. Lett.*, **9**: 659-664, (1989).
- GIBBS, M. e DE MOSS, R. D. "Anaerobic dissimilation of C14 labelled glucose and fructose by *Pseudomonas lindneri*". *Journal of Biological Chemistry*, **207**: 689-694, (1954).
- GUNASEKARAN, P. & CHANDRA, K. R. "Ethanol fermentation technology – *Zymomonas mobilis*". *Current Science*, **77**: 56-68, (1999).
- HALTELMANN K.; KOLLECKER M.; HÜLL D.; HITZMANN B.; SCHEPER T. "Two-dimensional fluorescence spectroscopy: a novel approach for controlling fed-batch cultivations". *Journal of Biotechnology*, **121**: 410-417. Elsevier, (2006).
- HARMS, P.; KOSTOV, Y. e RAO, G., "Bioprocess monitoring". *Current Opinion in Biotechnology*. **13**: 124-127, (2002).
- HIMMELBLAU, D. M. "Process Analysis by Statistical Methods". New York: John Wiley & Sons, (1970).
- HITZMANN B.; PEKELER T.; LINDERMANN C.; MAROSE S.; SCHEPER T. "Chemometric models for the on-line estimation of bioprocess variables from 2-D-fluorescence spectra". *Preprints of 7th International Conference on Computer Applications in Biotechnology*. Osaka, (1998).
- INGRAM, L. O. e BUTTKE, T. M., "Effect of Alcohols on Microorganisms". *Advances in Microbial Physiology* (Academic Press). **25**: 253-300, (1984).

- JARZEBSKI, A. B., "Modelling of oscillatory behaviour in continuous ethanol fermentation". *Biotechnol. Lett.* **14**: 137-142, (1992).
- JOACHIMSTHAL, E. HAGGETT, K. D., JANG, J. H. e ROGERS, P. L. "A mutant of *Zymomonas mobilis* ZM4 capable of ethanol production from glucose in the presence of high acetate concentrations". *Biotechnology Letters*, **20**: 137-142, (1998).
- JöBSES, I. M. L.; EGBERTS, G. T. C.; VAN BAALEN, A.; ROELS, J. A., "Mathematical modelling of growth and substrate conversion of *Zymomonas mobilis* at 30 and 35°C". *Biotechnol. Bioeng.*, **27**: 984-995, (1985).
- JöBSES, I. M. L.; EGBERTS, G. T. C.; LUYBEN, K. C. A. M.; ROELS, J. A., "Fermentation kinetics of *Zymomonas mobilis* at high ethanol concentrations: Oscillations in continuous cultures". *Biotechnol. Bioeng.*, **28**: 868-877, (1986).
- KLUYVER, A. J.; HOPPENBROUWERS, W. J., "Ein merkwürdiges Gärungsbakterium: Lindner's *Termobacterium mobile*". *Arch. Mikrobiol*, **2**: 245-260, (1931).
- KOUTINAS A. A.; WANG R.; WEBB C. "Restructuring upstream bioprocessing: technological and economical aspects for production of a generic microbial feedstock from wheat". *Biotechnology and Bioengineering.*, **85**: 524-538, (2004).
- KUSNETSOV, Y. A., "Elements of applied bifurcation theory." 2 ed., Springer-Verlag New York, Inc. New York, (1998).
- LEE, W. C. e HUANG, C. T., "Modeling of ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 grown on the media containing glucose and fructose." *Biochemical Engineering Journal* **4**: 217-227, (2000).
- LEE, K. J.; ROGERS, P. L. "The fermentation kinetics of ethanol production by *Zymomonas mobilis*". *Chem. Eng. J.* **27**: B31-B38, (1983).
- LEE, K. J.; SKOTNICKI, M. L.; TRIBE, D. E.; ROGERS, P. L., "Ethanol production by *Zymomonas mobilis* in continuous culture at high glucose concentrations". *Biotechnol. Lett.* **1**: 421-426, (1979).
- LEE, K. J.; SKOTNICKI, M. L.; TRIBE, D. E.; ROGERS, P. L., "Kinetic studies on a highly productive strain of *Zymomonas mobilis*". *Biotechnol. Lett.* **2**: 339-344, (1980).
- LEMMEL, C. M.; SILVEIRA, M. M.; ERZINGER, G. S.; KOENHTOPP, P. I. e JONAS, R. "Production of sorbitol and gluconic acid by *Zymomonas mobilis*: comparison of strains.". *Brazilian Archives of Biology and Technology.* **35**:591-594, (1992).
- LEVENSPIEL, O., "Modeling in chemical engineering." *Chemical Engineering Science.* **57**, 4691-4696, (2002).
- LI, J.; McLELLAN, P. J.; DAUGULIS, A. J., "Inhibition effects of ethanol concentration history and ethanol concentration change rate on *Zymomonas mobilis*". *Biotechnol. Lett.* **17**: 321-326, (1995).
- LI, J., "Experimental investigation and mathematical modelling of oscillatory behaviour in the ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*". Ph.D. Thesis, Queen's University, Kingston, Ontario, (1996).
- LIAO, X.; WANG, L. e YU, P., "Stability of dynamical systems". *Elsevier B.V.* Amsterdam, **5**, 1 ed. (2007).
- LIMA, O. G.; SCHUMACHER, I. E.; ARAUJO, J. M., "New observations about the antagonist effects of *Zymomonas mobilis* var *recifensis*, ecological aspects of some problems in microbiology". *Revista do Instituto de Antibióticos, Recife*, **12**: 57- 68, (1972).
- LIMA, U. A.; BASSO, L. C. e AMORIM, H. V., "Produção de etanol." *Biotecnologia Industrial – Processos Fermentativos e Enzimáticos.* **3**, Edgard Blucher Ltda, São Paulo, (2001).

- LIN, Y e TANAKA, S. "Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects". *Applied Microbiology and Biotechnology*, **69**: 627-642, (2006).
- LIU Y. C.; WANG F. S.; LEE W.C., "On-line monitoring and controlling system for fermentation processes". *Biochemical Engineering Journal*. **7**: 17-25. Elsevier, (2001).
- LYNESS, E. e DOELLE, H. W. "Fermentation pattern of sucrose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis*". *Biotechnology and Bioengineering*, **23**: 1449- 1469, (1981).
- LUONG, J. H. "Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation". *Biotechnol. Bioeng.* **25**: 280–285, (1985).
- LUYBEN W. L. "Process modeling, simulation and control for chemical engineers." 2 ed, McGraw-Hill, Inc., New York, (1996).
- MACHADO, V. C .; TRIERWEILER, J. O. "Which is the best criterion for identification of dynamic models?". In: *SYMPOSIUM ON DYNAMICS AND CONTROL OF PROCESS SYSTEMS, 7., 2004, Boston. Anais...* Boston: International federation of automatic control (IFAC). **1**: 178-188, (2004).
- MAHECA-BOTERO, A.; GARHYAN, P. e ELNASHAINE, S. S. E. H., "Non-linear characteristics of a fermentor for ethanol production and their implications." *Nonlinear Analysis: Real World Applications* **7**, 432-457, (2006).
- MALVESSI, E. "Produção de Sorbitol e Ácidos Orgânicos por *Zymomonas mobilis*". Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, (2008)
- MAZAREVICA G.; DIEWOK J.; BAENA J. R.; ROSENBERG E.; LENDL B. "On-line fermentation monitoring by mid-infrared spectroscopy". *Appl. Spec.* **58**: 804-810, (2004).
- McLELLAN, P. J., DAUGULIS, A. J. e LI, J., "The incidence of oscillatory behavior in the continuous fermentation of *Zymomonas mobilis*." *Biotechnology Progress* **15**, 667-680, (1999).
- MCMILLAN G. K. "Process/industrial instruments and controls handbook". *McGraw-Hill Companies, Inc.*, 5 ed. New York, (1999).
- MEDIGAN, M. T., Martinko J. M, Parker J., "Brock biology of microorganisms". 9 ed, Prentice Hall, Inc. Upper Saddle River, New Jersey, (2000).
- MEDIO, A. e LINES, M., "Nonlinear dynamics: a primer." *Cambridge University Press*. New York, (2001).
- MEJÍA, R. I. G.; FARIAS, R. C.; TRIERWEILER, J. O. "Derivatives Estimation Based on Smoothing Techniques". *Anais. DYCOPS 2010*. (2010).
- MELLO, P. A. e PINTO, J. C. C. S., "Introdução à Modelagem Matemática e Dinâmica Não-Linear de Processos Químicos". *Escola Piloto Virtual Giuliano Massarani*, Rio de Janeiro, (2008).
- MILLER, G. L., "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar". *Analytical Chemistry*, **31**: 426-428, (1959).
- MOHAGHEGHI, A., DOWE, N., SCHELL, D., CHOU, Y. C., EDDY. C. & ZHANG, M. "Performance of a newly developed integrant of *Zymomonas mobilis* for ethanol production on corn stover hydrolysate". *Biotechnology Letters*, **26**: 321-325, (2004).
- MULCHANDANI, A.; VOLESKY, B., "Modeling of the acetone-butanol fermentation with cell retention". *Canad. J. Chem. Eng.*, **64**: 625-631, (1986),
- NAJAFPOUR, G. D., "Biochemical engineering and biotechnology." 1 ed, Elsevier B. V., Amsterdam, (2007).

- NETO, A. M. R., “Investigação do Comportamento Dinâmico das *Zymomonas mobilis* em CSTBR’s perfeitamente agitados através de Diagramas de Bifurcação”. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, (2006).
- PELLEGRINI, L. e POSSIO C. T., “A non-ideal CSTR: a high codimension bifurcation analysis.” *Chemical Engineering Science*, **11**: 3151-3156, (1996).
- PEREGO Jr., L.; CABRAL, S. ;DIAS, J. M.; KOSHIMIZU, L. H.; CRUZ, M. R. M., BORZANI, W., “Influence of temperature, dilution rate and sugar concentration on the establishment of steady-state in continuous ethanol fermentation of molasses”. *Biomass*, **6**: 247-56, (1985).
- PINHEIRO, I. O., “Fermentação de *Zymomonas mobilis* em meio Mínimo com Asparagina como Fonte de Nitrogênio”. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, (2001).
- PINTO, J. C.; SCHWAAB, M. “Análise de Dados Experimentais I: Fundamentos de Estatística e Estimação de Parâmetros”. **1**. ed. Rio de Janeiro: E-pappers, (2007).
- PORTO, L. M., “Modelagem de processo industrial de fermentação alcoólica contínua com reatores de mistura ligados em série.” Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, (2005).
- ROGERS, P. L.; JEON, Y. J.; LEE, K. J e LAWFORDE, H. G. “*Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher values products”. *Advances in Biochemistry Engineering*, **108**: 263-288, (2007).
- ROGERS, P. L., LEE, K., SKOTNICKI, M. E. e TRIBE, D. E. “Ethanol production by *Zymomonas mobilis*”. *Advances in Biochemistry Engineering*, **23**: 37-84, (1982).
- RUANGLEK, V.; MANEEWATTHANA, D. e TRIPETCHKUL, S., “Evaluation of Thai agro-industrial wasts for bio-ethanol production by *Zymomonas mobilis*”. *Process Biochemistry*, **41**: 1432-1437, (2006).
- SCHEPER T.; HITZMAN B.; STÄRK E.; ULBER R.; FAURIE R.; SOSNITZA P.; REARDON K. F. “Bioanalytics: detailed insight into bioprocesses”. *Analytica Chimica Acta*, **400**: 121-134. Elsevier, (1999).
- SCHWEINBERGER, C. M., “aplicação do CEKF na estimação de parâmetros em modelo dinâmico”. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, (2009).
- SHAW A. D.; KELL J. J. “Noninvasive on-line monitoring of the biotransformation by yeast of glucose to ethanol using dispersive Raman spectroscopy and chemometrics”. *Appl. Spec.* **53**: 1419-1428, (1999).
- SHENE, C. e BRAVO, S. “*Zymomonas mobilis* CP4 fed-batch fermentations of glucose-fructose mixtures to ethanol and sorbitol”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **57**: 323-328. (2001).
- SOLLE D.; GEISSLER D.; STÄRK E.; SCHEPER E.; HITZMANN B. “Chemometric modelling based on 2D-fluorescence spectra without a calibration measurement”. *Bioinformatics*, **2**, **19**: 173-177. Oxford University Press, (2003).
- SPRENGER, G. A. “Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some routes”. *FEMS Microbiology Letters*, **145**: 301-307, (1996).
- STANBURY P. F., “Fermentation technology”. 2 ed., Elsevier Science Ltd., Burlington, 1995.
- STANBURY P. F.; WHITAKER A. e HALL S., “Principles of fermentation technology”. 2 ed., Elsevier Science Ltd., Burlington, (1995).
- STOKES, H. W., DALLY, E. L., SPANIEL, D. T., WILLIAMS, R. L., MONTENECOURT, B. S., EVELEIGH, D. E. “*Zymomonas*: the phantom ethanol producer”. *Biosources Digest*, **3**: 124-132, (1981).
- STROGATZ, S. H., “Nonlinear dynamics and chaos: with applications to physics, biology, chemistry and engineering.” *Perseus Books Publishing*, L.L.C. New York, (1994).

- SWINGS, J. e DELEY, J., “The Biology of *Zymomonas*”. *Bacteriological Reviews*, **41**:1-46, (1977).
- SWINGS, J. e DELEY, J., “Genus *Zymomonas* Kluver and vanNiel 1936, 399”. *Bergey’s Manual os Systematic Bacteriology*, Baltimore-USA, vol **1**, (1984).
- VEERAMULLU, U. e AGRAWAL, P., “A structured kinetic model for *Zymomonas mobilis* ATCC10988”. *Biotechnol. Bioeng.* **36**: 694–704, (1990).
- VIIKARI, L. “Formation of sorbitol by *Zymomonas mobilis*”. *Applied Microbiology and Biotechnonology*, **20**: 118-123, (1984).
- VIIKARI, L. “By-product formation in ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*”. *Technical Research Centre of Finland*, **27**:3-29, (1986).
- VIIKARI, L. “Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*”. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*, **7**: 237-261, (1988).
- VIIKARI, L. e KORHOLA, M. “Fructose metabolism in *Zymomonas mobilis*”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **24**: 471-476, (1986).
- VOGEL H.; TODARO C. “Fermentation and Biochemical Engineering Handbook”. **2**. Naves Publ., (1997).
- WANICK, M.C.; ARAUJO, J. M.; CAVALCANTI DA SILVA, E.; SCHUMACHER, I. E. “Cura de vaginites de etiologia variada pelo emprego de cultura de *Zymomonas mobilis*”. *Revista do Instituto de Antibióticos*, Recife, **10**: 47-49, (1970).
- WEBSTER J. G. “Measurement, instrumentation, and sensors handbook”. *CRC Press LLC*, New York, (1999).
- WIGGINS, S., “Introduction to applied nonlinear dynamical systems and chaos.” *Springer-Verlag New York, Inc.* New York, **2** ed., (2003).
- WILLIAMS, G. P., “Chaos theory tamed.” Joseph Henry Press. Washington, (1997).
- WISBECK, E., SILVEIRA, M. M., NINOW, J. e JONAS, R. “Evaluation of the flocculent strain *Zymomonas mobilis* Z1-81 for the production of sorbitol and gluconic acid”. *Journal of Basic Microbiology*, **37**: 445-449, (1997).
- YAMUNA R. K.; RAMACHANDRA R. V. S. “Control of fermenters – a review”. *Bioprocess Engineering* **21**, 77-88, 1999.
- ZHANG, Y. e HENSON, M., “Bifurcation Analysis of Continuous Biochemical Reactor Models”. *Biotechnol*, **17**: 647-660, (2001).

Apêndice A

Identificação de Processos

Processo é definido como a atividade principal de uma unidade de produção onde, através de atividades secundárias, a matéria prima é convertida em algum determinado produto. Desta forma, um processo pode ser compreendido como a seqüência de passos, tarefas e atividades necessárias à conversão de matéria prima em produto.

Em engenharia química e bioquímica, os processos estão fundamentados em fenômenos de transferência de massa, calor, movimento e reações químicas e bioquímicas, aquelas que necessitam de um agente biológico para promover reações de oxidação e redução, convertendo substratos em produtos. Desta forma, em decorrência de entradas (u) ocorrem tais fenômenos resultando em um ou mais estados. Processos deste tipo possuem saídas (y) que são diretamente ou indiretamente relacionadas com os estados resultantes (x) e é através das medições das saídas que é possível obter inferências a respeito dos estados (Bequette, 1998).

Quando se tem como objetivo a construção do modelo de algum processo, se deseja obter as relações tanto para os estados x com para as saídas y , como visto nas equações (1) e (2).

$$x = f(x, u; \theta) \quad (1)$$

$$y = g(x; \theta) \quad (2)$$

Onde x representa o vetor dos estados, u o vetor das entradas, y o vetor das saídas e θ o vetor dos parâmetros.

Todo o processo de construção de um modelo (experimentações e hipóteses) visa à definição de duas entidades básicas distintas: a estrutura do modelo e os parâmetros. A estrutura do modelo é a forma funcional através da qual as diversas variáveis do problema estão relacionadas. Os parâmetros do modelo são os números que tornam possível a previsão quantitativa das relações existentes entre as várias variáveis do problema. Quando duas variáveis x e y estão relacionadas linearmente, apenas se estabelece o tipo de relação funcional que existe entre as duas variáveis analisadas, como apresentado na Equação (3).

$$y = \theta_1 x + \theta_2 \quad (3)$$

Sendo a estrutura do modelo estabelecida, entretanto, para que o modelo possa ser utilizado para previsões ou simulações, é necessário definir adicionalmente quem são os parâmetros θ_1 e θ_2 .

Quando o desafio consiste na determinação da estrutura do modelo bem como a estimativa dos parâmetros, se está diante de um problema de identificação do modelo. Em um contexto mais completo, a identificação consiste em um procedimento iterativo incluindo as seguintes etapas (ASTRÖM, WITTENMARK, 1997):

- Seleção da estrutura do modelo;
- Planejamento de experimentos;
- Estimativa de parâmetros;
- Validação do modelo.

Na literatura são comumente encontradas duas técnicas clássicas de identificação: caixa branca e caixa preta. Modelos caixa branca são modelos teóricos, enquanto modelos caixa preta são modelos empíricos.

A caixa branca procura suprir a busca científica pela compreensão e descrição da natureza e mecanismos que regem os fenômenos físicos e/ou químicos. As relações entre as diversas variáveis do problema são construídas a partir de pressupostos teóricos fundamentais, como as leis de conservação de massa, energia e quantidade de movimento. Pode-se dizer que os modelos caixa branca derivam de modelos conceituais, que são aqueles que procuram interpretar os fenômenos. Com isso, muito freqüentemente os modelos caixa branca podem ser propostos *a priori*, antes mesmo da observação experimental. Em um modelo caixa preta as relações entre as diversas variáveis do problema são estabelecidas não havendo qualquer pressuposto teórico que as justifique.

O desenvolvimento de modelos caixa preta depende completamente da obtenção de dados experimentais confiáveis e da criatividade do analista. Como exemplo para este tipo de identificação, pode ser citada a ferramenta *System Identification Toolbox* implementada no MATLAB[®]. Tal método requer que seja escolhida uma estrutura genérica de modelo, onde são especificados ordens, fatores de peso etc. A grande vantagem da caixa preta em relação à caixa branca é a possibilidade de se identificar até uma certa extensão um modelo para representar o padrão do distúrbios, como acontece através dos modelos ARMAX e BJ (Bohlin, 2007).

A coleta dos dados experimentais precede pela etapa de estimativa dos parâmetros, que por sua vez está subdividida em: ponto de operação para estimativa e grupos de parâmetros estimáveis. Tendo em mãos uma estrutura de modelo para o processo, mediante simulações de um determinado número de pontos de operação previamente estabelecidos é possível escolher o ponto mais interessante para a coleta dos dados experimentais. Relativo ao grupo de parâmetros estimáveis, o

objetivo é obter uma idéia prévia sobre quais parâmetros são realmente possíveis de serem estimados, se precavendo de problemas futuros na etapa da estimação.

Estimabilidade de Parâmetros

Ao se trabalhar com modelos mais complexos, essencialmente modelos caixa cinza, é difícil e normalmente inviável se estimar todos os parâmetros. A fraca estimativa dos parâmetros ocorre quando existe forte dependência entre eles, isso quer dizer que mesmo que ocorram diferentes modificações nos valores dos parâmetros os modelos resultantes irão sempre convergir para a mesma resposta. Conforme foi introduzido anteriormente, uma solução consiste em identificar quais são os parâmetros possíveis de serem estimados e estimá-los mantendo os demais fixos em valores coerentes conhecidos ou especificados previamente (Bates e Watts, 1988).

As técnicas mais tradicionais de avaliar a dependência entre os parâmetros são a matriz de covariância e a construção da região de confiança, representada graficamente por uma elipsóide $n\theta$ -dimensional – maiores detalhes veja Bard (1974) e Arnold e Beck (1977). A matriz de covariância possui a desvantagem de permitir apenas a avaliação da dependência dos parâmetros aos pares. Brun *et al.* (2001) sugerem uma técnica com melhor acuracidade e facilidade, baseada na sensibilidade local das saídas, dada por:

$$S = \frac{\partial g(x; \theta)}{\partial \theta} \Big|_{\theta=\theta_0} \quad (4)$$

Caso os componentes da matriz de sensibilidade S não estejam na mesma escala recomenda-se que sejam escalonados. Com isso, é possível obter o índice de importância dos parâmetros definido na Equação (5), onde ne e $n\theta$ representam os números de dados experimentais e de parâmetros, respectivamente.

$$\delta_j = \sqrt{\frac{1}{ne} \sum_{i=1}^{ne} s_{ij}^2} \quad j = 1, 2, \dots, n\theta \quad (5)$$

Localizados os parâmetros mais importantes, é construída de maneira criteriosa diferentes grupos de parâmetros identificados pela letra “K”. O objetivo é avaliar o índice de colinearidade γ_K , Equação (6), de cada grupo. O índice de colinearidade ou dependência linear, indica o quanto

modificações nos parâmetros do grupo podem se auto-cancelar, ou seja, manter a resposta pouco sensível as alterações. Isso quer dizer que poderão existir casos de grupos compostos por parâmetros vistos como importantes individualmente, mas, quando agrupados passam a ser fracamente estimados. Vale salientar que além do índice de importância δ ser útil no processo de construção dos grupos, ele também serve de critério para determinar o ponto de operação para estimação.

$$\gamma_K = \frac{1}{\min_{\|\beta\|=1} \left\| \tilde{S}_K \beta \right\|} = \frac{1}{\sqrt{\lambda_K}} \quad (6)$$

Ao determinar o índice de colinearidade γ_K , as colunas da matriz S devem ser normalizadas obtendo-se \tilde{S} , Equação (7).

$$\tilde{S}_j = \frac{S_j}{\|S_j\|} \quad j = 1, 2, \dots, n\theta \quad (7)$$

Onde β corresponde a um determinado vetor com norma igual a 1, \tilde{S}_K é uma sub-matriz de \tilde{S} com dimensão $n \times k$, sendo $1 < k \leq n\theta$ e, γ_K é o menor autovalor de $\tilde{S}_K^T \tilde{S}_K$, ou seja é o menor valor singular da submatriz, i.e., $\underline{\sigma}(\tilde{S}_K)$. Note que γ_K é fortemente dependente do escalonamento empregado. Portanto, se o sistema não estiver escalonado apropriadamente, as conclusões advindas deste tipo de análise podem ser equivocadas.

Quanto maior o índice de colinearidade, menor é a estimabilidade dos parâmetros do grupo. Índices superiores a 5 são considerados críticos. Por exemplo, um índice de colinearidade de 20 indica que a modificação na resposta, provocada pela alteração de um determinado parâmetro θ_j , pertencente ao grupo K , pode ser compensada com apropriadas modificações nos outros parâmetros do grupo na ordem de 5% ($1/\gamma_K \times 100$) (BRUN et al., 2001).

Estimativa de Parâmetros

O processo de estimar parâmetros consiste em determinar o conjunto de números que melhor representa a realidade de um dado processo ao serem inseridos em um dado modelo. Isto significa dizer que é assumido a existência de θ^* , vetor dos parâmetros que melhor representa a

realidade, desta forma, o objetivo resume-se em obter um θ o mais próximo de θ^* , sendo o resultado a estimativa $\hat{\theta}$, sendo $E\{\hat{\theta}\} = \theta^*$.

Na literatura são encontradas diversas técnicas para a obtenção de $\hat{\theta}$, sendo todas baseadas na função erro: $e(\theta)$. Uma das formas como o erro pode ser definido é apresentada pela Equação (8).

$$e = \underbrace{y^{\text{medido}}}_y - \underbrace{y^{\text{estimado}}}_g = y - g(x; \theta) \quad (8)$$

Partindo da fórmula do erro apresentada anteriormente, a estimativa de parâmetros pode ser feita através de diversas técnicas, sendo as mais comuns as de mínimos quadrados e a de máxima verossimilhança. Além destas, existe o método de minimização da derivada do erro, proposto por Machado e Trierweiler (2004) e estudado em maior profundidade por Schweinberger (2009).

Na técnica dos mínimos quadrados, os parâmetros são estimados ao minimizar o quadrado do erro, como apresentado nas equações (9) e (10).

$$\min_{\theta} J(\theta) = \min_{\theta} \sum_{i=1}^{ne} \sum_{j=1}^{ny} e_{ij}^2 \quad (9)$$

$$\min_{\theta} J(\theta) = \min_{\theta} \sum_{i=1}^{ne} \sum_{j=1}^{ny} [y_{ij} - g(x_i; \theta)]^2 \quad (10)$$

Apesar de ser bastante útil e permitir a solução de uma série de problemas práticos, a técnica de mínimos quadrados é bastante limitada porque admite implicitamente que todas as variáveis medidas pertencem a um mesmo conjunto amostral e que são medidas com a mesma precisão experimental, bem como assume que não existem desvios nas variáveis independentes.

Em contrapartida, a técnica da máxima verossimilhança é baseada na função densidade probabilidade da variável medida: $p(y|x;\theta)$. O caso mais comum ocorre quando $p(y|x;\theta)$ é uma distribuição normal, ou gaussiana. A distribuição gaussiana multivariável é apresentada pela Equação (11).

$$p(y|x; \theta) = \frac{1}{(2\pi)^{ny/2} \det^{1/2}(V_y)} \exp\left[-\frac{1}{2}(y - g(x; \theta))^T V_y^{-1} (y - g(x; \theta))\right] \quad (11)$$

Sendo V_y a matriz de covariância experimental e $g(x; \theta)$ a média de y . Se as realizações experimentais são independentes, a densidade de probabilidade da variável medida pode ser escrita através da Equação (12).

$$p(y|x; \theta) = \prod_{j=1}^{ny} \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_{y_j}} \exp\left[-\frac{(y - g(x; \theta))^2}{2\sigma_{y_j}}\right] \quad (12)$$

Sendo a função de verossimilhança é apresentada na Equação (13).

$$L(y|x; \theta) = \prod_{i=1}^{ne} \prod_{j=1}^{ny} \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_{y_{ij}}} \exp\left[-\frac{1}{2} \frac{(y_{ij} - g(x_i; \theta))^2}{\sigma_{y_{ij}}}\right] \quad (13)$$

Os parâmetros podem ser estimados de forma a maximizar a função de verossimilhança. Isto é, maximizar a probabilidade de encontrar os dados experimentais obtidos. Isto é válido para dados experimentais de boa qualidade, não havendo razão para acreditar que os resultados experimentais sejam pouco prováveis e não representem satisfatoriamente a realidade. Através da maximização da função de verossimilhança na forma logarítmica obtém-se a Equação (14), que também pode ser caracterizada como um problema de mínimos quadrados ponderados. Ou seja, quando a estimativa por máxima verossimilhança está baseada na distribuição Gaussiana e as variáveis independentes não possuem desvios o problema se reduz a mínimos quadrados ponderados. (Himmelblau, 1970):

$$\min_{\theta} J(\theta) = \min_{\theta} \sum_{i=1}^{ne} \sum_{j=1}^{ny} \frac{1}{\sigma_{y_{ij}}} [y_{ij} - g(x_i; \theta)]^2 \quad (14)$$

Uma das grandes vantagens da função objetivo da Equação (14) é a possibilidade de misturar diferentes conjuntos de dados, sendo a máxima verossimilhança capaz de permitir a estimação considerando os desvios nas variáveis independentes x .

O método da minimização da derivada do erro, proposto por Machado e Trierweiler (2004) trata-se da minimização do somatório da derivada do erro ao quadrado. Os autores concluíram que o método apresentado pela Equação (15) produz melhores resultados do que o apresentado pela Equação (9), quando uma planta sofre com distúrbios não medidos de baixa frequência. Este resultado é atribuído ao fato de que seguir a tendência do processo é melhor do que tentar passar por todos os pontos experimentais. Em outras palavras, através da Equação (15) se obtém um melhor acompanhamento do perfil de comportamento da planta.

$$\min_{\theta} J(\theta) = \min_{\theta} \sum_{i=1}^{ne} \sum_{j=1}^{ny} \left(\frac{de_{ij}}{dt} \right)^2 \quad (15)$$

Desde que distúrbios não medidos estão sempre presentes em processos reais, formular uma função objetivo considerando o termo de/dt consiste em uma interessante alternativa. Esta alternativa apresentará bons resultados apenas para casos em que a variação provocada pelo distúrbio não medido é mais lenta que as variações provocadas pelas variáveis manipuladas.

Validação de modelos

Validação de modelo consiste em tomar o modelo obtido com a estimativa e aplicar testes estatísticos a fim de determinar se o modelo é adequado, se os parâmetros estimados são de boa qualidade e o intervalo de predição do modelo.

A adequação do modelo pode ser verificada através da utilização de ferramentas como construção de gráficos y_{medido} x $y_{estimado}$ ou então teste de hipóteses (Pinto e Schwaab, 2007).

A construção de gráficos y_{medido} x $y_{estimado}$ e verificação do coeficiente de correlação, indicador do quão próximo encontram-se os dados do modelo dos experimentais, permite avaliar se o modelo obtido é satisfatório. Usualmente, coeficientes de correlação com módulo superior a 0,9 indicam modelos satisfatórios, sendo valores inferiores a 0,9 indicativos de desajuste do modelo ou então erros experimentais excessivos.

Testes de hipóteses, no caso de estimativa por mínimos quadráticos, são aplicados para verificar as hipóteses de modelo perfeito e experimento realizado corretamente, obtendo-se assim a estimativa da variância dos erros experimentais através da Equação (16).

$$\hat{\sigma}_y = \frac{J(\hat{\theta})}{ne - n\theta} = \frac{1}{ne - n\theta} \min_{\theta} \sum_{i=1}^{ne} \sum_{j=1}^{ny} \frac{1}{\sigma_{y_{ij}}^2} (y_{ij} - g(x_i; \theta))^2 \quad (16)$$

Caso a variância dos erros experimentais, σ_y^2 , também seja conhecida, é possível verificar a adequação da hipótese do modelo perfeito pela aplicação do teste F , sendo F definido pela Equação (17) e que $p(F)$ encontre-se entre $(1-\alpha)/2$ e $(1+\alpha)/2$, onde α representa o grau de certeza.

$$F = \frac{\hat{\sigma}_y^2}{\sigma_y^2} \quad (17)$$

Caso as duas variâncias forem semelhantes estatisticamente, o modelo deve ser considerado satisfatório. Caso contrário, é necessário continuar investindo na busca por uma nova estrutura para o modelo.

No caso da função de máxima verossimilhança com erros experimentais de distribuição Gaussiana, a função objetivo resultante tem interpretação de χ^2 . Nesse caso, o modelo é considerado adequado se $J(\hat{\theta})$ estiver χ^2_{\min} e χ^2_{\max} (Schweinberger, 2009).

Qualidade dos parâmetros estimados

Além da utilização do índice de colinearidade γ , a determinação da matriz de covariância V_θ também é um bom indicador da qualidade dos parâmetros estimados. De acordo com Himmelblau (1970), para o caso em que os erros nas variáveis independentes são negligenciáveis, o cálculo da matriz de covariância pode ser feito de acordo com as equações (18) à (20).

$$G = \frac{\partial}{\partial y} \nabla_\theta J(x, y; \hat{\theta}) \quad (18)$$

$$H = \frac{\partial}{\partial \theta} \nabla_\theta J(x, y; \hat{\theta}) \quad (19)$$

$$V_\theta = H^{-1} G V_y G^T (H^{-1})^T \quad (20)$$

O cálculo da matriz de covariância possibilita obter o grau de significância do parâmetro, que é normalmente calculado em relação a referência zero, no qual o efeito paramétrico desaparece. De forma simples, o grau de significância pode ser obtido variando-se o grau de confiança até que o intervalo de confiança do parâmetro inclua o zero. Se o grau de confiança necessário para incluir o zero é inferior ao grau de confiança estabelecido pelo investigador, diz-se que o parâmetro é não significativo. (Pinto e Schwaab, 2007).

Apêndice B

Estabilidade de Sistemas Dinâmicos

A teoria da estabilidade representa um papel fundamental em sistemas de engenharia, com ênfase na área de controle de processos e dispositivos. Chen (2004) afirma que, de uma maneira geral, estabilidade significa que a saída de um sistema apresenta uma trajetória com limites definidos ou com tendência a atingir um estado de equilíbrio. Segundo o autor, conceitualmente existem diversos tipos de estabilidade, entre esses três noções básicas são de interesse na dinâmica não linear: a estabilidade em relação ao equilíbrio, a estabilidade orbital e a estabilidade estrutural. A evolução dos conceitos fundamentais de sistemas e estabilidade de trajetórias se deu ao longo da história até Lyapunov desenvolver sua tese *The General Problem of Motion Stability*, em 1892, sendo suas idéias e técnicas utilizadas em pesquisas e aplicações referentes à estabilidade de sistemas dinâmicos até hoje.

Sistemas não lineares contínuos no tempo são, em geral, delineados por equações diferenciais da forma da Equação (1). Nesta equação, $x = x(t)$ é o estado do sistema, f é a função não linear diferenciável, t a dimensão temporal e \dot{x} indica o termo diferencial dx/dt . Nas equações diferenciais que representam fenômenos físicos, o termo t_0 que representa o tempo no instante inicial de integração é normalmente considerado zero. O sistema 1 é dito ser autônomo se na função f a variável tempo não aparece explicitamente (Chen, 2004). Exemplos de sistema autônomo e não-autônomo são apresentados em (2) e (3), respectivamente.

$$\dot{x} = f(x, t), \quad t \in [t_0, \infty) \quad (2)$$

A forma generalizada da representação de um sistema autônomo, com uma única variável de estado é mostrada em (4). Um equilíbrio, ponto fixo ou estado estacionário do sistema autônomo 4, se existir, é uma solução da equação algébrica (5), onde x^* representa a solução no equilíbrio (Wiggins, 2003). O espaço inteiro R^n , em que os estados do sistema pertencem, é chamado de espaço de estado (*steady space*) (Chen, 2004).

$$\frac{dx}{dt} = \frac{1}{1+x} \quad (3)$$

$$\frac{dx}{dt} = \frac{t}{1+x} \quad (4)$$

$$\dot{x} = f(x), \quad \dot{x}(t_0) = x_0 \in \mathbb{R}^n \quad (5)$$

$$f(x^*) = 0 \quad (6)$$

Um ponto $x^0 \in X$ é chamado de um equilíbrio (ponto fixo) se $\varphi^t x^0 = x^0$ para todo $t \in T$ (Kusnetsov, 1998). Geometricamente, um sistema dinâmico é representado como uma família da evolução de operadores φ^t , atuando em um espaço de estado X parametrizado por um tempo t contínuo ou discreto pertencente a um conjunto T . Geralmente o termo “equilíbrio” é utilizado para sistemas contínuos no tempo enquanto que o termo ponto fixo é utilizado para sistemas discretos no tempo.

De uma maneira aproximada x^* é uma solução de equilíbrio, no sentido de Lyapunov, se a saída do sistema viaja por uma trajetória perto e ao redor do equilíbrio (Chen, 2003). Da mesma forma, a estabilidade assintótica pode ser definida pelo $\lim_{t \rightarrow \infty} x(t) = x^*$ (Wiggins, 2003), ou seja, há uma tendência de convergência do sistema para x^* . A Figura 1 ilustra a estabilidade de Lyapunov e a estabilidade assintótica.

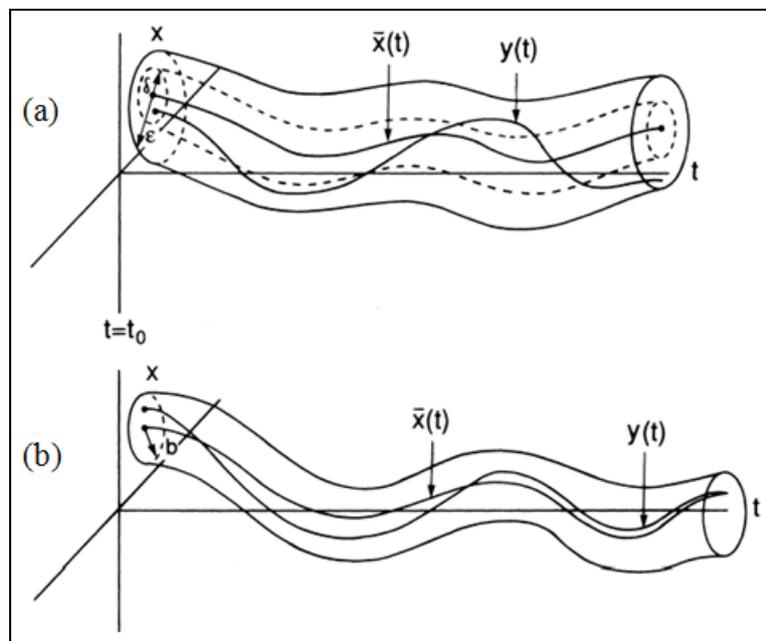


Figura 1: Estabilidade de Lyapunov (a) e estabilidade assintótica (b). *Fonte: Wiggins, 2003.*

Uma determinada solução é estável no sentido de Lyapunov se para qualquer tolerância (ε) maior que zero existe uma fronteira $\delta = \delta(\varepsilon) > 0$ tal que $\|x(t_0)\| < \delta$ e $\|x(t)\| < \varepsilon$ para todo $t \geq t_0$

(Liao *et al.*, 2007). A instabilidade é uma característica de sistemas em que a trajetória da variável de estado rompe o limite delimitado por ε .

Trajетórias periódicas no tempo podem caracterizar movimentos de equilíbrio. Assim, se uma trajetória fechada por O permanece fechada em O , então o movimento é dito orbitalmente estável. Tais trajetórias fechadas são conhecidas como ciclos limites, e quando esses se aproximam de O , quando o tempo tende ao infinito, o movimento é dito assintoticamente orbitalmente estável, no sentido de Lyapunov (Wiggins, 2003).

Uma solução periódica $\bar{x}(t)$ é dita orbitalmente estável se, dado $\varepsilon > 0$, existe um $\delta = \delta(\varepsilon) > 0$ tal que, para qualquer solução $y(t)$ satisfazendo $\|\bar{x}(t_0) - y(t_0)\| < \delta$, então $d(y(t), O^+(x_0, t_0)) < \varepsilon$ para $t > t_0$ (Wiggins, 2003).

Se a dinâmica de um sistema, no espaço de estado, muda radicalmente, por exemplo, pelo surgimento de um novo equilíbrio ou uma nova órbita periódica, devido a uma pequena perturbação externa, então o sistema é considerado estruturalmente instável. Kusnetsov (1998) define estabilidade estrutural como a invariância qualitativa do retrato de fase em relação a uma pequena perturbação. Em outras palavras, estabilidade estrutural significa que a família de órbitas de uma figura geométrica é similar. Por exemplo, os sistemas $\dot{x} = x$ e $\dot{x} = 2x$ apresentam essa similaridade, ao contrário dos sistemas $\dot{x} = x$ e $\dot{x} = \sqrt{x}$. As três trajetórias são exibidas na Figura 2.

A linearização de um sistema de equações diferenciais, ou seja, a obtenção de sua matriz Jacobiana (J), permite a análise de sua estabilidade local através dos autovalores dessa matriz (Kusnetsov, 1998). Seja o sistema bidimensional 6, onde $x = 0$ é um equilíbrio e $f(0) = 0$. A matriz Jacobiana são os valores resultantes de 7.

$$\dot{x} = f(x), \quad x = (x_1, x_2)^T \in R^n \quad (6)$$

$$J = \left. \frac{df(x)}{dx} \right|_{x=0} \quad (7)$$

Caso todos autovalores reais da Jacobiana (comumente representados por λ_i , onde i representa o número de autovalores) apresentarem valores reais negativos, para determinado equilíbrio, diz-se que a solução é assintoticamente estável (*stable node* ou *sink*). Caso contrário a solução é dita assintoticamente instável, onde o surgimento de autovalores com parte real negativa e

positiva aponta para pontos sela instáveis (*saddle point*) e autovalores com parte real maior que zero indicam nodos instáveis (*unstable node* ou *source*) (Wiggins, 2003).

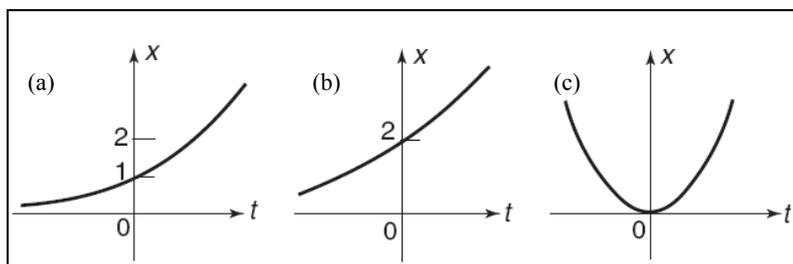


Figura 1: Comparação da trajetória de três sistemas: (a) $\dot{x} = x$; (b) $\dot{x} = 2x$; (c) $\dot{x} = \sqrt{x}$.

Fonte: Chen, 2004.

Espaço de fase e Bifurcação

O termo bifurcação foi definido por Poincaré como uma mudança qualitativa no retrato de fase de um sistema dinâmico, conforme a variação de algum parâmetro de controle (Bequette, 1998). Um diagrama de fase, muitas vezes referido como retrato de fase, plano de fase ou espaço de fase, é uma representação geométrica da estrutura orbital de um sistema dinâmico e consequentemente uma ferramenta muito usual na análise de suas propriedades qualitativas (Médio e Lines, 2001). Em outras palavras, é uma técnica utilizada para o estudo de comportamentos transientes no domínio do tempo.

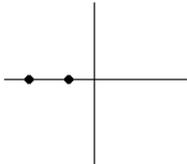
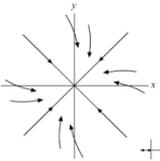
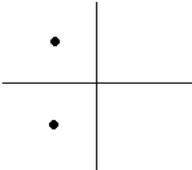
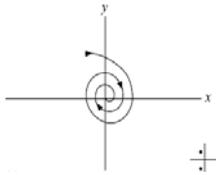
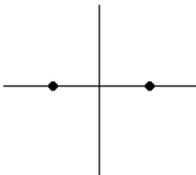
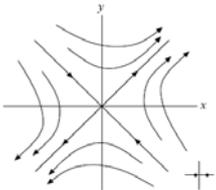
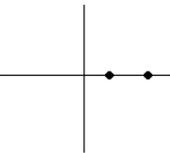
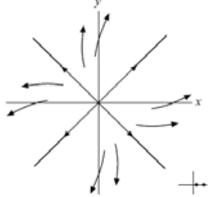
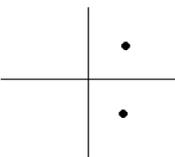
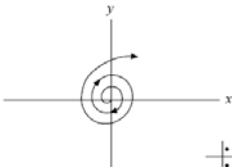
Consiste em graficar curvas de uma variável de estado versus outra variável de estado, onde cada curva é baseada em uma condição inicial (Bequette, 1998). Um plano de fase pode ser uma curva no R^2 ou no R^3 , que permite análises relativas à convergência do sistema em relação às condições iniciais. Com vistas a generalizar comportamentos de sistemas planos, é apresentada a classificação topológica de equilíbrios da Tabela 1 (Médio e Lines, 2001; Kusnetsov, 1998; Bequette, 1998). Desta forma é possível relacionar os autovalores de um sistema com suas características em um espaço de fase. Pontos estáveis são atratores e pontos instáveis repulsores de soluções. O surgimento de autovalores complexos conjugados é a causa da ocorrência de retratos de fase com o formato de espiral ou foco.

Outra forma, do retrato de fase, não apresentado na Tabela 1, diz respeito a comportamentos periódicos, tais como centros e ciclos limite (Figura 3). Bequette (1998) destaca a diferença entre as duas trajetórias afirmando que centros podem ocorrer em sistemas lineares, enquanto que ciclos limite surgem em sistemas não lineares. A grande diferença entre os dois comportamentos é que

ciclos limite são órbitas fechadas, ou seja, perturbações não mudam trajetórias fechadas como em centros onde as perturbações levam o sistema a novas órbitas. O retrato de fase é capaz de captar a essência de um equilíbrio, revelando suas características no domínio do tempo. Nodos estáveis e instáveis são capazes de atrair ou repelir soluções.

Comportamentos oscilatórios, típicos de autovalores complexos, podem ser visualizados na Figura 4. Seus retratos de fase são espirais com tendência de convergência (para equilíbrios estáveis) e divergência (para equilíbrios instáveis)

Tabela 1: Classificação topológica de equilíbrios no plano. *Adaptado: Médio e Lines, 2001.*

Autovalor no Plano Complexo	Espaço de Fase	Nome do Espaço de Fase	Estabilidade
		Nodo	Estável
		Foco	Estável
		Sela	Instável
		Nodo	Instável
		Foco	Instável

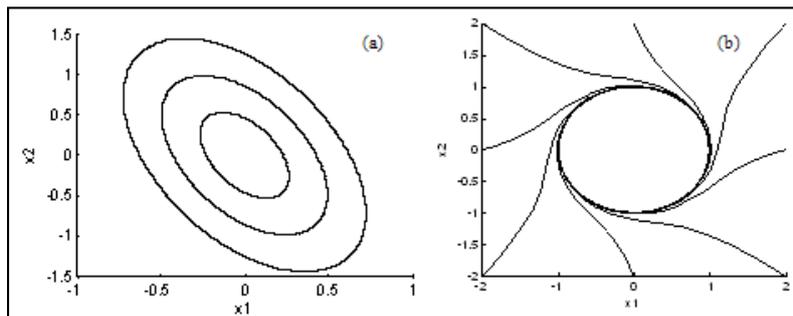


Figura 2: Comportamento de centro (a) e ciclo limite (b), para diversas condições iniciais.

Adaptado: Bequette, 1998.

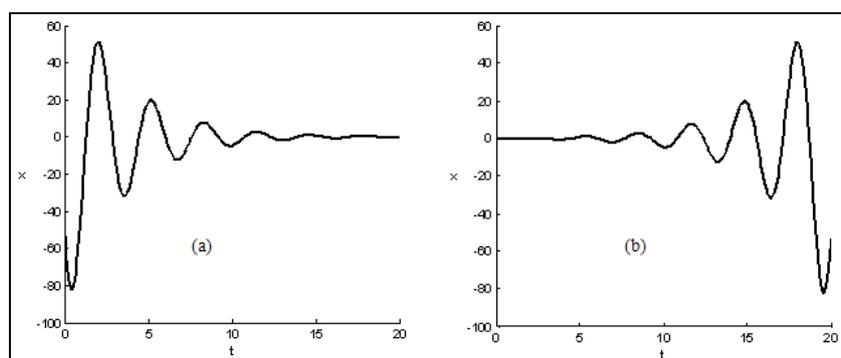


Figura 4: Resposta de um sistema no domínio do tempo para um foco estável (a) e um foco instável (b). *Adaptado: Bequette, 1998.*

Kusnetsov (1998) define bifurcação como o surgimento de um retrato de fase de topologia não equivalente, sob a variação de alguma variável, chamada parâmetro de bifurcação (μ). Sendo assim, bifurcação é uma mudança topológica em um sistema quando μ atravessa um valor crítico chamado de ponto de bifurcação (μ_c). Segundo Bequette (1998), μ_c é localizado onde ambas função e sua primeira derivada são iguais a zero.

Quando um parâmetro de bifurcação é varrido e os pontos de equilíbrio referentes à variável de estado são graficados, obtém-se um diagrama de bifurcação. Tais diagramas são gerados a partir de análises lineares pontuais da estabilidade (Bequette, 1998), onde regiões estáveis são representadas por linhas contínuas e regiões instáveis por linhas pontilhadas. Setas podem ser adicionadas para enfatizar convergência ou divergência. O tipo de transição que ocorre em μ_c determina a sua classificação quanto ao tipo de bifurcação. Em sistemas contínuos de primeira ordem eles podem ser de três tipos: sela, transcritical e *pitchfork* (forquilha ou tridente).

A bifurcação do tipo *saddle-node* ou simplesmente sela também é classificada como *fold bifurcation* por alguns autores. A bifurcação sela é dita ser uma bifurcação descontínua ou catastrófica, porque o ponto crítico μ_c representa o fim de um ramo estável. Se houver um caminho sobre o ramo estável através de μ_c então a bifurcação é dita contínua e deixa de ser um *saddle-node*. A Figura 5 apresenta um exemplo de ocorrência de bifurcação tipo sela. Nesta figura são graficados a equação analisada e o diagrama de bifurcação da mesma, apresentando a ocorrência da bifurcação sela.

Para a ocorrência de uma *fold bifurcation* existem três condições que devem ser satisfeitas, que serão descritas a seguir.

Para uma função genérica $f(x, \mu)$, a condição necessária para a ocorrência de uma bifurcação local é que o ponto de equilíbrio x^* seja não hiperbólico no valor crítico $\mu = \mu_c$ (Médio e Lines, 2001). Um equilíbrio x^* de um sistema é dito hiperbólico se todos autovalores da Jacobiana, avaliados nesse ponto, tem partes reais diferentes de zero (Chen, 2004). A condição (i) captura a característica não hiperbólica.

$$\frac{\partial f(x^*, \mu_c)}{\partial x} = 0 \quad (i)$$

A condição (ii) assegura a existência de um máximo ou mínimo e não apenas um ponto de inflexão. Isso garante que a curva do ponto fixo se mantém inteiramente em um dos lados de $\mu = \mu_c$ (Médio e Lines, 2001).

$$\frac{\partial^2 f(x^*, \mu_c)}{\partial x^2} \neq 0 \quad (ii)$$

A condição (iii) assevera a existência de uma única função $\mu = \mu(x)$ definida, próxima à μ_c , tal que $f[x, \mu(x)] = 0$ (Médio e Lines, 2001).

$$\frac{\partial f(x^*, \mu_c)}{\partial \mu} \neq 0 \quad (iii)$$

As condições (i) e (iii) são genéricas, isto é, se elas verificam-se para certo valor de μ , arbitrariamente próximo a ele haverá outro valor ligeiramente diferente onde esta condição se mantém (Médio e Lines, 2001).

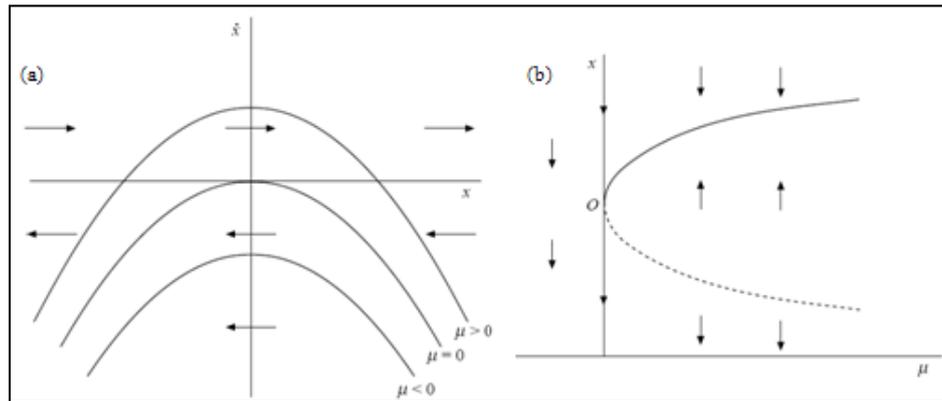


Figura 5: Bifurcação sela: equação graficada (a) e diagrama de bifurcação (b). *Fonte: Médio e Lines, 2001.*

Na bifurcação transcritical ocorre a mudança de estabilidade das soluções. Para a ocorrência deste tipo de bifurcação é necessário que sejam satisfeitas três condições (Médio e Lines, 2001). Duas delas são as mesmas requeridas na bifurcação sela: (i) e (ii). Para que se tenha duas curvas ou pontos fixos cruzando o ponto μ_c a condição (iii) deve ser trocada pela (iii'). A Figura 6 apresenta uma bifurcação do tipo transcritical.

$$\frac{\partial f(x^*, \mu_c)}{\partial \mu} = 0 \quad \& \quad \frac{\partial^2 f(x^*, \mu_c)}{\partial x \partial \mu} \neq 0 \quad (iii')$$

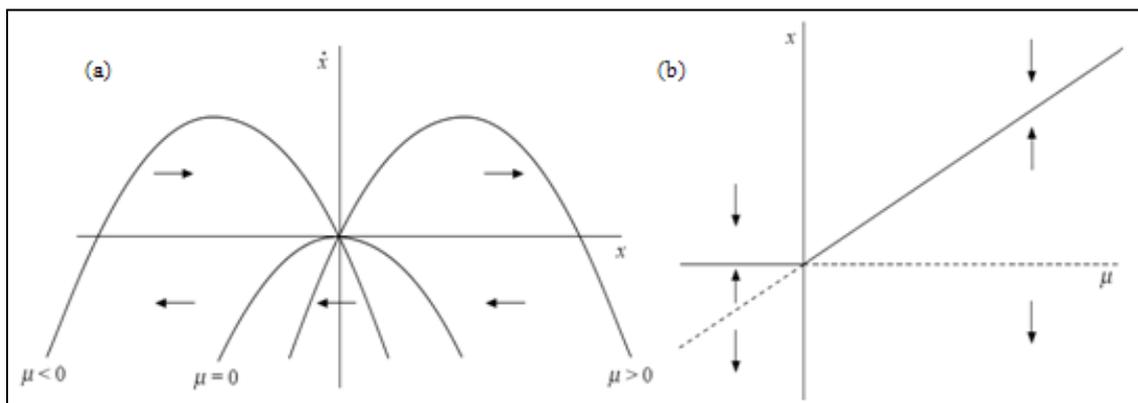


Figura 6: Bifurcação transcritical: equação graficada (a) e diagrama de bifurcação (b). *Fonte: Médio e Lines, 2001.*

O terceiro tipo de bifurcação, chamado de *pitchfork*, é caracterizada pelo aparecimento ou desaparecimento de equilíbrios e pela ocorrência de mudança da estabilidade (Médio e Lines, 2001).

Um *pitchfork* se caracteriza pelo fato de que $x = 0$ é um conjunto de soluções estáticas e existe uma segunda curva que à intercepta (x^*, μ_c) situada inteiramente em um dos lados de μ_c . Para uma função genérica $f(x, \mu)$ com um ponto fixo x^* , em um parâmetro $\mu = \mu_c$, (i) e (iii') são condições necessárias para uma bifurcação *pitchfork*, todavia (ii) deve ser substituída por (ii') (Médio e Lines, 2001).

$$\frac{\partial^2 f(x^*, \mu_c)}{\partial x^2} = 0 \quad \& \quad \frac{\partial^3 f(x^*, \mu_c)}{\partial x^3} \neq 0 \quad (ii')$$

As condições (ii') e (iii') implicam que no ponto μ_c , da curva de pontos fixos $\mu(x)$, a Equação (5.8) seja satisfeita.

$$\frac{d\mu(x^*)}{dx} = 0 \quad \& \quad \frac{d^2\mu(x^*)}{dx^2} \neq 0 \quad (5.8)$$

Isto garante que no plano (x, μ) , a segunda curva de equilíbrios fica inteiramente no lado direito da $\mu = \mu_c$ se a segunda derivada é positiva. Se a segunda derivada for negativa a curva se localiza no lado esquerdo.

Quando o equilíbrio não trivial aparece para $\mu > \mu_c$ se diz haver uma bifurcação *pitchfork* supercrítica (Figura 7). O inverso indica a existência de uma bifurcação *pitchfork* subcrítica.

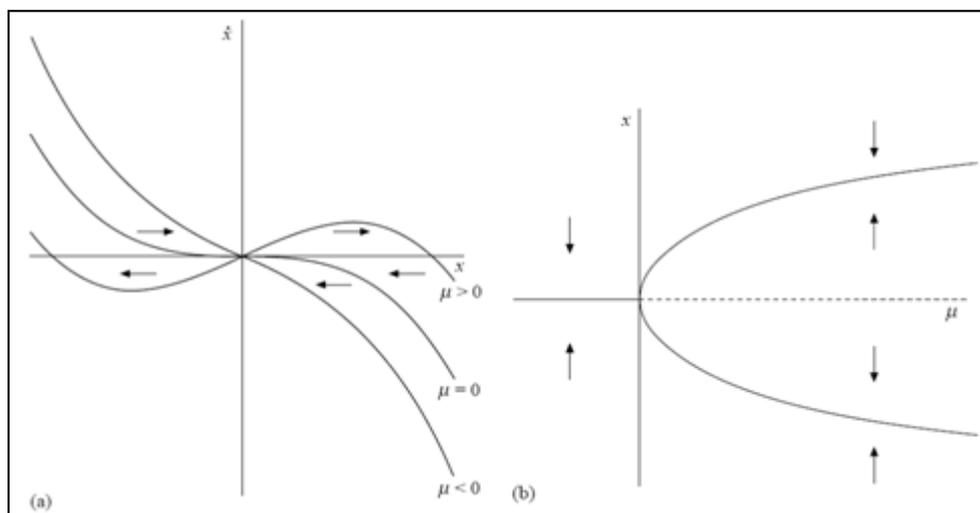


Figura 7: Bifurcação *pitchfork*: equação graficada (a) e diagrama de bifurcação (b). *Fonte: Médio e Lines, 2001.*

A mudança de característica monotônica para periódica, ou seja, o surgimento de um ciclo limite, em um sistema contínuo, é chamado de bifurcação Hopf. É um fenômeno que vem sendo

identificado em inúmeros reatores químicos e bioquímicos (Strogatz, 1994). Essa bifurcação só é possível, em sistemas contínuos, quando há mais de uma equação diferencial envolvida.

Há dois métodos genéricos que podem fazer sistemas de equações diferenciais perderem sua estabilidade, uma delas é a bifurcação sela e a outra a bifurcação Hopf (Médio e Lines, 2001). Neste caso a perda da estabilidade se dá ao variar um parâmetro de bifurcação, fazendo com que a parte real negativa, do par complexo conjugado dos autovalores, atravessasse a ordenada do plano imaginário tornando-se positiva. Uma bifurcação Hopf surge quando a parte real dos autovalores se anula em função de um parâmetro μ . Como pode ser visto na Figura 8, o ponto Hopf surge quando $\mu = 0$. O retrato de fase da formação de uma bifurcação Hopf supercrítica pode ser visualizado na Figura 9(a), onde α é o parâmetro de bifurcação. Para $\alpha \leq 0$ o equilíbrio é um foco, enquanto que para $\alpha > 0$ o sistema apresenta uma órbita periódica, ambos estáveis (Kusnetsov, 1998). Na Figura 9(b) ocorre o inverso surgindo uma bifurcação Hopf subcrítica. Em outras palavras o termo supercrítico é definido como o surgimento de um ciclo limite no ponto de bifurcação e o termo subcrítico como o desaparecimento do ciclo limite no ponto de bifurcação (Kusnetsov, 1998). Obviamente este conceito é relativo à direção de varredura da variável de controle.

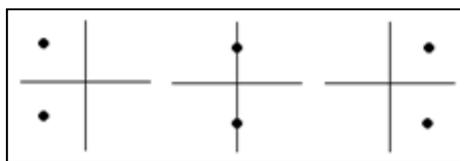


Figura 8: Localização dos autovalores no plano complexo em função de μ . *Adaptado: Bequette, 1998.*

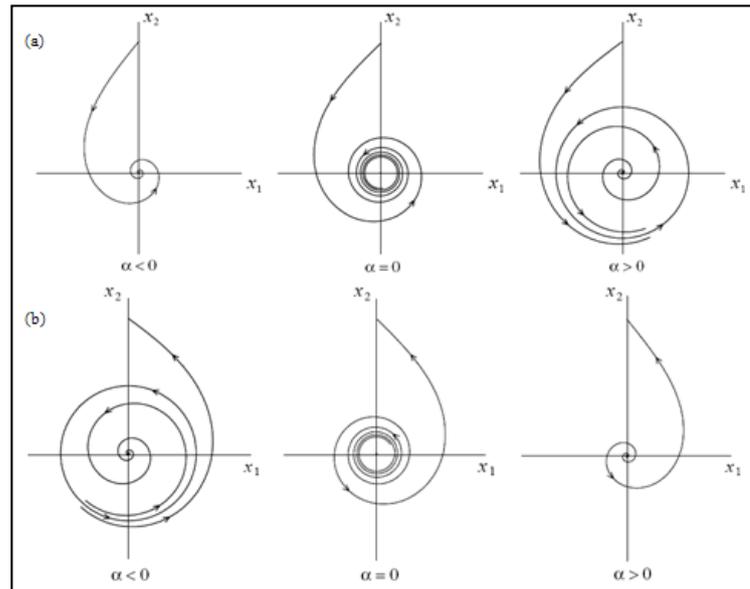


Figura 9: Retrato de fase da formação de uma bifurcação Hopf: (a) supercrítica e (b) subcrítica. *Fonte: Kusnetsov, 1998.*

Em um sistema de equações diferenciais ordinárias lineares a formação de uma bifurcação Hopf gera comportamento de centro ao invés de ciclos limite. Isto pode ser visualizado na Figura 10, onde o ponto Hopf surge em $\alpha = 0$. Perturbações no sistema quando $\alpha = 0$ induzem a formação de diferentes órbitas fechadas.

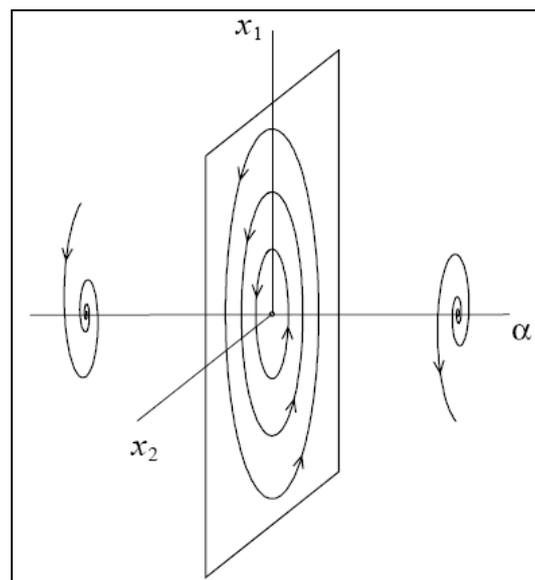


Figura 10: Bifurcação Hopf em sistemas lineares. *Fonte: Kusnetsov, 1998.*

Apêndice C

Tabela de funções contínuas ajustadas aos estados da Fermentação 2 e utilizadas na obtenção de dados experimentais com melhor representatividade do comportamento geral desta fermentação.

Estado: Concentração de Biomassa			
Intervalo (horas)		0 até 30	
Modelo Ajustado		Polinômio de Grau 8	
Região <i>a</i>	Função	$Cx(t) = p_1t^8 + p_2t^7 + p_3t^6 + p_4t^5 + p_5t^4 + p_6t^3 + p_7t^2 + p_8t + p_9$	
	Parâmetros	$p_1 = -2,321e-12$	$p_2 = 6,53e-1$
		$p_4 = 4,472e-6$	$p_5 = -0,000159$
		$p_7 = -0,05481$	$p_8 = 0,5278$
$p_3 = -7,432e-8$	$p_6 = 0,003606$	$p_9 = 0,4197$	
R ²		0,9814	
Intervalo (horas)		30 até 52	
Modelo Ajustado		Polinômio de Grau 4	
Região <i>b</i>	Função	$Cx(t) = p_1t^4 + p_2t^3 + p_3t^2 + p_4t + p_5$	
	Parâmetros	$p_1 = -1,463e-5$	$p_2 = 0,002403$
		$p_4 = 3,925$	$p_5 = -36,24$
		$p_3 = -0,1465$	
R ²		1,0	
Intervalo (horas)		52 até 80	
Modelo Ajustado		Polinômio de Grau 3	
Região <i>c</i>	Função	$Cx(t) = p_1t^3 + p_2t^2 + p_3t + p_4$	
	Parâmetros	$p_1 = 1,548e-5$	$p_2 = 0,000757$
		$p_3 = -0,3673$	$p_4 = 17,48$
R ²		0,9899	
Intervalo (horas)		80 até 294	
Modelo Ajustado		Série de Fourier com 8 termos	
Região <i>d</i>	Função	$Cx(t) = a_0 + a_1\cos(tw) + b_1\sin(tw) + a_2\cos(2tw) + b_2\sin(2tw) + a_3\cos(3tw) + b_3\sin(3tw) + a_4\cos(4tw) + b_4\sin(4tw) + a_5\cos(5tw) + b_5\sin(5tw) + a_6\cos(6tw) + b_6\sin(6tw) + a_7\cos(7tw) + b_7\sin(7tw) + a_8\cos(8tw) + b_8\sin(8tw)$	
	Parâmetros	$a_0 = 2,434$	$a_1 = 0,3164$
		$a_2 = 0,096$	$b_2 = -0,05671$
		$b_3 = 0,3841$	$a_4 = -0,2086$
$a_5 = -0,1262$		$b_5 = -0,4936$	
$b_6 = 0,5871$		$a_7 = -0,044$	
$a_8 = 0,1869$		$b_8 = 0,09926$	
$b_1 = -0,3471$		$a_3 = 0,05064$	
$b_4 = -0,1454$		$a_6 = 0,153$	
$b_7 = -0,1665$	$w = 0,02373$		
R ²		0,9424	

Estado: **Concentração de Produto (Etanol)**

	Intervalo (horas)	0 até 52		
	Modelo Ajustado	Polinômio de Grau 7		
Região <i>e</i>	Função	$Cp(t) = p_1t^7 + p_2t^6 + p_3t^5 + p_4t^4 + p_5t^3 + p_6t^2 + p_7t + p_8$		
	Parâmetros	$p_1 = -6,377e-9$	$p_2 = 1,098e-6$	$p_3 = -7,255e-5$
		$p_4 = 0,002279$	$p_5 = -0,03315$	$p_6 = 0,0875$
		$p_7 = 5,17$	$p_8 = 4,514$	
	R ²	0,9983		
	Intervalo (horas)	52 até 57		
	Modelo Ajustado	Polinômio de Grau 4		
Região <i>f</i>	Função	$Cp(t) = p_1t^4 + p_2t^3 + p_3t^2 + p_4t + p_5$		
	Parâmetros	$p_1 = -0,01841$	$p_2 = 3,44$	$p_3 = -235,4$
		$p_4 = 6942$	$p_5 = -7,327e+004$	
	R ²	0,8862		
	Intervalo (horas)	57 até 294		
	Modelo Ajustado	Série de Fourier com 8 termos		
Região <i>g</i>	Função	$Cp(t) = a_0 + a_1\cos(tw) + b_1\sin(tw) + a_2\cos(2tw) + b_2\sin(2tw) + a_3\cos(3tw) + b_3\sin(3tw) + a_4\cos(4tw) + b_4\sin(4tw) + a_5\cos(5tw) + b_5\sin(5tw) + a_6\cos(6tw) + b_6\sin(6tw) + a_7\cos(7tw) + b_7\sin(7tw) + a_8\cos(8tw) + b_8\sin(8tw)$		
	Parâmetros	$a_0 = 75,73$	$a_1 = 12,61$	$b_1 = 9,378$
		$a_2 = -0,7983$	$b_2 = 18,46$	$a_3 = -9,327$
		$b_3 = 10,65$	$a_4 = -18,87$	$b_4 = -6,377$
		$a_5 = -3,336$	$b_5 = -10,88$	$a_6 = 11,36$
		$b_6 = 2,078$	$a_7 = -2,55$	$b_7 = -0,4561$
		$a_8 = 3,663$	$b_8 = -2,697$	$w = 0,02211$
	R ²	0,9488		
Estado: Concentração de Substrato (Glicose)				
	Intervalo (horas)	0 até 5		
	Modelo Ajustado	Polinômio de Grau 2		
Região <i>h</i>	Função	$Cs(t) = p_1t^2 + p_2t + p_3$		
	Parâmetros	$p_1 = -0,6781$	$p_2 = -5,221$	$p_3 = 42,13$
	R ²	0,9857		
	Intervalo (horas)	5 até 46		
	Modelo Ajustado	Polinômio de Grau 5		
Região <i>i</i>	Função	$Cs(t) = p_1t^5 + p_2t^4 + p_3t^3 + p_4t^2 + p_5t + p_6$		
	Parâmetros	$p_1 = 1,848e-007$	$p_2 = -1,727e-005$	$p_3 = 0,0005729$
		$p_4 = -0,006971$	$p_5 = 0,02207$	$p_6 = 1,046$
	R ²	0,9862		
Região	Intervalo (horas)	46 até 294		

<i>j</i>	Modelo Ajustado	Série de Fourier com 6 termos			
	Função	$Cs(t) = a_0 + a_1\cos(tw) + b_1\sin(tw) + a_2\cos(2tw) + b_2\sin(2tw) +$ $a_3\cos(3tw) + b_3\sin(3tw) + a_4\cos(4tw) + b_4\sin(4tw) + a_5\cos(5tw)$ $+ b_5\sin(5tw) + a_6\cos(6tw) + b_6\sin(6tw)$			
	Parâmetros	$a_0 = 27,1$	$a_1 = -11,45$	$b_1 = 12,79$	$a_2 = -8,576$
		$b_2 = -11,47$	$a_3 = 8,716$	$b_3 = -13,56$	$a_4 = 4,296$
		$b_4 = 8,896$	$a_5 = -22,15$	$b_5 = 1,177$	$a_6 = 9,239$
		$b_6 = -3,641$	$w = 0,02567$		
	R^2	0,9568			

Anexo A

Enzimas presentes na rota metabólica utilizada por *Z. mobilis* e apresentada na Figura 6.4:

- | | |
|-----------------------------------|--|
| 1 – levanassacarase; | 14 – 2-ceto-3-desoxi-6-P gluconato aldolase; |
| 2 – invertase; | 15 – gliceraldeido-P desidrogenase; |
| 3 – manitol desidrogenase; | 16 – fosfoglicerato quinase; |
| 4 – glicose-frutose oxirredutase; | 17 – fosfoglicerato mutase; |
| 5 – frutoquinase; | 18 – enolase; |
| 6 – glicose-6-P isomerase; | 19 – piruvato quinase; |
| 7 – glicose desidrogenase; | 20 – lactato desidrogenase; |
| 8 – gluconolactonase; | 21 – triose-P isomerase; |
| 9 – gluconato quinase; | 22 – fosfatase; |
| 10 – glucoquinase; | 23 – glicerol-P desidrogenase; |
| 11 – glicose-6-P desidrogenase; | 24 – fosfatase; |
| 12 – 6-P-gluconolactonase; | 25 – piruvato descarboxilase; |
| 13 – 6-P-gluconato desidrogenase; | 26 – álcool desidrogenase. |