

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM ENGENHARIA
QUÍMICA – NÍVEL DE MESTRADO

**ALGORITMO GENÉTICO NA ESTIMAÇÃO DOS PARÂMETROS DA
PRODUÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) POR *CUPRIAVIDUS NECATOR***

CAMILA LARISSA HINTERHOLZ

TOLEDO – PARANÁ

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM ENGENHARIA
QUÍMICA – NÍVEL DE MESTRADO

**ALGORITMO GENÉTICO NA ESTIMAÇÃO DOS PARÂMETROS DA
PRODUÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) POR *CUPRIAVIDUS NECATOR***

CAMILA LARISSA HINTERHOLZ

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Estelita Goes Trigueros

Co-orientadores: Prof. Dr. Carlos Eduardo Borba
Prof^a. Dr^a. Mônica Lady Fiorese

TOLEDO – PARANÁ

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca da UNIOESTE – Campus de Marechal Cândido Rondon – PR., Brasil)

H666a	Hinterholz, Camila Larissa Algoritmo genético na estimação dos parâmetros da produção de Poli(3-hidroxibutirato) por <i>Cupriavidus necator</i> / Camila Larissa Hinterholz. - Toledo, 2015. 151 p. Orientadora: Dr ^a . Daniela Estelita Goes Trigueros Coorientadores: Dr. Carlos Eduardo Borba Dr ^a . Mônica Lady Fiorese Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, 2015. 1. Biopolímeros. 2. Algoritmo genético. 3. Plásticos. I. Trigueros, Daniela Estelita Goes. II. Borba, Carlos Eduardo. III. Fiorese, Mônica Lady. IV. Título. CDD 22.ed. 660.6 CIP-NBR 12899
-------	---

Ficha catalográfica elaborada por Marcia Elisa Sbaraini Leitzke CRB-9/539

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado apresentada por Camila Larissa Hinterholz a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia Química em 25 de fevereiro de 2015

COMISSÃO JULGADORA


Prof^ª. Dr^ª. Daniela Estelita Goes Trigueros
Orientadora


Prof^ª. Dr^ª. Mônica Lady Fiorese
Coorientadora


Prof. Dr. Alexander Dimitrov Kroumov
Membro


Prof. Dr. Aparecido Nivaldo Módenes
Membro

Ao meu amado companheiro Pedro Henrique

À minha mãe Mariane, ao meu pai Gerson e à minha irmã Amanda, pelo apoio incondicional e por tudo o que me ensinaram,

Ao meu querido companheiro Pedro Henrique, pela incansável dedicação, amor, paciência e por ser meu porto seguro,

À Prof^a. Dr^a. Daniela Estelita Goes Trigueros, pela paciência, dedicação e principalmente pela amizade,

Aos Professores Dr. Aparecido Nivaldo Módenes, Dr. Carlos Eduardo Borba, Dr. Fernando Rodolfo Espinoza Quiñones e Dr^a. Mônica Lady Fiorese, e à Cleusa Zimmer Nenevê, pelo apoio,

À minha querida sogra Andréa pelas sábias palavras,

À querida amiga Thuane, que esteve sempre presente,

À CAPES pelo apoio financeiro,

Meus Agradecimentos

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
NOMENCLATURA.....	xi
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Introdução.....	2
1.2 Objetivos.....	3
1.3 Justificativa.....	4
CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Resíduos Plásticos.....	6
2.2 Biopolímeros.....	7
2.3 Polihidroxicanoatos (PHAs).....	8
2.3.1 Caracterização dos PHAs.....	8
2.3.2 Poli(3-hidroxi-butirato) – PHB.....	9
2.3.3 <i>Cupriavidus necator</i>	10
2.4 Modelagem do Processo de Produção de Biopolímeros.....	12
CAPÍTULO III – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	26
3.1 Modelagem de processos biotecnológicos.....	27
3.2 Modelos cinéticos de crescimento microbiano.....	29
3.2.1 Classificação dos modelos cinéticos.....	29
3.2.1.1 Modelos Fenomenológicos.....	29
3.2.1.2 Modelos Entrada-Saída.....	30
3.2.2 Taxa de crescimento específico.....	30
3.2.3 Modelos para único substrato.....	31
3.2.3.1 Modelos de limitação pelo substrato.....	31
3.2.3.2 Modelos de inibição pelo substrato.....	33
3.2.4 Modelos para múltiplos substratos.....	34
3.3 Velocidades instantâneas de crescimento.....	35

3.4 Velocidades específicas de transformação.....	36
3.5 Fatores de conversão.....	37
3.6 Relação entre velocidades instantâneas e específicas.....	37
3.7 Transferência de Oxigênio e Respiração Microbiana.....	38
3.7.1 Modelagem da transferência de oxigênio.....	39
3.7.2 Modelo de respiração microbiana.....	40
3.7.3 Transferência de oxigênio e respiração microbiana – estimativa de K_{La} e Q_{O_2}	42
3.8 Estimação dos parâmetros do modelo matemático.....	44
3.8.1 Métodos de otimização.....	45
3.9 Algoritmo Genético.....	47
3.10 Análise estatística dos resultados.....	54
CAPÍTULO IV – METODOLOGIA.....	56
4.1 Descrição Geral.....	57
4.2 Modelagem matemática da produção de PHB.....	58
4.2.1 Cinética de processos fermentativos.....	59
4.2.2 Identificação do sistema de reações metabólicas.....	60
4.2.3 Cálculo das velocidades específicas de transformação.....	61
4.2.3.1. Cálculo da velocidade específica de crescimento celular.....	61
4.2.3.2 Cálculo da velocidade específica de consumo dos substratos.....	64
4.2.3.3 Cálculo da velocidade específica de produção de PHB.....	64
4.2.4 Estimativa preliminar dos coeficientes de rendimento.....	64
4.2.5 Classificação do processo fermentativo.....	65
4.2.6 Escolha dos modelos cinéticos de crescimento microbiano.....	65
4.2.7 Balanço de massa em sistema descontínuo.....	67
4.3 Estimação de parâmetros.....	67
4.4 Algoritmo Genético.....	68
4.5 Análises Estatísticas.....	69
4.5.1 Intervalo de confiança da função objetivo.....	69
4.5.2 Parâmetro F.....	71
4.5.3 Teste F-Fischer.....	71
4.5.4 Teste F-modificado.....	72
4.5.5 Teste χ^2 de Bartlett.....	73
4.5.6 Probabilidade absoluta.....	73
4.5.7 Teste de Randomicidade.....	74

4.5.8 Teste F-Fischer para dois modelos	75
CAPÍTULO V – RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
5.1 Estudo da cinética de reação	78
5.1.1 Velocidades específicas	80
5.1.2 Coeficientes de rendimento	87
5.2 Modelagem matemática do processo de produção de PHB	90
5.2.1 Cinética de crescimento de <i>Cupriavidus Necator</i> em cultivo descontínuo.....	91
5.2.2 Avaliação dos modelos cinéticos.....	92
5.2.3 Avaliação estatística dos parâmetros ajustados	107
5.2.3.1 Teste F-modificado.....	108
5.2.3.2 Teste χ^2 de Bartlett.....	109
5.2.3.3 Intervalo de confiança da função objetivo ponderada	110
5.2.3.4 Probabilidade absoluta	111
5.2.3.5 Teste F-Fischer para dois modelos	111
5.2.3.6 Teste de Randomicidade.....	112
5.2.3.7 Parâmetro F	113
5.2.3.8 Teste F-Fischer	114
5.2.3.8 Considerações finais sobre os modelos estudados	115
5.3 Simulação da Transferência de Oxigênio e Respiração Microbiana	116
CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES.....	122
REFERÊNCIAS	124
ANEXOS.....	139
ANEXO A – Descrição dos experimentos.....	140
ANEXO B – Dados cinéticos da fermentação em sistema descontínuo.....	143
ANEXO C – Avaliação dos dados cinéticos do cultivo de <i>C. necator</i> em cultivo descontínuo	145

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Principais famílias de bioplásticos conforme PRADELLA (2006).....	7
Tabela 2.2 – Estrutura geral dos PHAs.....	9
Tabela 2.3 – Parâmetros encontrados por Heinzle e Lafferty (1980)	16
Tabela 2.4 – Parâmetros cinéticos estimados por Mulchandani <i>et al.</i> (1989).....	17
Tabela 2.5 – Parâmetros estequiométricos estimados por Mulchandani <i>et al.</i> (1989).....	17
Tabela 2.6 – Valores de $\mu_{\text{máx}}$ em função de S_N/S_C estimados por Raje e Srivastava (1998)	18
Tabela 2.7 – Parâmetros cinéticos estimados por Tohyama <i>et al.</i> (2002)	19
Tabela 2.8 – Parâmetros estimados por Ross <i>et al.</i> (2003).....	20
Tabela 2.9 – Parâmetros encontrados por Shahhosseini (2004).....	20
Tabela 2.10 – Parâmetros cinéticos estimados por Patwardhan e Srivastava (2004)	21
Tabela 2.11 – Valores dos parâmetros encontrados por Khanna e Srivastava (2006)	22
Tabela 2.12 – Valores dos parâmetros encontrados por Patnaik (2006a)	23
Tabela 2.13 – Parâmetros cinéticos estimados por Wang <i>et al.</i> (2007).....	24
Tabela 2.14 – Parâmetros estimados por Gahlawat e Srivastava (2013).....	25
Tabela 3.1 – Modelos de limitação pelo substrato	32
Tabela 3.2 – Modelos de inibição pelo substrato	33
Tabela 3.3 – Modelos de limitação e inibição pelos substratos	35
Tabela 3.4 – Modelos de inibição entre os substratos.....	35
Tabela 3.5 – Equações para o cálculo dos resíduos	44
Tabela 4.1 – Propostas de mecanismo de reação na produção de PHB por <i>C. necator</i> ..	60
Tabela 4.2 – Modelos cinéticos de crescimentos celular e produção de produto utilizados para avaliar o efeito das concentrações dos substratos carbono e nitrogênio.....	66
Tabela 5.1 – Coeficientes de correlação para as propostas de rotas metabólicas	80
Tabela 5.2 – Valores de $\mu_{\text{máx}}$, duração da fase exponencial e tempo de geração estimados por regressão linear de $\ln(X)$ em função do tempo	80
Tabela 5.3 – Valores preliminares dos parâmetros estequiométricos	87
Tabela 5.4 – Estimativa inicial dos parâmetros estequiométricos	90
Tabela 5.5 – Parâmetros cinéticos dos modelos e parâmetros estequiométricos do sistema de EDO's.....	93
Tabela 5.6 – Parâmetros ajustados pelo modelo de Monod (1949)	94
Tabela 5.7 – Parâmetros ajustados pelo modelo de Andrews (1968)	94
Tabela 5.8 – Valores de K_s/K_i para ambos os substratos para o modelo de Andrews (1968)	95

Tabela 5.9 – Valores da taxa máxima de crescimento específico e concentração crítica dos substratos, carbono e nitrogênio, estimados a partir do modelo de Andrews (1968) .95	95
Tabela 5.10 - Parâmetros ajustados pelo modelo de Luedeking e Piret (1959).....95	95
Tabela 5.11 – Parâmetros ajustados pelo modelo de Heinzle e Lafferty (1980).....96	96
Tabela 5.12 – Parâmetros ajustados pelo modelo de Dunn <i>et al.</i> (1992)96	96
Tabela 5.13 – Valores de K_s/K_i para o modelo de Dunn <i>et al.</i> (1992)97	97
Tabela 5.14 – Valores da taxa máxima de crescimento específico e concentração crítica do substrato carbono, estimados a partir do modelo de Dunn <i>et al.</i> (1992).....97	97
Tabela 5.15 – Resultados obtidos pelo ajuste dos modelos aos dados experimentais...107	107
Tabela 5.16 – Graus de liberdade dos modelos.....108	108
Tabela 5.17 – Erro experimental estimado pelo teste F-modificado108	108
Tabela 5.18 – Resultados do teste do χ^2 de Bartlett109	109
Tabela 5.19 – Intervalo de confiança da função objetivo ponderada.....110	110
Tabela 5.20 – Valores da probabilidade absoluta dos modelos111	111
Tabela 5.21 – Valores da distribuição F-Fischer112	112
Tabela 5.22 – Resultados do teste de randomicidade.....113	113
Tabela 5.23 – Valores do Parâmetro F dos modelos114	114
Tabela 5.24 – Estimativa da variância experimental114	114
Tabela 5.25 – Resultados do teste F-Fisher115	115
Tabela 5.26 – Valores dos parâmetros do modelo de Andrews (1968) e da transferência e consumo de oxigenio ajustados aos dados de 32,5°C121	121
Tabela B.1 - Dados cinéticos para a temperatura de 30°C143	143
Tabela B.2 - Dados cinéticos para a temperatura de 32,5°C143	143
Tabela B.3 - Dados cinéticos para a temperatura de 35°C144	144
Tabela B.4 - Dados cinéticos para a temperatura de 37,5°C144	144
Tabela B.5 - Dados cinéticos para a temperatura de 40°C144	144
Tabela C.1 - Valores estimados pelos dados experimentais do cultivo de <i>C. necator</i> com 30 g L-1 de glicose/frutose e 1,15 g L-1 de (NH4)2SO4.....14452	14452

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Imagens microscópicas de elétron de transmissão (TEM) de <i>C. necator</i> na produção de PHB: (A) 2,5h; (B) 5h; (C) 9h;(D) 24h (TIAN, 2005).....	11
Figura 2.2 – Dados experimentais e modelagem da cinética de fermentação de <i>R. eutropha</i> em biorreator descontínuo	12
Figura 2.3 – Dados experimentais e modelagem da cinética de fermentação de <i>R. eutropha</i> em biorreator descontínuo: (◇)frutose; (□) PHB; (O) biomassa; (●) nitrogênio...13	13
Figura 2.4 – Dados experimentais e modelagem da cinética de fermentação de <i>A. australica</i> em biorreator descontínuo: (◇) sacarose; (◆) PHB; (▲) biomassa; (✕) nitrogênio	13
Figura 2.5 – Dados experimentais e modelagem da cinética de fermentação de <i>Alcaligenes sp.</i> em biorreator descontínuo: (▲) açúcares totais; (■) PHB; (◆) biomassa; (✕) uréia.....	13
Figura 3.1 Etapas para modelagem matemática de processos fermentativos.....	28
Figura 3.2 – Representação gráfica do modelo de Monod (1949).....	32
Figura 3.3 – Representação gráfica do modelo de Andrews 1968	34
Figura 3.4 – Interface gás-líquido com as películas estagnadas Fonte: Adaptado de Schmidell <i>et al.</i> (2001)	39
Figura 3.5 – Perfil de O ₂ dissolvido obtido pelo método dinâmico	42
Figura 3.6 – Esquema do funcionamento de Algoritmo Genético.....	49
Figura 3.7 – Esquema do método da seleção por roleta	50
Figura 3.8 – Esquema do método da seleção por torneio	50
Figura 3.9 – Esquema do método da seleção por dizimação	51
Figura 3.10 – Esquema do método do cruzamento por ponto único	51
Figura 3.11 – Esquema do método do cruzamento por ponto duplo	51
Figura 3.12 – Esquema do método do cruzamento por pontos aleatórios.....	52
Figura 3.13 – Esquema do método da mutação aleatória	52
Figura 3.14 – Esquema do método da mutação por troca.....	53
Figura 4.1 – Metodologia geral adotada no trabalho	57
Figura 4.2 – Detecção da fase de crescimento exponencial	62
Figura 4.3 – Aprimoramento do perfil de X _r em função do tempo	63
Figura 4.4 – Ajuste polinomial.....	63
Figura 4.6 – Esquema do AG implementado	68
Figura 5.1 – Perfis de velocidade específica do cultivo de <i>C. necator</i> na temperatura de 30°C	82
Figura 5.2 – Perfis de velocidade específica do cultivo de <i>C. necator</i> na temperatura de 32,5°C	82

Figura 5.3 – Perfis de velocidade específica do cultivo de <i>C. necator</i> na temperatura de 35°C	83
Figura 5.4 – Perfis de velocidade específica do cultivo de <i>C. necator</i> na temperatura de 37,5°C	83
Figura 5.5 – Velocidade específica de crescimento de <i>C. necator</i> em função da razão entre a fonte de nitrogênio e carbono	85
Figura 5.6 – Velocidade específica de crescimento microbiano com relação à: (a) concentração de carbono (S_C); e (b) concentração de nitrogênio (S_N)	86
Figura 5.7 – Perfis utilizados para a obtenção dos coeficientes de rendimento à 30°C....	88
Figura 5.8 – Perfis utilizados para a obtenção dos coeficientes de rendimento à 32,5°C.	88
Figura 5.9 – Perfis utilizados para a obtenção dos coeficientes de rendimento à 35°C....	89
Figura 5.10 – Perfis utilizados para a obtenção dos coeficientes de rendimento à 37,5°C	89
Figura 5.11 – Simulação do modelo de Monod (1949) aplicado aos dados experimentais: (a) 30 °C; (b) 32,5 °C; (c) 35 °C; e (d) 37,5 °C	97
Figura 5.12 – Simulação do modelo de Andrews (1968) aplicado aos dados experimentais: (a) 30 °C; (b) 32,5 °C; (c) 35 °C; e (d) 37,5 °C	98
Figura 5.13 – Simulação do modelo de Luedeking e Piret (1959) aplicado aos dados experimentais: (a) 30°C; (b) 32,5 °C; (c) 35 °C; e (d) 37,5 °C	98
Figura 5.14 – Simulação do modelo de Heinzle e Lafferty (1980) aplicado aos dados experimentais: (a) 30°C; (b) 32,5 °C; (c) 35 °C; e (d) 37,5 °C	99
Figura 5.15 – Simulação do modelo de Dunn <i>et al.</i> (1992) aplicado aos dados experimentais de: (a) 30 °C; (b) 32,5 °C; (c) 35 °C; e (d) 37,5 °C	99
Figura 5.16 – Velocidades específicas calculadas a partir dos modelos avaliados em função da concentração da fonte de carbono, para a temperatura de 30°C.....	100
Figura 5.17 – Velocidades específicas calculadas a partir dos modelos avaliados em função da concentração da fonte de carbono, para a temperatura de 32,5°C.....	100
Figura 5.18 – Velocidades específicas calculadas a partir dos modelos avaliados em função da concentração da fonte de carbono, para a temperatura de 35°C.....	101
Figura 5.19 – Velocidades específicas calculadas a partir dos modelos avaliados em função da concentração da fonte de carbono, para a temperatura de 37,5°C.....	101
Figura 5.20 – Velocidades específicas calculadas a partir dos modelos avaliados em função da concentração da fonte de nitrogênio, para a temperatura de 30°C.....	102
Figura 5.21 – Velocidades específicas calculadas a partir dos modelos avaliados em função da concentração da fonte de nitrogênio, para a temperatura de 32,5°C.....	102
Figura 5.22 – Velocidades específicas calculadas a partir dos modelos avaliados em função da concentração da fonte de nitrogênio, para a temperatura de 35°C.....	103
Figura 5.23 – Velocidades específicas calculadas a partir dos modelos avaliados em função da concentração da fonte de nitrogênio, para a temperatura de 37,5°C.....	103
Figura 5.24 – Taxas de crescimento específico para 32,5°C (Andrews, 1968) e para 35°C (Heinzle & Lafferty, 1980)	116

Figura 5.25 – Simulação do modelo de Andrews (1968) aplicado aos dados experimentais a temperatura de 32,5°C considerando-se a transferência e consumo de oxigênio	118
Figura 5.26 – Simulações da respiração microbiana: (A) O ₂ dissolvido e (B) CO ₂ dissolvido.....	119
Figura 5.27 – Simulações da respiração microbiana: (A) O ₂ e C _{O2} na fase gasosa e (B) líquida.....	119
Figura 5.28 – Perfil de consume de O ₂ (A) em função de O ₂ dissolvido e (B) ao longo do tempo	120
Figura C.1 – Cinética do cultivo de <i>C. necator</i> em 30°C	146
Figura C.2 – Cinética do cultivo de <i>C. necator</i> em 32,5°C	147
Figura C.3 – Cinética do cultivo de <i>C. necator</i> em 35°C	148
Figura C.4 – Cinética do cultivo de <i>C. necator</i> em 37,5°C	149
Figura C.5 – Cinética do cultivo de <i>C. necator</i> em 40°C	150

NOMENCLATURA

GL	graus de liberdade	---
μ	taxa de crescimento específico	T^{-1}
μ_{max}	taxa máxima de crescimento específico	T^{-1}
μ_{Xr}	velocidade específica de crescimento celular	T^{-1}
μ_{XT}	velocidade específica de aumento de biomassa total	T^{-1}
μ_P	velocidade específica de produção de PHB	T^{-1}
μ_{SC}	velocidade específica de consumo de fonte de carbono	T^{-1}
μ_{SN}	velocidade específica de consumo de fonte de nitrogênio	T^{-1}
σ	desvio padrão	---
a_W	atividade da água	---
a_{Wmax}	máxima atividade da água	---
$C_{O_2}^g$	concentração de O_2 dissolvido em equilíbrio com $p_{O_2}^g$	$M L^{-3}$
$C_{O_2}^*$	concentração de O_2 dissolvido em equilíbrio com $p_{O_2}^*$	$M L^{-3}$
C_{O_2}	concentração de O_2 dissolvido	$M L^{-3}$
FObj	função objetivo	---
H	constante de Henry	$T^2 L^{-2}$
k_g	coeficiente de transferência de massa da película gasosa	$M T^{-1}$
k_L	coeficiente de transferência de massa da película líquida	$M T^{-1}$
K_{La}	coeficiente volumétrico de transferência de O_2	T^{-1}
K_S	constante de saturação pelo substrato limitante	$M L^{-3}$
K_{SC}	constante de saturação pelo substrato carbono	$M L^{-3}$
K_{SN}	constante de saturação pelo substrato nitrogênio	$M L^{-3}$
K_{Sr}	constante de saturação pela razão entre nitrogênio e carbono	$M L^{-3}$
K_i	constante de inibição pelo substrato	$M L^{-3}$
n	expoente do termo sigmoidal de equações cinéticas	---
m	expoente de equações cinéticas	---
m_{SC}	termo de consumo de carbono para manutenção celular	$M M^{-1} T^{-1}$
m_{SN}	termo de consumo de nitrogênio para manutenção celular	$M M^{-1} T^{-1}$
m_P	termo de consumo de carbono para manutenção celular	$M M^{-1} T^{-1}$
m_{O_2}	termo de consumo de O_2 para manutenção celular	$M M^{-1} T^{-1}$
n_{O_2}	fluxo de oxigênio por unidade de área interfacial	$M L^{-2} T^{-1}$
n_{O_2a}	velocidade de transferência de oxigenio	$M L^{-3} T^{-1}$
P	concentração de poli(3-hidroxi-butirato)	$M L^{-3}$

p_{ox}^g	pressão parcial de O_2 no seio gasoso	$M L^{-1} T^{-2}$
p_{ox}	pressão parcial de O_2 em equilíbrio com C_{ox}	$M L^{-1} T^{-2}$
p_{ox}^*	pressão parcial de O_2 na interface	$M L^{-1} T^{-2}$
P_{Xr}	produtividade em biomassa	$M T^{-1}$
P_P	produtividade do produto	$M T^{-1}$
P_m	concentração máxima de PHB	$M L^{-3}$
P_0	concentração de PHB no tempo inicial	$M L^{-3}$
P_t	concentração de proteínas	$M L^{-3}$
Q_{O_2}	velocidade específica de respiração	$M M^{-1} T^{-1}$
Q_{O_2max}	taxa máxima de consumo de O_2	$M M^{-1} T^{-1}$
R	resíduo	---
r_{Xr}	velocidade instantânea de crescimento celular	$M L^{-3} T^{-1}$
r_P	velocidade instantânea de produção de PHB	$M L^{-3} T^{-1}$
r_{SC}	velocidade instantânea de consumo de fonte de carbono	$M L^{-3} T^{-1}$
r_{SN}	velocidade instantânea de consumo de fonte de nitrogênio	$M L^{-3} T^{-1}$
S	concentração de substrato limitante	$M L^{-3}$
S_C	concentração de fonte de carbono	$M L^{-3}$
S_N	concentração de fonte de nitrogênio	$M L^{-3}$
S_r	razão entre as concentrações de nitrogênio e carbono	---
S_m	Parâmetro de inibição das equações de Mulchandani e Luong	---
S_i^2	variância do modelo i	---
T	temperatura	θ
t	tempo	T
t_f	tempo final de reação	T
t_{rP}	tempo total de produção	T
X_T	concentração de biomassa total	$M L^{-3}$
X_r	concentração de biomassa residual	$M L^{-3}$
X_{rm}	concentração máxima de biomassa residual	$M L^{-3}$
X_0	concentração de biomassa no tempo inicial	$M L^{-3}$
$Y_{Xr/SC}$	fator de conversão de carbono em biomassa	$M M^{-1}$
$Y_{Xr/SN}$	fator de conversão de nitrogênio em biomassa	$M M^{-1}$
$Y_{Xr/P}$	fator de conversão de produto em célula	$M M^{-1}$
$Y_{P/SC}$	fator de conversão de substrato em produto	$M M^{-1}$
$Y_{Xr/Ox}$	fator de conversão de O_2 em células	$M M^{-1}$
y_i	valor experimental da variável i	$M L^{-3}$

\tilde{y}_i	valor calculado da variável i	M L ⁻³
$(y_i)_m$	máximo valor da variável experimental i	M L ⁻³

HINTERHOLZ, Camila Larissa. **Algoritmo Genético na estimação dos parâmetros da produção de poli(3-hidroxiacetato) por *Cupriavidus necator***. Dissertação (Mestrado) em Engenharia Química. Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE/Campus Toledo, 2013.

RESUMO

Os biopolímeros, em especial o Poli(3-hidroxiacetato) (PHB), têm recebido grande atenção na tentativa de minimizar danos ambientais causados pelo acúmulo de plásticos de origem petroquímica. Neste âmbito, o objetivo deste trabalho foi formular um modelo matemático para o processo de produção do PHB por *Cupriavidus necator*, a partir de um estudo teórico detalhado. Para tanto, foram avaliados 5 modelos de crescimento celular e 1 modelo para a formação do produto, todos obtidos da literatura. O sistema de equações diferenciais ordinárias foi resolvido numericamente pelo método de *Rosenbrock*. Para a estimação dos parâmetros dos modelos foi desenvolvido um algoritmo baseado nos Algoritmos Genéticos, o qual foi implementado no *software* Maple®. Para a validação dos modelos, dados experimentais de ensaios a 30, 32,5, 35 e 37,5 °C foram obtidos da literatura. A partir da análise dos dados foi verificado que a melhor temperatura, tanto para o crescimento da biomassa quanto para a formação do produto, foi de 32,5 °C, e que a produção de PHB está parcialmente associada ao crescimento celular. Para a estimação dos parâmetros, o sistema de equações diferenciais ordinárias obtidas a partir da modelagem fenomenológica de modelos não estruturados e não segregados foi avaliado juntamente com os modelos da literatura. Os resultados obtidos para a função objetivo e coeficiente de correlação indicaram que todos os modelos estudados se ajustaram bem aos dados experimentais em todas as temperaturas. Assim, para uma melhor avaliação dos ajustes foram aplicados alguns testes estatísticos, cujos resultados indicaram o modelo de Andrews (1968) como sendo o que melhor representa os dados à temperatura de 32,5 °C, e o modelo de Heinzle e Lafferty (1980) para os dados à 35 °C. Para as temperaturas de 30 e 37,5 °C não foi encontrado um modelo estatisticamente válido. Logo, a metodologia estatística aplicada para a discriminação de modelos e avaliação da qualidade dos ajustes tornou possível a identificação do modelo que melhor representa os dados em cada temperatura.

Palavras – Chave: modelagem, bioprocessos, algoritmo genético, PHB

HINTERHOLZ, Camila Larissa. **Genetic Algorithm in the parameters estimation of the poli(3-hidroxi-butirato) production process by *Cupriavidus necator***. 151 p. 2015. Masters Dissertation in Chemical Engineering. West Paraná State University.

ABSTRACT

Biopolymers, especially Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), have been receiving big attention in order to minimize environmental damage caused by plastics from petrochemical industries. In this context, the aim of this paper was to formulate a mathematical model to describe the PHB production by *Cupriavidus necator*, from a detailed theoretical study. To this end, 6 models were evaluated, being 5 for cell growth and 1 for product formation, all from the literature. The ordinary differential equations system was solved numerically by Rosenbrock method. To the parameters estimation, an algorithm based on the Genetic Algorithms was developed and implemented in the software Maple®. To validate the models, experimental data at 30, 32,5, 35 and 37,5 °C were obtained from the literature. From the data analysis, it was observed that the best temperature, for both cell growth and product formation was 32,5 °C, and that the PHB production is partially associated with cell growth. To the parameters estimation, the ordinary differential equations system, obtained from the phenomenological modelling of non-structured and non-segregated models, was evaluated together with the models from the literature. The results for the objective function and correlation coefficient indicated that all the studied models adjusted well to the experimental data at all temperatures. Thus, some statistical tests were applied in order to better evaluate the models fitting, and the results indicated the Andrews's (1968) model as the one that best represents the data from 32,5 °C, and Heinzle e Lafferty's (1980) model for 35 °C. For the data at 30 and 37,5 °C there was no statistically valid models found. In conclusion, the statistical methodology applied for the models discrimination and fitting evaluation made it possible to say which model best represents data at each temperature.

Keywords: modelling, bioprocesses, genetic algorithm, PHB

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

1.1 Introdução

A importância de se desenvolver processos rentáveis para a produção de bioplásticos está no problema do destino dado aos plásticos de origem petrolífera, já que estes levam centenas de anos para se decompor na natureza. Este fato, associado ao grande aumento da demanda de produtos plásticos, tem gerado um grande interesse nesta área.

Neste contexto, o poli(3-hidroxi-butarato), ou poli(β -hidroxi-butarato), (PHB) é um dos biopolímeros mais estudados atualmente, por possuir características interessantes à sua industrialização, além da facilidade de obtenção. No processo de produção do PHB por *Cupriavidus necator* são utilizados carbono e nitrogênio como fontes de energia, sendo o primeiro em excesso e o último limitado. A partir do momento da limitação de nitrogênio, o PHB é armazenado no interior da bactéria como forma de reserva de energia.

A modelagem e otimização de processos biotecnológicos refere-se ao desenvolvimento de modelos, empíricos e/ou fenomenológicos, que descrevam adequadamente um processo. Estes modelos são associados a técnicas computacionais de estimação de parâmetros, que podem ser convencionais ou avançadas, dependendo da complexidade do processo, a fim de se determinar as condições ótimas de operação. Neste âmbito, a modelagem e simulação de produção de PHB a partir de *Cupriavidus necator* em sistema batelada, utilizando glicose e frutose como principal fonte de carbono, necessita de uma técnica computacional avançada, pois engloba elevado número de parâmetros, tornando inviável a utilização das técnicas convencionais.

A partir disto, fica explícita a necessidade de se determinar as melhores condições para a obtenção de PHB a partir de *Cupriavidus necator*, sendo para tanto, necessário um estudo aprofundado sobre as variáveis que influenciam o processo.

1.2 Objetivos

Este trabalho tem por objetivo estabelecer um modelo matemático para a produção de poli(3-hidroxiacetato) por meio da bactéria *Cupriavidus necator* em cultivo descontínuo. Uma metodologia sequencial foi utilizada a partir dos seguintes objetivos específicos:

1. Formulação dos modelos fenomenológicos não-estruturados, cujas metas são a identificação do sistema de reações metabólicas, cálculo das velocidades específicas de crescimento celular, de consumo de substrato e de formação do produto. Essas informações servirão para classificar a cinética de formação do bioproduto, auxiliando na escolha dos modelos de crescimento celular;
2. Escolha dos modelos matemáticos de crescimento celular considerando a presença de múltiplos substratos, os quais serão avaliados a partir de dados experimentais extraídos da literatura;
3. Descrição do balanço de massa em sistema descontínuo, cujo sistema de equações diferenciais ordinárias é função das variáveis do processo: concentração celular, concentrações de substratos e concentração do bioproduto, as quais ficam inter-relacionadas pelos modelos de crescimento celular admitindo modelo não-estruturado e não-segregado;
4. Descrição e implementação do método baseado em Algoritmos Genéticos para a estimação de parâmetros cinéticos e estequiométricos, utilizando o software Maple®;
5. Discriminação e validação dos modelos cinéticos a partir de testes estatísticos adequados a bioprocessos;
6. Simulação do processo considerando o modelo que melhor ajustou-se aos dados experimentais.

1.3 Justificativa

A obtenção de materiais biodegradáveis como alternativa aos derivados de petróleo tem sido uma das diversas formas de sustentabilidade e proteção ambiental desenvolvidas nos últimos anos. Nesse contexto, o estudo da produção de materiais poliméricos a partir de processos biotecnológicos mostra-se interessante, especialmente a obtenção do poli(3-hidroxi-butirato) o qual consiste em um dos biopolímeros polihidroxialcanoatos, que além de serem os únicos de origem microbiana totalmente biodegradáveis, apresentam propriedades semelhantes aos plásticos de origem petroquímica.

Sendo os biopolímeros formados durante o ciclo de crescimento de microrganismos vivos, sua síntese envolve reações catalisadas por enzimas a partir de processos metabólicos complexos, os quais necessitam de uma adequada investigação no intuito de sugerir os fenômenos microbiológicos envolvidos e, por conseguinte auxiliar na busca pelas condições ótimas de cultivo e crescimento celular, bem como condições ótimas de operação durante a produção do produto de interesse.

Apesar da complexidade dos bioprocessos, devido à presença de diversas reações e rotas metabólicas possíveis, uma descrição matemática do processo é fundamental na tentativa de buscar os fenômenos envolvidos no processo biológico de produção do polímero como uma ferramenta para a otimização do processo produtivo. Logo, a pesquisa justifica-se pela necessidade de bioprocessos eficientes durante a produção de materiais poliméricos frente à necessidade ambiental em que os processos produtivos estão inseridos atualmente.

CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Resíduos Plásticos

O desenvolvimento tecnológico e o crescimento econômico trouxeram vários benefícios para a sociedade que, entretanto, aliados a um comportamento de consumo inadequado, provocaram também vários efeitos colaterais. Um destes efeitos que tem sido alvo de grande preocupação é a poluição, que pode acarretar na degradação do meio ambiente e a conseqüente redução na qualidade de vida do homem (ROLIM, 2000).

A partir desta problemática surgiu o conceito de desenvolvimento sustentável, que segundo Donaire (1999), possui três vantagens principais: crescimento econômico, equidade social e equilíbrio ecológico. Para que tal equilíbrio ecológico seja alcançado, é necessário que sejam evitadas algumas situações irreversíveis tais como a destruição da biodiversidade ou o esgotamento de certas matérias-primas (ROLIM, 2000). Neste contexto, o gerenciamento adequado de resíduos é uma das alternativas que contribuem em larga escala para se atingir o desenvolvimento sustentável, visto que permite a economia de capital natural e de saneamento ambiental.

Segundo Demajorovic (1995), esta relação entre a geração de resíduos e a problemática ambiental, torna-se ainda mais visível quando se trata de resíduos sólidos, devido ao seu grande volume e pequena dispersão, quando comparados com os resíduos líquidos ou gasosos. Em se tratando de resíduos sólidos, os polímeros ocupam um lugar de destaque no atual cenário econômico, devido à alta resistência, pesos relativamente baixos, e à flexibilidade de processamento, sendo amplamente utilizados em várias áreas da indústria, para a produção de artefatos em geral (LUVIZETTO, 2007). De acordo com Pradella (2006), a produção de termoplásticos está estimada em $1,8 \cdot 10^8$ ton/ano. Esta ampla utilização, juntamente com sua baixíssima taxa de degradação no meio ambiente, colocam os polímeros entre os agentes poluidores que mais preocupam a sociedade (LUVIZETTO *et al.*, 2006).

Para contornar esse problema, estão sendo estudadas alternativas como a reciclagem de produtos constituídos de plásticos e a sua substituição por plásticos biodegradáveis, mais compatíveis com o pensamento de preservação ambiental (SOTERO, 2000).

2.2 Biopolímeros

Definidos por Steinbüchel (2001), os biopolímeros são macromoléculas produzidas por organismos vivos, as quais são formadas por moléculas idênticas ou muito similares, que se constituem em grande cadeia de ligações covalentes. São classificados, segundo Pradella (2006), a depender da estrutura química das macromoléculas, além do método de produção (ver Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Principais famílias de bioplásticos conforme PRADELLA (2006)

BIOPLÁSTICO	POLÍMERO	ESTRUTURA/MÉTODO DE PRODUÇÃO
Polímeros de amido	Polissacarídeo	Polímero natural modificado
Polilactatos (PLA)	Poliéster	Fermentação de ácido láctico
Poli-hidroxicarboxilatos (PHAs)	Poliéster	Fermentação direta de fonte de carbono por microrganismos ou em vegetais geneticamente modificados
Poliésteres Alifáticos Aromáticos (PAA)	Poliéster	1-3 propanodiol produzido por fermentação seguido de copolimerização com AT ou DMT
Politrimetilenotereftalato (PTT)		1-4 butanodiol produzido por fermentação seguido de copolimerização com AT
Polibutilenotereftalato (PBT)		1-4 butanodiol copolimerizado com ácido succínico, ambos produzidos por fermentação
Polibutilenosuccinato (PBS)		
Poliuretanas (PURs)	Poliuretano	Polimerização de poliois obtidos por fermentação ou purificação química com isocianatos petroquímicos
Nylon 6 Nylon 66 Nylon 69	Poliamida	Caprolactama produzida por fermentação Ácido adípico produzido por fermentação Monômero obtido por transformação química do ácido oleico

Os biopolímeros são classificados quanto à estrutura polimérica – polissacarídeo, poliéster, poliuretano e poliamida –, sendo que na fermentação utiliza-se como principal matéria-prima uma fonte de carbono renovável, a qual geralmente são os carboidratos derivados de cana-de-açúcar, milho, batata, trigo e beterraba, além de óleo vegetal extraído de soja, girassol, palma ou outra planta gelatinosa (PRADELLA, 2006).

2.3 Polihidroxicanoatos (PHAs)

2.3.1 Caracterização dos PHAs

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são materiais termoplásticos que, quando comparados com os polímeros sintéticos, possuem a vantagem fundamental de serem renováveis e não serem derivados do petróleo (DUFRESNE *et al.*, 2003).

São polímeros de hidroxicanoatos ou hidroxicenóicos que são acumulados na forma de materiais de reserva de carbono ou energia em uma grande variedade de microrganismos. Este acúmulo ocorre normalmente em condições limitantes de elementos essenciais, como nitrogênio, fósforo, enxofre ou oxigênio, na presença de fonte de carbono em excesso (ANDERSON & DAWES, 1990). São formados como inclusões nas células, geralmente esféricas, com diâmetro médio de 0,2 – 0,5 μm (KIM & LENZ, 2001).

A variação das posições do grupo hidroxila e do radical (R) nas unidades monoméricas, bem como o grau de polimerização, influem nas propriedades físicas dos polímeros (STEINBÜCHEL & SCHLEGEL, 1991), e classificando os PHAs conforme apresentado na Tabela 2.2.

Segundo Rodrigues (2005), essa classificação pode ser feita a partir do número de átomos de carbono presentes na cadeia do monômero, ou de acordo com a composição de monômeros na cadeia. Em se tratando do número de carbono, os PHAs podem ser classificados em cadeia curta (3 a 5 átomos de carbono), cadeia média (6 a 14 átomos de carbono) ou cadeia longa (mais de 14

átomos de carbono). De acordo com a composição dos monômeros na cadeia, são classificados em homopolímeros (um tipo de monômero) ou copolímeros (dois ou mais tipos de carbono) (RODRIGUES, 2005).

Tabela 2.2 – Estrutura geral dos PHAs

Estrutura Geral	
Radical – R	Classificação
Hidrogênio	Poli(3-hidroxiopropionato)
Metil	Poli(3-hidroxiobutirato)
Etil	Poli(3-hidroxi valerato)
Propil	Poli(3-hidroxi hexanoato)
Pentil	Poli(3-hidroxi octanoato)
Nonil	Poli(3-hidroxi dodecanoato)

Fonte: Adaptado de Rodrigues (2005)

Além da função de reserva de carbono e energia, os PHAs podem apresentar outras funções, tais como agir como retardantes na degradação de componentes celulares, como ácidos nucleicos e proteínas, durante a escassez de carbono (ANDERSON & DAWES, 1990).

2.3.2 Poli(3-hidroxiobutirato) – PHB

O PHB é um homopolímero alifático, que apresenta repetidas unidades do ácido 3-hidroxiobutírico, sendo o PHA mais comumente produzido por microrganismos na natureza (RODRIGUES, 2005). Além disso, corresponde ao PHA melhor caracterizado atualmente (MADIGAN *et al.*, 2000).

Este biopolímero tem recebido bastante atenção devido ao fato de ser um termoplástico com boas propriedades mecânicas, similares ao polipropileno, com a vantagem de apresentar maior resistência aos raios ultravioleta e excelente impermeabilidade ao oxigênio (HOLMES, 1985). Por outro lado, sua aplicação industrial é limitada pelo fato de ser bastante quebradiço, devido ao seu alto grau de cristalinidade e morfologia esferolítica, além do que sua temperatura de fusão (180°C) está próxima da sua temperatura de degradação térmica (200°C) (KIM & LENZ, 2001; LEE, 1996).

A obtenção de PHB envolve rotas metabólicas complexas, sendo elas altamente influenciadas pelas condições da cultura e composição do meio (LUENGO *et al.*, 2003; STEINBÜCHEL, 2001). Sua produção permite um processo cíclico por meio de fontes renováveis, degradando-se a CO₂ e água por um grande número de bactérias (FIORESE, 2008). Dentre elas, a *Ralstonia eutropha*, atualmente conhecida como *Cupriavidus necator*, tem sido o microrganismo mais utilizado (KHANNA & SRIVASTAVA, 2006).

2.3.3 *Cupriavidus necator*

Consiste em um microrganismo procariótico e Gram-negativo, naturalmente encontrado no solo e na água, que possui células na forma de bastonete com dimensões de 0,5 por 1,8 a 2,6 µm. É móvel, possuindo de 1 a 4 flagelos peritriquiais e suas células podem se tornar esféricas durante a fase de acúmulo de polímero (BRAUNEGG *et al.*, 1998). A evolução do crescimento e de acúmulo de PHB ao longo de 24 horas de cultivo pode ser observada pela Figura 2.1, mostrando o desaparecimento dos elementos de mediação escuro-manchados, dando espaço aos grânulos intracelulares de PHB. O tamanho final da célula após 24h de cultivo é de 0,5µm (TIAN, 2005).

Sua ampla utilização deve-se à sua habilidade de acumular grandes quantidades de PHB a partir de fontes simples de carbono, como ácido acético, frutose e glicose (RODRIGUES, 2005), sendo a última a principal fonte de carbono para a produção industrial de PHB.

As células de *Cupriavidus necator* são cultivadas em meio contendo sais e glicose, com quantidades calculadas de fosfato ou nitrogênio para produzir determinada quantidade de biomassa (KIM *et al.*, 1994).

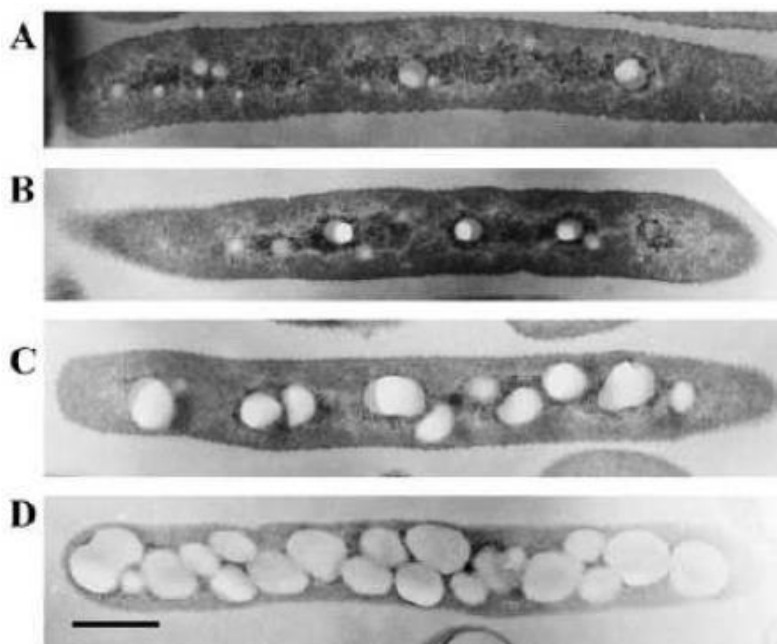


Figura 2.1 – Imagens microscópicas de elétron de transmissão (TEM) de *C. necator* na produção de PHB: (A) 2,5h; (B) 5h; (C) 9h;(D) 24h (TIAN, 2005)

Segundo Tanaka *et al.* (1995), a temperatura ótima de crescimento deste microrganismo é de 30 °C, sendo que ele pode crescer autotroficamente em atmosfera de gases contendo H₂, O₂ e CO₂. Quanto ao pH, seu ponto ótimo está em torno de 6,9, ao passo que a inibição do crescimento ocorre em pH 5,4 (REPASKE, 1962).

O acúmulo de PHA em *C. necator* ocorre em duas etapas: na primeira, procura-se promover condições para o maior crescimento possível de células, com uma mínima produção do polímero; já na segunda etapa, o crescimento celular é interrompido e são fornecidas condições para o maior acúmulo possível de polímero no interior da célula (DOI *et al.*, 1992). Nessa etapa é fornecido carbono em excesso e a concentração de algum nutriente torna-se limitada.

Devido ao elevado rendimento e velocidade de produção, o *C. necator* pode acumular até 80% de sua massa seca em polímero com alta massa molecular (BYROM, 1987). Porém, a capacidade máxima de armazenamento do PHA e a taxa de produção dependem do substrato utilizado e das estratégias de síntese (FORMOLO *et al.*, 2003).

2.4 Modelagem do Processo de Produção de Biopolímeros

A modelagem matemática do crescimento microbiano tem sido utilizada para estimar parâmetros necessários para o estudo do crescimento de microrganismos sob diferentes condições físicas e químicas, formular apropriados meios microbiológicos ou construir modelos preditivos para uso em microbiologia de alimentos (LÓPEZ *et al.*, 2004).

A produção de PHB por microrganismos é altamente influenciada pelas condições de cultivo e pela composição do meio de cultura, envolvendo complexas vias metabólicas (STEINBÜCHEL, 2001; LUENGO *et al.*, 2003). Assim, a disponibilidade de modelos adequados para representar este processo torna-se um requisito fundamental para determinar as condições que permitam maximizar a quantidade de polímero produzido (FACCIN, 2012).

Nos últimos anos, diversos trabalhos foram publicados na área de modelagem de produção do biopolímero PHB, em diferentes condições, e basicamente a partir do cultivo de *C. necator*, além de espécies *Alcaligenes*. Nesses estudos, os perfis de consumo de fonte de carbono e de fonte de nitrogênio, além dos perfis de crescimento do microorganismo e produção do polímero são, em geral, bastante característicos conforme as Figura 2.2 a Figura 2.5.

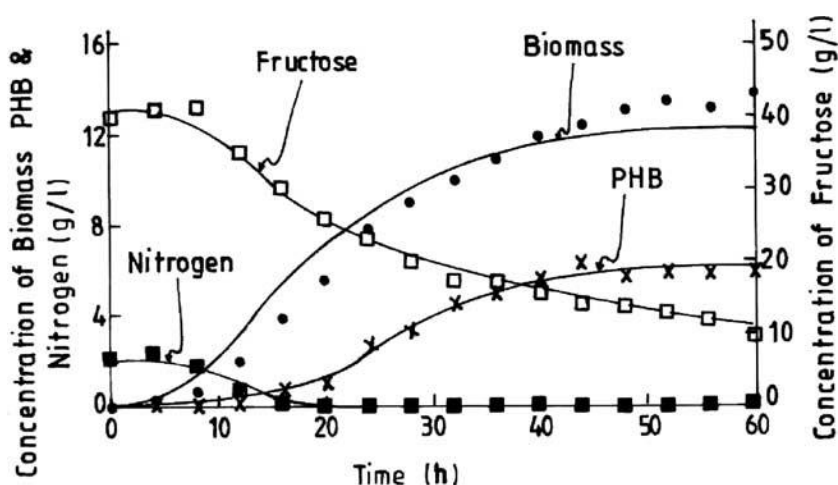


Figura 2.2 – Dados experimentais e modelagem da cinética de fermentação de *R. eutropha* em biorreator descontínuo

Fonte: Patwardhan & Srivastava (2004)

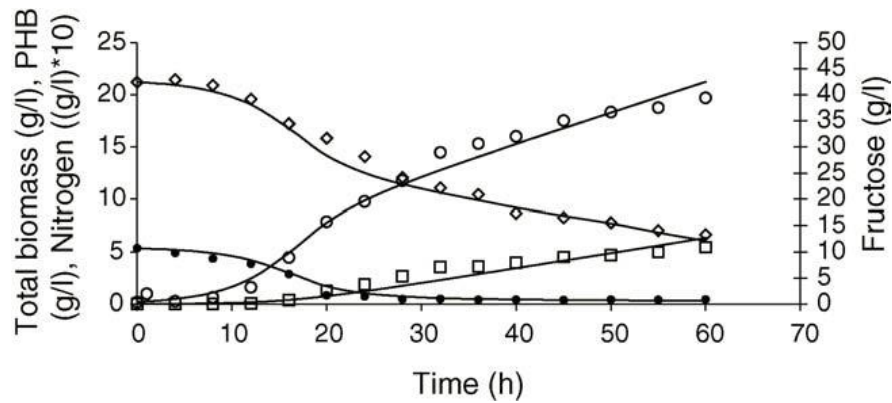


Figura 2.3 – Dados experimentais e modelagem da cinética de fermentação de *R. eutropha* em biorreator descontínuo: (◇)frutose; (□) PHB; (O) biomassa; (●) nitrogênio

Fonte: Khanna & Srivastava (2006)

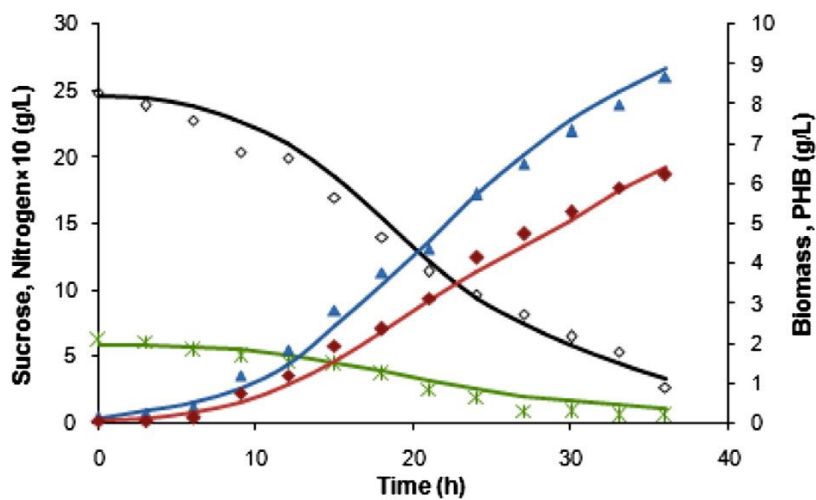


Figura 2.4 – Dados experimentais e modelagem da cinética de fermentação de *A. australica* em biorreator descontínuo: (◇) sacarose; (●) PHB; (▲) biomassa; (×) nitrogênio

Fonte: Gahlawat & Srivastava (2013)

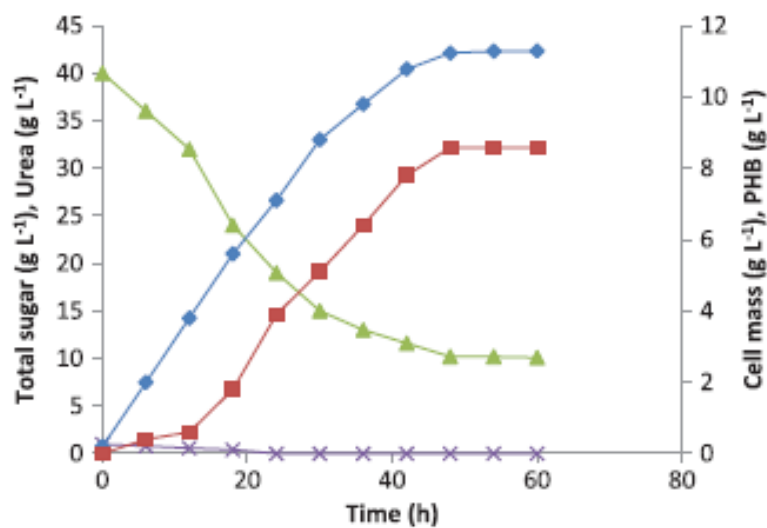


Figura 2.5 – Dados experimentais e modelagem da cinética de fermentação de *Alcaligenes sp.* em biorreator descontínuo: (▲) açúcares totais; (■) PHB; (●) biomassa; (×) uréia

Fonte: Tripathi *et al.* (2013)

Do ponto de vista da análise dos sistemas, a formulação de um modelo matemático de processos fermentativos é usualmente realizada em três estágios principais (VOLESKI & VOTRUBA, 1992):

1. Análise qualitativa da estrutura do sistema, usualmente baseada no conhecimento das vias metabólicas e da “biogênese” do produto desejado;
2. Formulação do modelo em uma forma matemática geral; estágio chamado de síntese da estrutura operacional do processo.
3. Identificação e determinação dos valores das constantes do modelo e/ou parâmetros que são baseados em experimentos ou dados de outras operações de um processo real.

Um dos primeiros trabalhos que se tem relato sobre a modelagem de bioprocessos está baseado na cinética de Monod (1949), conforme Equação 2.1. Esse modelo admite que existe um substrato limitante do meio reacional, não havendo efeitos inibitórios ao crescimento celular.

$$\mu_{Xr} = \frac{\mu_{max} S}{S + K_S} \quad (2.1)$$

Esta é uma equação derivada da cinética de Michaelis-Menten, desenvolvida para cinética enzimática, e tem sido amplamente utilizada para explicar a relação entre a concentração S do substrato limitante no meio, com a velocidade específica de crescimento de microrganismo (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Sonnleitner *et al.* (1979) avaliaram a produção de ácido poli-3-hidroxi-butírico (PHB) por *Alcaligenes eutrophus* H16 e *Mycroplana rubra* R14. Para tanto, os autores aplicaram um conjunto simples de equações aos dados experimentais da cinética de fermentação, a fim de avaliar a inibição por substrato a partir de íons amônio. Para encontrar o melhor ajuste, os autores utilizaram o método dos mínimos quadrados. Uma das maneiras de ajuste foi calcular uma única função de regressão para cada fase da fermentação, conforme Equações 2.2 a 2.4, e outra foi utilizar segmentos de parábola com uma região de validade limitada para ajustar a fermentação completa.

$$\ln c_i = k_1 + k_2 t \quad (2.2)$$

$$c_i = k_3 + k_4 t^{\frac{1}{2}} + k_4 t \quad (2.3)$$

$$c_i = k_5 + k_6 t + k_7 t^2 \quad (2.4)$$

As Equações 2.2, 2.3 e 2.4 representam respectivamente a fase de crescimento, a fase de estocagem do produto, e o ajuste gradual, onde c_i corresponde a concentração do componente i em função do tempo de fermentação. As equações das taxas de formação de biomassa (μ_{X_T}), de formação de PHB (μ_P), e de formação de células (μ_{X_r}) foram descritas pelas Equações 2.5 a 2.7.

A partir deste trabalho, os autores mostraram que a síntese de PHB está completamente associada ao crescimento de células, mesmo quando não há limitação pelo substrato.

$$\mu_{X_T} = \frac{d \ln(X_T)}{dt} = \frac{d(X_T)}{dt} \frac{1}{X_T} \quad (2.5)$$

$$\mu_P = \frac{d \ln(P)}{dt} = \frac{d(P)}{dt} \frac{1}{P} \quad (2.6)$$

$$\mu_{X_r} = \frac{d \ln(X_r)}{dt} = \frac{d(X_r)}{dt} \frac{1}{X_r} \quad (2.7)$$

Heinzle e Lafferty (1980) utilizaram um modelo semi-empírico baseado em uma descrição mecanística simples, para descrever a produção de ácido poli-hidroxi-butírico por *Alcaligenes eutrophus* cepa H16. Os dados experimentais foram ajustados pelo método dos mínimos quadrados, utilizando-se funções simples com até 4 parâmetros (funções polinomiais e funções contendo partes logarítmicas e exponenciais). O sistema de equações diferenciais de primeira ordem foi resolvido utilizando-se Runge-Kutta com um computador Univac 1100. Após, a Equação 2.8 foi proposta para descrever a taxa de crescimento celular. Os resultados dos parâmetros obtidos pelos autores são dados na Tabela 2.3.

$$\mu_{x_r} = \mu_{\max C} \frac{S}{K_{S_C} + S} + \mu_{\max N} \frac{(S/K_{S_N})^n}{1 + (S/K_{S_N})^n} \quad (2.8)$$

Tabela 2.3 – Parâmetros encontrados por Heinzle e Lafferty (1980)

Parâmetro	Valor	Dimensão
$Y_{R/S}$	1,5	-
$\mu_{m,1}$	0,13	h^{-1}
$K_{S/1}$	0,1	g/L
$\mu_{m,2}$	0,08	h^{-1}
$K_{S/2}$	1,0	g/L
n	5	-
$Y_{P/R}$	0,105 - 0,16	-
K_1	0,036 - 0,047	g/L
k_1	0,045 - 0,048	h^{-1}
k_2	0,18 - 0,176	h^{-1}

Mulchandani *et al.* (1989) apresentaram outras expressões para descreverem o efeito inibitório do substrato no crescimento de *Alcaligenes eutrophus*. Neste trabalho, foram estudados dois modelos conhecidos para inibição por substrato: o modelo de Andrews (1968) e o modelo de Luong (1987), respectivamente dados pelas Equações 2.9 e 2.10. Além disso, os autores propuseram o modelo apresentado pela Equação 2.11, posteriormente utilizada por outros autores, como Shahhosseini (2004) e Patnaik (2006a), em que S_r representa a razão entre as fontes de nitrogênio e carbono.

$$\mu_{x_r} = \mu_{max} \left(\frac{S_N}{S_N + K_{S_N} + \frac{S_N^2}{K_{i_N}}} \right) \left(\frac{S_C}{S_C + K_{S_C} + \frac{S_C^2}{K_{i_C}}} \right) \quad (2.9)$$

$$\mu_{x_r} = \mu_m \frac{S_r}{S_r + K_{S_r}} \left[1 - \frac{S_r}{S_m} \right]^m \quad (2.10)$$

$$\mu_{x_r} = \mu_m \frac{S_r}{S_r + K_{S_r}} \left[1 - \left(\frac{S_r}{S_m} \right)^m \right] \quad (2.11)$$

As equações foram ajustadas aos dados experimentais utilizando-se uma técnica de regressão não-linear e utilizando o método dos mínimos quadrados, cujos parâmetros estimados são apresentados nas Tabela 2.4 e Tabela 2.5.

Tabela 2.4 – Parâmetros cinéticos estimados por Mulchandani *et al.* (1989)

Modelo	μ_m (h ⁻¹)	K_s (g L ⁻¹)	K_i (g L ⁻¹)	S_m	m
Andrews	1,48	0,41	0.02	-	-
Luong	1,08	0,31	-	0,33	1,37
Mulchandani	0,72	0,15	-	0,3	1,22

Tabela 2.5 – Parâmetros estequiométricos estimados por Mulchandani *et al.* (1989)

Parâmetro	Valor	Unidade
$Y_{SC/Xr}$	2,875	$g_{sc} g_X^{-1}$
$Y_{SN/Xr}$	0,685	$g_{sc} g_X^{-1}$
$Y_{P/Xr}$	0,106	$g_P g_X^{-1}$
$Y_{SC/P}$	27,12	$g_{sc} g_P^{-1}$
m_{sc}	1,60	$g_{sc} g_X^{-1} h^{-1}$
m_P	0,059	$g_P g_X^{-1} h^{-1}$

Raje e Srivastava (1998) propuseram um modelo para avaliar os efeitos de inibição e limitação da taxa nitrogênio/carbono no crescimento de *Alcaligenes eutrophus*, conforme a taxa de crescimento específico (μ_{Xr}), apresenrada pela Equação 2.12.

$$\mu_{Xr} = \left(\mu_{m1} \frac{S_N}{(K_{S1} + S_N)} + \mu_{m2} \frac{(S_N/K_{S2})^n}{1 + (S_N/K_{S2})^n} \right) \left(1 - \frac{\left(\frac{S_N}{S_C}\right)^m}{(S_m)^m} \right) \quad (2.12)$$

Para estimar o valor ótimo dos parâmetros, foi utilizada uma técnica de regressão não-linear, com auxílio de um programa computacional (VOTRUBA, 1982; VOLESKI & VOTRUBA, 1992) onde o sistema de equações diferenciais foi solucionado pelo método de Runge Kutta de 4ª ordem.

A Tabela 2.6 mostra os valores encontrados para $\mu_{\text{máx}}$ em diferentes taxas nitrogênio/carbono (S_N/S_C), onde nota-se que o maior crescimento celular ocorreu a uma razão de 0,09 entre nitrogênio e carbono.

Tabela 2.6 – Valores de $\mu_{\text{máx}}$ em função de S_N/S_C estimados por Raje e Srivastava (1998)

Taxa S_N/S_C	$\mu_{\text{máx}}$
0,037	0,08
0,048	0,1
0,063	0,127
0,075	0,135
0,082	0,152
0,090	0,17
0,12	0,156
0,138	0,136
0,212	0,1
0,4	0,042

Tohyama *et al.*, (2002) estudaram a produção de PHB em uma cultura mista, composta por *Lactobacillus delbrueckii* e *Ralstonia eutropha*, onde os metabólitos produzidos por um microrganismo são assimilados pelo outro. Neste âmbito, μ_1 , demonstrado na Equação 2.13, representa o crescimento específico de *Lactobacillus delbrueckii*, e μ_2 , demonstrado na Equação 2.14, representa o crescimento específico de *Ralstonia eutropha*. Os valores dos parâmetros estimados são apresentados na Tabela 2.7.

$$\mu_{x_r} = \frac{\mu_{m1} C_{ox} S_C}{K_{SC} + S_C} \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)^n \quad (2.13)$$

$$\mu_{x_r} = \left(\frac{\mu_{m2} C_{ox} P}{K_{SP} + P + P^2/K_{iP}}\right) \left(\frac{S_N}{K_{SN} + S_N}\right)^n \quad (2.14)$$

Observa-se que apesar de o crescimento celular ser inibido por altas concentrações de nitrogênio, este termo não foi considerado nas equações do crescimento específico.

Tabela 2.7 – Parâmetros cinéticos estimados por Tohyama *et al.* (2002)

Parâmetro	Valor	Unidade
μ_{m1}	0,375	h^{-1}
μ_{m2}	0,734	h^{-1}
K_{iP}	2,50	g/L
K_{SN}	0,050	g/L
K_{SP}	6,00	g/L
K_{SC}	35,8	g/L
n	1,00	-
P_m	42,9	g/L

Ross *et al.* (2003) desenvolveram um novo modelo que combina os efeitos de temperatura, atividade da água, pH e concentração de ácido láctico no crescimento de *Escherichia coli*, o qual engloba e expande os resultados e modelos de Presser *et al.* (1997) e Salter *et al.* (1998). A expressão desenvolvida para a taxa de crescimento específico (μ_{xr}) é descrita pela Equação 2.15, onde U representa a concentração de ácido láctico não dissociado.

$$\sqrt{\mu_{xr}} = c(T - T_{min})(1 - \exp(d(T - T_{max})))\sqrt{(a_w - a_{wmin})} \sqrt{(1 - \exp(g(a_w - a_{wmax})))} \sqrt{(1 - 10^{(pH_{min}-pH)})} \sqrt{(1 - 10^{(pH-pH_{max})})} \sqrt{\left(1 - \frac{S_c}{U_{min}(1 + 10^{(pH-pKa)})}\right)} \sqrt{1 - \frac{S_c}{U_{min}(1 + 10^{(pKa-pH)})}} \quad (2.15)$$

As equações foram ajustadas aos valores experimentais pelo método SAS *nonlinear regression procedure* PROC NLIN (SAS Institute, Cary, NC), cujos valores dos parâmetros estimados são apresentados na Tabela 2.8.

Tabela 2.8 – Parâmetros estimados por Ross *et al.* (2003)

Parâmetro	Estimativa	Erro Padrão assintótico
C	0,2345	0,0083
T _{min}	4,14	0,63
T _{max}	49,55	0,42
pH _{min}	3,909	0,031
pH _{max}	8,860	0,19
U _{min}	10,43	0,52
D _{min}	995,5	106
a _{wmin}	0,9508	0,0004
D	0,2636	0,038
Erro Médio Quadrático (χ^2)	0,0054	

Shahhosseini (2004) utilizou o modelo matemático de Mulchandani *et al.* (1989) para descrever o processo de produção de PHB por *Cupriavidus necator* em batelada alimentada. Utilizando-se uma técnica de regressão não-linear, os autores estimaram os parâmetros cinéticos do modelo, conforme resultados apresentados na Tabela 2.9.

Tabela 2.9 – Parâmetros encontrados por Shahhosseini (2004)

Parâmetro	μ_{\max} (h ⁻¹)	K _{sr}	S _m	N	σ^2
Mulchandani	0,72	0,15	0,3	1,22	0,001
Shahhosseini	0,78	0,29	0,3	1,24	0,007

Patwardhan e Srivastava (2004) estudaram um modelo que leva em consideração a limitação do nutriente tanto no termo de Monod (1949) quanto no termo sigmoidal, e além disso, incorporou a inibição devido à taxa nitrogênio/carbono proposta por Mulchandani *et al.* (1989). Assim, a expressão para a taxa de crescimento específico é dada pela Equação 2.16.

$$\mu_{x_r} = \left[\mu_{maxN} \left(\frac{S_N}{K_{S_N} + S_N} \right) + \mu_{maxC} \left(\frac{(S_N/K_{S_C})^n}{1 + (S_N/K_{S_C})^n} \right) \right] \left[1 - \left(\frac{S_N/S_C}{S_m} \right)^m \right] \quad (2.16)$$

Uma técnica de regressão não-linear assistida de um programa computacional foi utilizada para a otimização dos parâmetros do modelo, cujos resultados são apresentados na Tabela 2.10. O sistema de equações diferenciais foi resolvido utilizando-se um programa de integração baseado no método de Runge-Kutta de 4ª ordem. O modelo proposto representou os dados experimentais de forma satisfatória e a sua aplicabilidade foi demonstrada pela simulação computacional e estratégias para o aumento de produção e acúmulo de PHB na população celular.

Tabela 2.10 – Parâmetros cinéticos estimados por Patwardhan e Srivastava (2004)

Parâmetro	Valor	Unidade
μ_{maxN}	0,2920	h^{-1}
K_{SN}	0,7490	g/L
μ_{maxC}	0,5780	h^{-1}
K_{SC}	5,5500	g/L
n	2,0700	-
S_m	3,1400	gnitrogênio/gcarbono
m	3,1130	-

Khanna e Srivastava (2006) estudaram a diferença entre a alimentação contínua e alternada de carbono e nitrogênio na obtenção de PHB por *Ralstonia eutropha*. O modelo proposto leva em consideração a inibição pelo substrato e o termo de inibição baseado no modelo de Luong (1987). A proposta final para o crescimento específico é dado pela Equação 2.17. Os parâmetros cinéticos estimados pelos autores são apresentados na Tabela 2.11. A partir dos dados encontrados os autores verificaram que a produtividade de PHB é maior quando utilizada a alimentação alternada, sendo que o modelo aplicado representou bem os dados experimentais.

$$\mu_{x_r} = \mu_{max} \left[\frac{S_N^{n_1}}{S_N^{n_1} + K_{SN}^{n_1}} \right] \left[\frac{S_C^{n_2}}{S_C^{n_2} + K_{SC}^{n_2}} \right] \left[1 - \left(\frac{S_N}{S_{mN}} \right)^{n_3} \right] \left[1 - \left(\frac{S_C}{S_{mC}} \right)^{n_4} \right] \quad (2.17)$$

Tabela 2.11 – Valores dos parâmetros encontrados por Khanna e Srivastava (2006)

Parâmetro	Valor	Unidade
μ_{max}	0,303	h^{-1}
K_{SN}	22,836	g/L
n_1	3,5938	-
K_{SC}	0,234	g/L
n_2	2,213	-
S_{mN}	90,11	g/L
S_{mC}	10,11	g/L
n_3	3,19	-
n_4	0,97	-

Patnaik (2006a) incorporou o modelo de Mulchandani *et al.* (1989) para a síntese de PHB por *Ralstonia eutropha* com um modelo de dispersão para simular um biorreator de batelada alimentada. Os parâmetros cinéticos (μ_{max} , S_m e K_{Sr}) foram obtidos de Shahhosseini (2004), e os parâmetros estequiométricos foram estimados pelos autores, conforme os resultados apresentados na Tabela 2.12.

Patnaik (2006b) utilizou redes neurais para aumentar a produtividade de PHB por *Ralstonia eutropha*, sendo feitas duas considerações: i) o PHB inibe o crescimento celular quando em altas concentrações; ii) células viáveis podem produzir PHB sem amônio. Essas hipóteses resultaram na taxa de crescimento específico dado pela Equação 2.18.

$$\mu_{x_r} = \mu_{max} \left[\frac{S_C}{K_{SC} + S_C + S_C^2/K_{iC}} \right] \left[\frac{S_N}{K_{SN} + S_N + S_N^2/K_{iC}} \right] \quad (2.18)$$

Neste trabalho não foram descritos a forma de otimização ou os valores dos parâmetros encontrados.

Tabela 2.12 – Valores dos parâmetros encontrados por Patnaik (2006a)

Parâmetro	Valor	Unidade
$K_{Sr}^{(a)}$	0,29	$g L^{-1}$
$S_m^{(a)}$	0,30	$g L^{-1}$
$\mu_{max}^{(a)}$	0,78	h^{-1}
$Y_{P/Xr}$	0,2604	$gp gx^{-1}$
$Y_{SN/Xr}$	0,6511	$g_{SN} gx^{-1}$
$Y_{SC/Xr}$	4,5030	$g_{SC} gx^{-1}$
m_P	0,0301	$gp gx^{-1} h^{-1}$
m_{SC}	0,0001	$g_{SC} gx^{-1} h^{-1}$

(a) Valores obtidos de Shahhosseini (2004).

Wang *et al.* (2007) propuseram um modelo para descrever o crescimento de *Ralstonia eutropha*, que leva em consideração a razão entre a concentração inicial do substrato e a concentração inicial da biomassa. O modelo não admite a inibição do crescimento celular pelo substrato, como o crescimento específico é apresentado na Equação 2.19.

$$\mu_{X_r} = \mu_{max} \frac{S_0/X_0}{K_{S/X} + S_0/X_0} \quad (2.19)$$

Considerou-se como caso 1 as bateladas iniciadas com X_0 constante e variando-se S_0 , a expressão torna-se o modelo de Monod (1949), conforme a Equação 2.20. Já para o caso 2, as bateladas foram iniciadas com S_0 constante e variando-se X_0 , a Equação 2.19 torna-se a Equação 2.21, sendo $K_X = K_{S/X}/S_0$.

Para ambos os casos avaliados, os parâmetros cinéticos estimados pelos autores são apresentados na Tabela 2.13.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S_0}{K_S + S_0} \quad (2.20)$$

$$\mu = \mu_{max} \frac{1}{K_X X_0 + 1} \quad (2.21)$$

Tabela 2.13 – Parâmetros cinéticos estimados por Wang *et al.* (2007)

Parâmetro	μ_m (h ⁻¹)	$K_{s/x}$ (g/g)	K_s (g/L)	K_x (L/g)
Caso 1	0,21	2,67	1,60	-
Caso 2	0,18	5,09	2,88	2,04

O modelo proposto foi eficaz na descrição dos dados experimentais em diferentes taxas S_0/X_0 , e foi verificado que um aumento nesta taxa provocou também o aumento no acúmulo de PHB nas células.

Gahlawat e Srivastava (2013) modelaram os dados de crescimento e produção de PHB por *Azohydromonas australica*, por meio de um método que não apenas descreve adequadamente os dados observados de cinética de crescimento, mas também esclarece a limitação e inibição pelo substrato sob diferentes condições nutricionais. Assim, para o desenvolvimento do modelo matemático, foram feitas as seguintes considerações: (1) Sacarose e nitrogênio são os únicos substratos limitantes que afetam o crescimento e a produção de PHB; (2) não houve limitação por fósforo ou outros componentes do meio, que se encontravam em excesso; (3) as condições temperatura (33°C) e pH (7,0) da cultura mantiveram-se constantes durante a fermentação.

Sob essas hipóteses, os autores propuseram descrever a taxa de crescimento específico conforme a Equação 2.22.

$$\mu_{X_r} = \mu_{max} \left(\frac{S_C}{S_C + K_{S_C}} \right) \left(\frac{S_N^{n1}}{S_N^{n1} + K_{S_N}^{n1}} \right) \left(\frac{K_1}{K_1 + S_C} \right) \left[1 - \left(\frac{S_N}{S_m} \right)^m \right] \quad (2.22)$$

A partir da Equação 2.22 pode-se perceber que a limitação por substrato carbono (S_C) foi relacionada a partir de Monod (1949) e a limitação por substrato nitrogênio (S_N) por cinética Sigmoidal. Os dois últimos termos referem-se a relações empíricas, sendo uma dada por Ierusalimsky (1967), que sugere inibição pelo substrato carbono, e outra proposta por Luong (1985), que sugere inibição pelo substrato nitrogênio, respectivamente.

O sistema de equações diferenciais foi resolvida utilizando-se o método de Runge-Kutta de 4ª ordem, e uma técnica de regressão para a otimização dos

parâmetros foi utilizada uma técnica de regressão não linear (BARD, 1974; VOLESKI & VOTRUBA, 1992), cujos valores são apresentados na Tabela 2.14.

Tabela 2.14 – Parâmetros estimados por Gahlawat e Srivastava (2013)

Parâmetro	Valor	Unidade
μ_{\max}	0,410	h^{-1}
K_{SC}	9,210	$g L^{-1}$
K_{SN}	0,350	$g L^{-1}$
$Y_{(X+P)/SC}$	0,243	$g g_c^{-1}$
m_{SC}	0,058	$g_c g_x^{-1} h^{-1}$
$Y_{X/SN}$	2,222	$g_x g_{SN}^{-1}$
m_{SN}	0,003	$g_{SN} g_x^{-1} h^{-1}$
K_1	90,0	$g L^{-1}$
S_m	13,0	$g L^{-1}$
m	1,102	-
n_1	1,260	-

Como pode ser visto, existem diversos trabalhos que consideram a modelagem fenomenológica da produção de PHB por diferentes microrganismos, incluindo a bactéria *Cupriavidus necator*. No entanto, a avaliação da qualidade dos ajustes normalmente se baseia apenas nos valores da função objetivo, que pode ter valores bastante subjetivos, dependendo de fatores difíceis de serem controlados. Assim, é interessante propor uma metodologia de avaliação que considere testes estatísticos e possam fornecer resultados confiáveis. Outro ponto importante e que não foi suficientemente discutido é a influência da transferência de oxigênio e respiração microbiana sobre o processo.

CAPÍTULO III – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Modelagem de processos biotecnológicos

Na etapa de modelagem matemática de processos, independente da área de atuação (química, biologia, físico-química, bioquímica, engenharia, psicologia, economia etc.) busca-se a proposição de um conjunto de relações entre as variáveis, capaz de representar cada caso particular de forma adequada, dentro da precisão requerida (MENDES *et al.*, 2011).

Este conjunto de relações é chamado de modelo e, no caso específico da modelagem matemática de processos químicos e bioquímicos, constitui-se por equações algébrico-diferenciais, representando o princípio de conservação por balanços de massa e, as relações cinéticas ou de equilíbrio pelas leis de velocidade de reações e leis de equilíbrio do sistema.

A exigência básica para se avaliar o comportamento dinâmico de um processo químico ou bioquímico é a disponibilidade de um modelo matemático que descreva como as variáveis dependentes do processo variam com a variável de projeto tempo. Assim, dado um conjunto de dados de entrada, um modelo pode ser utilizado para prever a saída (variáveis resposta) de um processo.

O desenvolvimento da modelagem matemática de processos fermentativos permite: (i) organizar informações desconexas a respeito dos fenômenos biológicos num conjunto coerente; (ii) inferir a respeito de quais componentes são importantes num sistema complexo e determinar interações fundamentais; (iii) descobrir novas estratégias para explicar o comportamento das células submetidas a determinados ambientes; (iv) corrigir falhas eventualmente existentes no entendimento convencional de determinados fenômenos e, finalmente, (v) entender as características qualitativamente essenciais de determinados processos (SCHIMIDELL *et al.*, 2001).

Gordillo (1996) defende que a formulação do modelo juntamente com a sua simulação, reúne vantagens na hora de conhecer e melhorar o processo, permitindo projetar estratégias de operação e controle do processo.

Assim, a modelagem matemática/simulação do processo permite entender o comportamento do sistema, já que abrange as evoluções que seguem as diferentes variáveis, de modo a ajudar na formulação de um modelo adequado para descrever os dados experimentais. Além disso, a exploração do modelo mediante sua simulação possibilita um planejamento experimental com maior precisão, já que se pode obter uma visão de quais variáveis afetam o processo e, portanto, estabelecer critérios para atingir os objetivos propostos. Nesse sentido, a predição da evolução do processo permite detectar em que momento a operação sofrerá alterações, possibilitando a tomada de decisões a tempo de corrigir e dirigir o processo para a produção ótima.

A Figura 3.1 apresenta uma síntese das etapas envolvidas na elaboração de um modelo matemático capaz de prever as variáveis de saída em função das variáveis de entrada para um processo fermentativo.

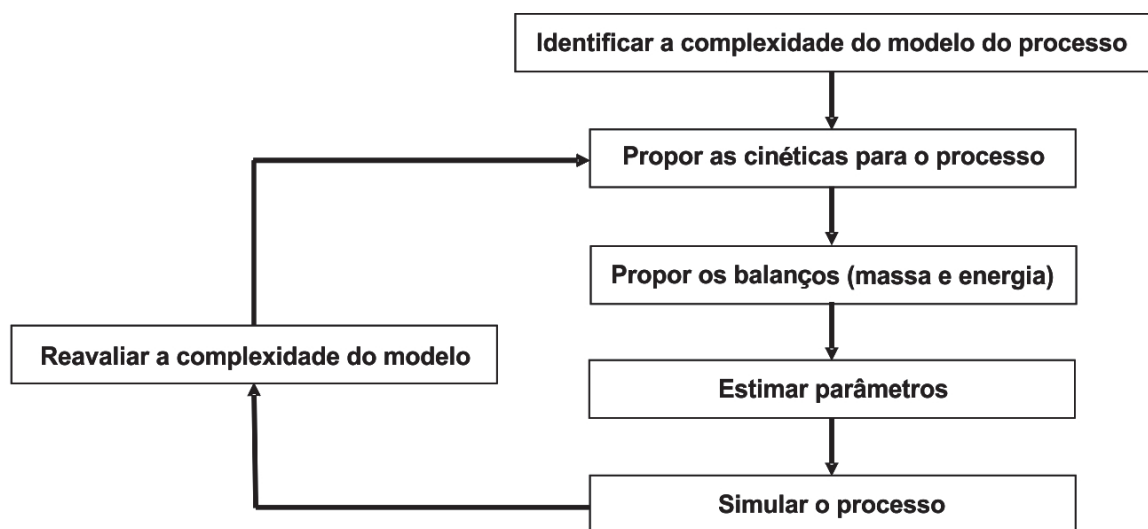


Figura 3.1 Etapas para modelagem matemática de processos fermentativos
Fonte: Adaptado de Nielsen (2003)

Portanto, se as simulações empregando o modelo proposto são consideradas satisfatórias dentro do limite de erro estabelecido, o modelo é aceitável. Caso contrário, se o ajuste não é significativo dentro do nível de significância estatística selecionado, mesmo para o conjunto de parâmetros estimado que propicia o melhor ajuste, torna-se necessário revisar o modelo cinético e passar através do ciclo de modelagem novamente (NIELSEN, 2003).

3.2 Modelos cinéticos de crescimento microbiano

3.2.1 Classificação dos modelos cinéticos

Os modelos matemáticos de processos fermentativos podem ser divididos, inicialmente, em dois grupos, os modelos fenomenológicos e os modelos entrada-saída (SCHMIDELL *et al.*, 2001), conforme segue:

3.2.1.1 Modelos Fenomenológicos

Estes modelos baseiam-se na formulação de hipóteses e correlações teóricas ou empíricas para explicar os fenômenos e o comportamento das variáveis do processo observados experimentalmente.

Na sua formulação, são normalmente utilizadas equações que podem ser classificadas em balanços de massa, equações de velocidade e relações termodinâmicas, constituindo-se por um conjunto de correlações matemáticas entre as variáveis de interesse do sistema em estudo.

Os modelos cinéticos de processos biotecnológicos, em geral, podem ser classificados, quanto ao número de componentes usados na representação celular, em modelos não-estruturados e modelos estruturados.

No caso dos modelos não-estruturados, o comportamento cinético do processo é avaliado admitindo-se que o material celular seja representado por uma única variável, não considerando assim, as alterações de componentes intracelulares. Esses modelos são geralmente simples e as descrições matemáticas são baseadas em observações da cinética do microrganismo.

Por outro lado, os modelos estruturados descrevem o estado das células com maiores detalhes, considerando as variações dos componentes intracelulares. Esse tipo de modelo em particular fornece uma melhor descrição das condições transientes em relação ao modelo não estruturado convencional.

Outro critério de discriminação ocorre quanto a heterogeneidade da população microbiana. Neste caso, os modelos são divididos em segregados e não segregados.

Em modelos segregados ou de parâmetros distribuídos, a biomassa é considerada segregada em unidades estruturais e funcionais, as células. Assim, a variável fundamental é o número de células, que são consideradas como unidades discretas e a população é considerada heterogênea. Quando se assume uma distribuição homogênea da biomassa por todo o sistema, tem-se o modelo não segregado ou de parâmetros concentrados. Nesse caso, a variável fundamental é a concentração celular, já que as células são representadas pela propriedade média da população.

3.2.1.2 Modelos Entrada-Saída

Estes modelos são representados por correlações que permitem calcular uma ou mais respostas do sistema (suas saídas), a partir de um número definido de variáveis de entrada medidas. O principal exemplo de modelos entrada-saída são as redes neurais.

3.2.2 Taxa de crescimento específico

A equação cinética para um substrato “*i*” descreve a influência de sua concentração e de outros compostos (inibidores ou ativadores) na taxa de crescimento específico μ_{x_i} . A taxa de crescimento específico pode ser afetada pela presença de inibidores no meio de cultura, como alguns substratos, intermediários e produtos formados.

A expressão para a taxa de crescimento específico é função do modelo cinético, além do microrganismo. Quando a biodegradação ocorre na presença de múltiplos substratos, essa relação pode ser apresentada por meio da forma aditiva (Equação 3.1) e da forma multiplicativa (Equação 3.2).

$$\mu_{Xr} = \sum_{i=1}^n \mu_{x_i} \quad (3.1)$$

$$\mu_{Xr} = \prod_{i=1}^n \mu_{x_i} \quad (3.2)$$

Dentre os modelos fenomenológicos não-estruturados tem-se o clássico modelo de MONOD (1949), a partir do qual surgiram diversos outros modelos capazes de descrever o consumo de substratos, formação dos produtos e crescimento da biomassa. As Tabela 3.1 e Tabela 3.2 apresentam alguns modelos não-estruturados para o crescimento celular em único substrato e múltiplos substratos, respectivamente.

3.2.3 Modelos para único substrato

3.2.3.1 Modelos de limitação pelo substrato

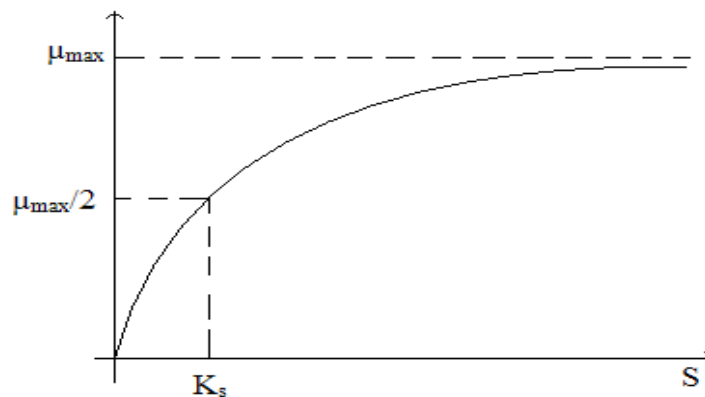
O trabalho fenomenológico mais importante sobre cinética de crescimento microbiano foi desenvolvido em 1949 por MONOD, cujo modelo aplica-se para a população microbiana e representa características cinéticas integrais da biomassa. Este fato é crucial para entender a fisiologia microbiana no nível da população e acelerou o desenvolvimento de outros modelos cinéticos, tais como Tessier (1942), Moser (1958) e Contois (1959) (BAILEY & OLLIS, 1986).

Monod (1949) admite que todos os componentes do meio de cultura, menos um, estão presentes em altas concentrações balanceadas, tal que mudanças nestas condições não afetam significativamente a taxa de crescimento celular. Assim, um único substrato torna-se limitante, e somente as variações na concentração deste componente causariam alterações no comportamento do meio de cultura. A partir dessa hipótese de limitação pelo substrato, variações no modelo de Monod (1949) foram apresentadas, conforme destaca-se na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Modelos de limitação pelo substrato

Modelo	Equação	Referencia
Limitação pelo substrato	$\mu_x = \frac{\mu_{max}S}{K_S + S}$	MONOD (1949)
	$\mu_x = \mu_{max}(1 - e^{-KS})$	TESSIER (1942)
	$\mu_x = \frac{\mu_{max}S^n}{K_S + S^n}$	MOSER (1958)
	$\mu_x = \frac{\mu_{max}S}{K_{SX}X + S}$	CONTOIS (1959)

A equação de Monod (1949), conforme a Tabela 3.1, relaciona a taxa de crescimento (μ_x) em função da concentração do substrato (S). A constante K_s , denominada constante de saturação, representa o valor da concentração de substrato S no qual a taxa de crescimento específico é igual a metade do seu valor máximo, conforme verifica-se pelo gráfico da Figura 3.2 – Representação gráfica do modelo de Monod, e indica especialmente a afinidade do microrganismo ao substrato. Um valor muito baixo de K_s implica velocidades específicas de crescimento bastante altas, o que resulta de uma grande afinidade entre o substrato e a biomassa.

**Figura 3.2 – Representação gráfica do modelo de Monod (1949)**

Fonte: SILVA, 2009

3.2.3.2 Modelos de inibição pelo substrato

Geralmente, devido ao acúmulo de metabólitos ao longo da reação, o crescimento celular fica prejudicado em determinadas concentrações de substrato. A expressão de Andrews (1968) é capaz de descrever sistemas reacionais nos quais a taxa de crescimento específico torna-se prejudicada, conforme verifica-se na Figura 3.3, na medida em que a concentração do substrato ultrapassa seu valor crítico. Esse fenômeno de inibição pela concentração do substrato já havia sido relatada em trabalhos anteriores (WEBB, 1963; YANO *et al.*, 1966), contribuindo para a proposição de outros modelos de inibição (AIBA *et al.*, 1968; YANO & KOGA, 1969; EDWARDS, 1970), os quais são apresentados na Tabela 3.2 – Modelos de inibição pelo substrato.

Tabela 3.2 – Modelos de inibição pelo substrato

Modelo	Equação	Referência
Inibição pelo substrato	$\mu_x = \frac{\mu_{max}S \left(1 + \frac{S}{K}\right)}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}}$	WEBB (1963)
	$\mu_x = \frac{\mu_{max}S}{\left(K_S + S + \frac{S^2}{K_i}\right) \left(1 + \frac{S}{K}\right)}$	YANO <i>et al.</i> (1966)
	$\mu_x = \frac{\mu_{max}S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}}$	ANDREWS (1968)
	$\mu_x = \frac{\mu_{max}S}{K_S + S} e^{\left(-\frac{S}{K_i}\right)}$	AIBA <i>et al.</i> (1968)
	$\mu_x = \frac{\mu_{max}S}{K_S + S + S \sum_{j=1}^p \left(\frac{S}{K_i}\right)^j}$	YANO & KOGA (1969)
	$\mu_x = \mu_{max} \left[e^{\left(-\frac{S}{K_i}\right)} - e^{\left(-\frac{S}{K_S}\right)} \right]$	EDWARDS (1970)

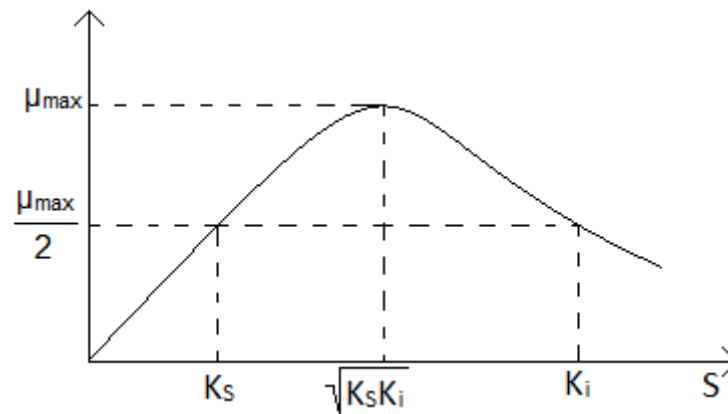


Figura 3.3 – Representação gráfica do modelo de Andrews 1968

Ressalta-se que em trabalhos posteriores, foram apresentados modelos capazes de descrever simultaneamente os fenômenos de limitação e inibição pelo substrato (WU *et al.*, 1988), os quais são relatados por Schmidell *et al.* (2001).

3.2.4 Modelos para múltiplos substratos

Os microrganismos crescidos em múltiplos substratos mostram preferência por muitos dos compostos presentes no meio, favorecendo suas biodegradações (PATNAIK, 2000) em detrimento da biodegradação dos compostos preteridos. Assim, a complexidade dos fenômenos envolvidos torna-se elevada à medida que indução e repressão enzimática vão ocorrendo ao longo das reações. Além disso, o fenômeno conhecido por repressão catabólica torna-se frequente em sistemas com múltiplos substratos, prejudicando a rota metabólica de interesse.

Esses comportamentos podem ser sugeridos pelos perfis de consumo dos substratos, que pode ocorrer simultânea ou sequencialmente, conforme os modelos propostos por Megee *et al.* (1972) e Tsao e Hanson (1975) que representam as limitações pelos substratos, e Dunn *et al.* (1992) que descreve as limitações e inibições pelos substratos, todos apresentados na Tabela 3.3 – Modelos de limitação e inibição pelos substratos.

Tendo origem na cinética de inibição enzimática de Michaelis-Menten, modelos mais versáteis foram propostos para descrever as inter-relações entre os múltiplos substratos (SEGEL, 1975; YOON *et al.*, 1977) em uma forma de qualificar

as inibições que ocorrem entre eles ao longo da reação, e também quantificar essas interações. Esses modelos estão apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.3 – Modelos de limitação e inibição pelos substratos

Modelo	Equação	Referência
Limitação por múltiplos substratos ^(a)	$\mu_x = \frac{\mu_{max}S_1S_2}{(K_{S_1} + S_1)(K_{S_2} + S_2)}$	MEGEE <i>et al.</i> (1972)
	$\mu_x = \left(\mu_0 + \frac{\mu_{max1}S_1}{(K_{S_1} + S_1)} + \frac{\mu_{max2}S_2}{(K_{S_2} + S_2)} \right) \left(\frac{S_3}{(K_{S_3} + S_3)} \right)$	TSAO & HANSON (1975)
Limitação e inibição por múltiplos substratos ^(b)	$\mu_x = \frac{\mu_{max1}S_1}{K_{S_1} + S_1} + \frac{\mu_{max2}S_2}{K_{S_2} + S_2 + \frac{S_2^2}{K_1}}$	DUNN <i>et al.</i> (1992)

(a) consumo simultâneo dos substratos; (b) consumo preferencial de S1

Tabela 3.4 – Modelos de inibição entre os substratos

Modelo	Equação	Referência
Inibição não competitiva	$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{max_i}S_i}{\left(K_{S_i} + S_i + S_j \left(\frac{K_{S_i}}{K_{S_j}} \right) + \frac{S_i S_j}{K_{S_j}} \right)}$	SEGEL (1975)
Inibição incompetitiva	$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{max_i}S_i}{\left(K_{S_i} + S_i + \frac{S_i S_j}{K_{S_j}} \right)}$	SEGEL (1975)
Inibição competitiva	$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{max_i}S_i}{\left(K_{S_i} + S_i + S_j \left(\frac{K_{S_i}}{K_{S_j}} \right) \right)}$	YOON <i>et al.</i> (1977)
SKIP	$\mu_{x_i} = \frac{\mu_{max_i}S_i}{(K_{S_i} + S_i + S_j I_{ji})}$	YOON <i>et al.</i> (1977)

3.3 Velocidades instantâneas de crescimento

As definições de velocidade instantânea estão descritas nas Equações 3.3 a 3.5, sendo respectivamente, velocidade instantânea de crescimento de microrganismo, consumo de substrato e formação de produto.

$$r_X = \frac{dX}{dt} \quad (3.3)$$

$$r_S = -\frac{dS}{dt} \quad (3.4)$$

$$r_P = \frac{dP}{dt} \quad (3.5)$$

Para a avaliação do desempenho de um processo fermentativo, é utilizada a definição de produtividade em biomassa, que representa a velocidade média de crescimento referente ao tempo total ou final de fermentação, conforme a Equação 3.6. Da mesma forma, a produtividade em produto pode ser determinada conforme a Equação 3.7.

$$P_X = \frac{X_m - X_0}{t_f} \quad (3.6)$$

$$P_P = \frac{P_m - P_0}{t_{fP}} \quad (3.7)$$

3.4 Velocidades específicas de transformação

Considerando que a concentração microbiana (X) aumenta durante um cultivo descontínuo, aumentando a transformação do substrato (S) no produto (P), é mais coerente utilizar os valores das velocidades instantâneas com relação à referida concentração microbiana, conforme seguem nas Equações 3.8 a 3.10, chamadas de velocidade específica de crescimento, consumo de substrato e formação de produto, respectivamente.

$$\mu_X = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (3.8)$$

$$\mu_S = \frac{1}{X} \left(-\frac{dS}{dt} \right) \quad (3.9)$$

$$\mu_P = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (3.10)$$

O cálculo das velocidades específicas de transformação é uma etapa crucial para uma boa formulação e ajuste de um modelo matemático de processos fermentativos, sendo sua importância fundamentada em dois aspectos (SCHMIDELL *et al.*, 2001):

- ✓ Formulação de relações cinéticas que, juntamente com os balanços de massa, são a base para a construção do modelo matemático;
- ✓ Obtenção de estimativas preliminares de alguns parâmetros por meio de simplificações ou linearizações, as quais servirão posteriormente como estimativa inicial de metodologias de estimação de parâmetros.

3.5 Fatores de conversão

Para relacionar os valores de X, S e P em um determinado tempo t, são utilizados os fatores de conversão, definidos pelas Equações 3.11 a 3.13.

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} = -\frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (3.11)$$

$$Y_{X/P} = \frac{X - X_0}{P - P_0} = \frac{\Delta X}{\Delta P} \quad (3.12)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} = -\frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (3.13)$$

3.6 Relação entre velocidades instantâneas e específicas

Considerando as Equações 3.3 a 3.5 e as Equações 3.8 a 3.10, tem-se as relações entre as velocidades instantâneas e específicas, que são apresentadas nas Equações 3.14 a 3.16.

$$Y_{X/S} = \frac{r_X}{r_S} = \frac{\mu_X}{\mu_S} \quad (3.14)$$

$$Y_{X/P} = \frac{r_X}{r_P} = \frac{\mu_X}{\mu_P} \quad (3.15)$$

$$Y_{P/S} = \frac{r_P}{r_S} = \frac{\mu_P}{\mu_S} \quad (3.16)$$

A partir das Equações 3.14 a 3.16, tem-se uma correlação importante para os fatores de conversão, dada pela Equação 3.17.

$$Y_{X/S} = Y_{X/P} Y_{P/S} \quad (3.17)$$

3.7 Transferência de Oxigênio e Respiração Microbiana

Dos processos microbiológicos de interesse industrial, aqueles com maior destaque são conduzidos em aerobiose, exigindo assim um adequado dimensionamento do sistema de transferência de oxigênio. Essa transferência se caracteriza pela disponibilização de oxigênio para a respiração microbiana, através da dissolução de O₂ contido na fase gasosa para a fase líquida.

Para que um cultivo ocorra com elevadas velocidades de crescimento, são necessárias altas taxas de consumo de substrato, mas também é imprescindível a presença de oxigênio dissolvido. Isso porque o O₂ é responsável pela reoxidação das coenzimas que participam da glicólise e do ciclo de Krebs, assim como pelo armazenamento de energia através da passagem de ADP para ATP.

Ao contrário da glicose e outros nutrientes necessários no meio, o oxigênio é muito pouco solúvel em água. Segundo Schmidell *et al.* (2001), sua concentração de saturação é da ordem de 7 mg L⁻¹, ao se borbular ar atmosférico à pressão de 1 atm e 35°C, o que equivale a uma fração molar ou volumétrica de 20,9%.

Assim, é necessário que o oxigênio seja constantemente dissolvido no meio, principalmente nos momentos mais avançados, onde a concentração celular pode ser elevada, e não apenas nos instantes iniciais.

3.7.1 Modelagem da transferência de oxigênio

Para realizar o equacionamento da transferência de oxigênio, são consideradas duas películas estagnadas, como mostra a Figura 3.4.

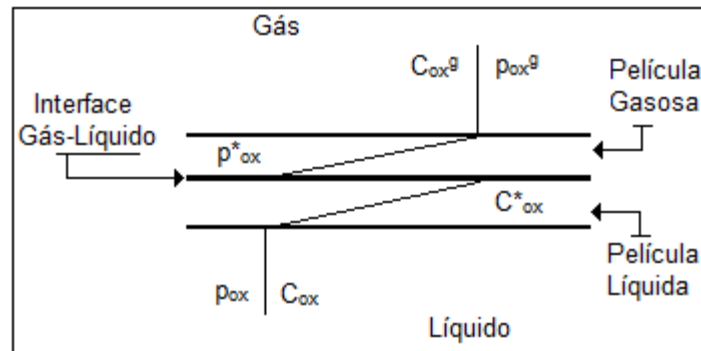


Figura 3.4 – Interface gás-líquido com as películas estagnadas
Fonte: Adaptado de Schmidell *et al.* (2001)

Considerando-se uma bolha de ar suspensa em um meio líquido, supõe-se a existência de uma película gasosa estagnada, entre o seio gasoso e a interface gás-líquido, onde se localiza a resistência ao transporte de oxigênio. Essa resistência é caracterizada pelo inverso do coeficiente de transferência da película gasosa (k_g), definido pela relação entre a difusividade do oxigênio e a espessura da película estagnada. Como a transferência ocorre apenas por efeito difusional, esta depende de um gradiente entre a pressão parcial de O_2 no interior da bolha (p_{ox}^g) e a pressão parcial na interface (p_{ox}^*).

Este mesmo raciocínio é aplicado para a fase líquida, onde a resistência ao transporte de oxigênio é caracterizada pelo inverso do coeficiente de transporte na película líquida (k_L). Neste caso, o fluxo de oxigênio depende da existência de um gradiente entre a concentração de O_2 na interface C_{ox}^* e a concentração de O_2 no meio líquido (C_{ox}).

Admitindo-se estado estacionário, em termos de transferência de O_2 , define-se o fluxo de oxigênio por unidade de área interfacial (n_{ox}) como a razão entre o gradiente e a resistência (inverso do coeficiente de transferência), apresentado na Equação 3.18.

$$\begin{aligned}
n_{ox} &= k_g H(p_{ox}^g - p_{ox}^*) = k_L H(p_{ox}^* - p_{ox}) \\
&= k_g (C_{ox}^g - C_{ox}^*) = k_L (C_{ox}^* - C_{ox})
\end{aligned}
\tag{3.18}$$

Como não há condições de se conhecer os valores relativos à interface gás-líquido, trabalha-se com um coeficiente global de transferência, levando em conta que a resistência devido ao filme gasoso pode ser desprezada, e considerando $p_{ox}^g = p_{ox}^*$ e $C_{ox}^* = C_{ox}^g$. Assim, a Equação 3.18 pode ser escrita conforme a Equação 3.19.

$$n_{ox} = k_L H(p_{ox}^g - p_{ox}^*) = k_L (C_{ox}^* - C_{ox}) \tag{3.19}$$

Sendo n_{ox} definido por unidade de área, um parâmetro que apresenta grande dificuldade de quantificação, pode-se definir a velocidade de transferência de oxigênio ($n_{ox}.a$) em função do coeficiente volumétrico de transferência de O_2 ($k_L a$), conforme a Equação (3.20).

$$n_{ox}.a = k_L a H(p_{ox}^g - p_{ox}^*) = k_L a (C_{ox}^* - C_{ox}) \tag{3.20}$$

Caso esteja ocorrendo variação da concentração de O_2 (C_{ox}) em relação ao tempo (t), a velocidade de transferência de oxigênio ($n_{ox}.a$) pode ser escrita pela Equação (3.21).

$$\frac{dC_{ox}}{dt} = k_L a (C_{ox}^* - C_{ox}) \tag{3.21}$$

3.7.2 Modelo de respiração microbiana

Após a correta modelagem da transferência do oxigênio do ar para o meio líquido, deve-se analisar a respiração microbiana, pelo consumo do oxigênio dissolvido.

Neste contexto, a definição de velocidade específica de respiração (Q_{O_2}) é representada pela Equação 3.22, que introduz a característica biológica do sistema em estudo. Este valor, para um determinado microrganismo, é função da concentração de O_2 no meio segundo o modelo de Monod (1949), conforme Equação 3.23.

$$Q_{O_2} = \frac{1}{X} \frac{dC_{ox}}{dt} \quad (3.22)$$

$$Q_{O_2} = Q_{O_2max} \frac{C_{ox}}{K_{ox} + C_{ox}} \quad (3.23)$$

Acima de certa concentração de O₂, chamada de concentração crítica (C_{crit}), o valor de Q_{O₂} é constante e máximo (ver Figura 3.2) conforme descreve o modelo de limitação de Monod (1949). Assim, para que um sistema de agitação e aeração opere com máxima velocidade específica de respiração, a concentração de O₂ no meio deve ser mantida acima da concentração crítica, a fim de que a concentração de oxigênio não seja limitante.

No perfil traçado a partir da Equação 3.21, é possível observar que a C_{crit} é atingida quando a concentração de O₂ dissolvido apresenta um patamar superior ao seu valor inicial, indicando ou a morte celular ou alterações negativas em seu metabolismo.

Em geral, os valores de C_{crit} são extremamente baixos, situando-se entre 0,3 e 0,7 ppm, o que corresponde entre 5 a 10% da concentração de saturação do oxigênio em água a 35°C e 1 atm. Os valores de C_{crit} apontam os mais baixos valores para a constante de saturação do oxigênio (K_{ox}).

Porém, não é apenas o O₂ dissolvido que interfere na velocidade específica de respiração (Q_{O₂}), mas também as condições do cultivo. Assim, Pirt (1975) propôs a relação linear entre Q_{O₂} e μ_x, conforme a Equação 3.24, considerando que células que estão crescendo em altas velocidades, apresentam altas velocidades de consumo de O₂. A Equação 3.24 expressa a manutenção celular (m_{ox}) e a conversão de O₂ para as células (Y_{ox}).

$$Q_{O_2} = m_{ox} + \frac{1}{Y_{ox}} \mu_X \quad (3.24)$$

3.7.3 Transferência de oxigênio e respiração microbiana – estimativa de K_La e Q_{O_2}

O procedimento matemático segundo Schmidell *et al.*, (2001) pode ser utilizado para a estimativa dos parâmetros K_La e Q_{O_2} , com dados coletados por sensor conforme um método dinâmico de análise experimental de O_2 dissolvido.

O método dinâmico (TAGUCHI & HUMPHREY, 1966) consiste na interrupção da aeração para anular a transferência de oxigênio em determinado instante. Conforme o perfil da Figura 3.5, a concentração de O_2 dissolvido no instante inicial C_0 começa a diminuir, e o sinal do sensor é registrado continuamente. Ao se atingir certo valor C_{01} , retoma-se a aeração nas condições normais e registra-se o aumento da concentração de O_2 dissolvido até atingir novamente o valor anterior C_0 . Este procedimento deve durar poucos minutos, já que a concentração não pode atingir valores críticos, os quais afetariam o metabolismo celular. Nesse curto espaço de tempo, admite-se que não ocorra aumento celular (X) e que Q_{O_2} mantém-se constante.

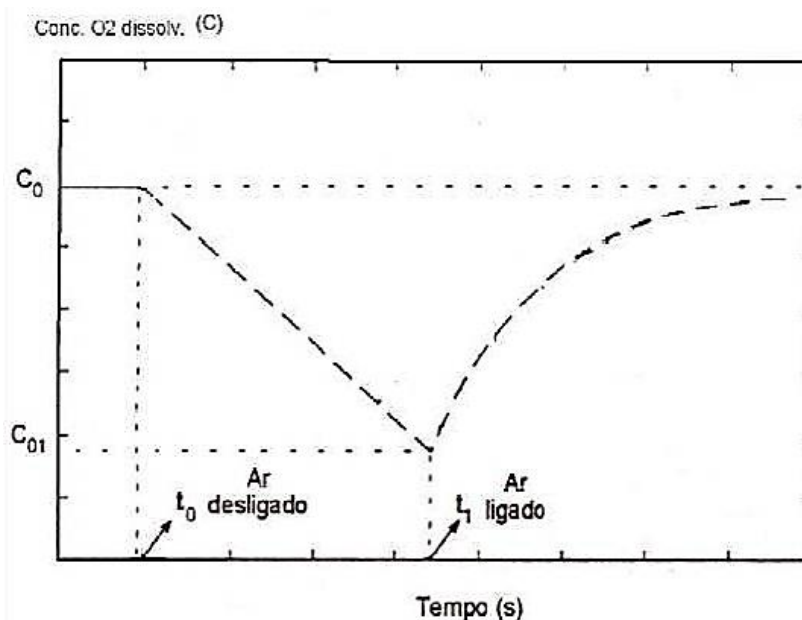


Figura 3.5 – Perfil de O_2 dissolvido obtido pelo método dinâmico
Fonte: adaptado de Schmidell *et al.*, (2001)

O valor da velocidade específica de respiração (Q_{O_2}) é estimado com os dados que descrevem o intervalo sem aeração (Equação 3.25), a partir do

coeficiente angular da curva de concentração de O₂ dissolvido em função do tempo (Equação 3.26) que foi obtida por integração analítica a Q_{O_2} constante.

$$\frac{dC_{ox}}{dt} = -Q_{O_2}X \quad (3.25)$$

$$C_{ox} = C_0 - Q_{O_2}X(t - t_0) \quad (3.26)$$

O valor do coeficiente volumétrico de transferência de O₂ (K_La) é determinado com a utilização dos dados obtidos durante a retomada da aeração caracterizando o perfil de aumento da concentração do O₂ dissolvido, conforme ilustrado pelo segundo intervalo do perfil de O₂ dissolvido (ver Figura 3.5).

Durante o processo fermentativo ocorre a transferência de O₂ da fase gasosa para a fase líquida (ver Equação 3.21), ao mesmo tempo em que as células consomem O₂ dissolvido (ver Equação 3.22), conforme a descrição do balanço de oxigênio no meio líquido dado pela Equação 3.27.

$$\frac{dC_{ox}}{dt} = K_La(C_{ox}^* - C_{ox}) - Q_{O_2}X \quad (3.27)$$

Admitindo-se que O₂ dissolvido varia lentamente, tem-se que, ao final da aplicação do método dinâmico, a concentração de O₂ dissolvido é igual ao valor inicial C_0 . Assim, supondo-se estado estacionário em $C=C_0$, a Equação 3.27 torna-se a Equação 3.28.

$$C_0 = C_{ox}^* - \left(\frac{Q_{O_2}X}{K_La}\right) \quad (3.28)$$

Substituindo-se a Equação 3.28 na forma rearranjada do balanço de oxigênio (ver Equação 3.27), tem-se a Equação 3.29, a qual resolvida analiticamente fornece a Equação 3.30, que é utilizada para a estimativa do parâmetro K_La .

$$\frac{dC_{ox}}{dt} = K_La(C_0 - C_{ox}) \quad (4.6)$$

$$\ln\left(\frac{C_0 - C_{ox}}{C_0 - C_{01}}\right) = -K_La(t - t_1) \quad (4.7)$$

3.8 Estimação dos parâmetros do modelo matemático

A estimação de parâmetros de qualquer problema matemático está intimamente ligada à ideia de otimização do modelo que o descreve. Uma definição ampla de otimização consiste em encontrar a melhor solução para um problema a partir de um conjunto de possíveis soluções. Nesse contexto, as possíveis soluções são iterativamente comparadas entre si, de acordo com o valor de um critério de otimização chamado função objetivo.

Como função objetivo, em geral utiliza-se a clássica função dos mínimos quadrados ordinários, embora outras derivações possam ser avaliadas, conforme apresentado na Tabela 3.5. Assim, quanto menor a diferença quadrática entre os dados experimentais e os seus respectivos valores simulados, melhor a descrição do modelo.

Embora o conceito de uma boa simulação matemática esteja, a princípio, atrelado ao melhor valor obtido para a função objetivo, é importante frisar que, especialmente em processos biotecnológicos, essa avaliação deve ser feita com cautela. Isso porque os parâmetros cinéticos (μ_{\max} , K_s , K_i) e estequiométricos ($Y_{X/S}$, $Y_{X/P}$, $Y_{P/S}$), dentre outros presentes nos diversos modelos de processos biotecnológicos, possuem uma relação não linear muito complexa que depende da complexidade e condições experimentais de cada sistema.

Tabela 3.5 – Equações para o cálculo dos resíduos

Número	Fórmula de cálculo	Problemas na utilização
1	$R = \sum_i (\tilde{y}_i - y_i)^2$	Variáveis com elevado valor absoluto privilegiados no ajuste.
2	$R = \sum_i \left(\frac{\tilde{y}_i - y_i}{(y_i)_m} \right)^2$	Tendência a ajustar melhor as variáveis próximas aos valores máximos.
3	$R = \sum_i \left(\frac{\tilde{y}_i - y_i}{\tilde{y}_i} \right)^2$	Resíduos muito elevados para valores muito pequenos da variável calculada.
4	$R = \sum_i \left(\frac{\tilde{y}_i - y_i}{y_i} \right)^2$	Resíduos elevados para valores muito pequenos e diferentes das variáveis calculada e experimental.

R: resíduo; y_i : valor experimental da variável; \tilde{y}_i : valor calculado da variável; $(y_i)_m$: máximo valor da variável experimental

O balanço de massa do sistema em questão mostra que o problema consiste em um conjunto de equações diferenciais ordinárias (EDO's), as quais não apresentam qualquer tipo de restrição. Isso implica que um número elevado de soluções, isto é, de parâmetros (μ_{\max} , K_s , $Y_{X/S}$, $Y_{X/P}$, e outros) dos modelos cinéticos avaliados poderá solucionar o sistema de EDO's, fornecendo um ajuste satisfatório do modelo aos dados experimentais.

Portanto, em processos biotecnológicos não basta a utilização de um método numérico de otimização adequado ou eficiente, sendo fundamental, também, o conhecimento do significado microbiológico de cada um dos parâmetros do modelo cinético avaliado, o que pode ser alcançado a partir do conhecimento da fisiologia microbiana utilizada no experimento e da experiência obtida em estudos experimentais. Além disso, cercar-se de avaliações teóricas obtidas na literatura poderá contribuir como uma estimativa inicial durante qualquer procedimento de otimização. E, finalmente, utilizar-se de testes estatísticos para descartar modelos inadequados e validar os modelos adequados torna-se crucial.

3.8.1 Métodos de otimização

Basicamente, os métodos utilizados com a ideia de otimizar um problema/modelo matemático podem ser divididos em métodos determinísticos e métodos não determinísticos. Os métodos determinísticos de otimização são chamados exatos, já que se utilizam de derivadas da função objetivo até que o critério de convergência seja satisfeito. Esses métodos podem apresentar tanto uma abordagem local, quanto uma abordagem global e, em ambos os casos, são fortemente dependentes de estimativas iniciais para cada um dos parâmetros a serem estimados. Dessa forma, são métodos suscetíveis de encontrar soluções ótimas locais se a estimativa inicial fornecida não estiver próxima da solução global. Por isso, em modelos de bioprocessos é fundamental a estimativa inicial das variáveis de maior sensibilidade do problema para que ocorra a convergência em soluções que tenham significado microbiológico.

Por outro lado, os métodos não determinísticos de otimização, também conhecidos por métodos probabilísticos/estocásticos ou metaheurísticos, baseiam-

se em regras específicas de busca de soluções que aleatoriamente convergem para a solução ótima global do problema. Esses métodos não são baseados em nenhum paradigma matemático de avaliação da função objetivo, como ocorre com os métodos determinísticos. Em um conceito amplo, pode-se dizer que os métodos não determinísticos são capazes de “varrer” um espaço finito de soluções tanto grande quanto necessário, e encontrar de forma aleatória a solução ótima do problema.

Assim, dependendo do tamanho do espaço de busca definido para cada um dos parâmetros a estimar, do número de iterações pré-estabelecido para a execução do procedimento de busca e de adequados valores pré-fixados para os parâmetros relativos ao algoritmo, é possível garantir a convergência em solução ótima muito próxima da solução global do problema/modelo matemático.

São exemplos de métodos não determinísticos de otimização: Algoritmos Genéticos, Enxame de Partículas, Busca Tabu, Recozimento Simulado, dentre outros.

A otimização de parâmetros por Enxame de Partículas (*Particle Swarm Optimization – PSO*) (KENNEDY & EBERHART, 2001) tem sido amplamente utilizado em diversas áreas da ciência. Esta é uma técnica estocástica, desenvolvida por Kennedy & Eberhart (1995), que leva em consideração o comportamento observado em bandos de pássaros e cardumes de peixes em busca de alimento. Nestes casos, é observado que o comportamento do grupo é influenciado tanto pelas experiências individuais quanto pela experiência acumulada pelo grupo. Esta técnica tem sido aplicada em problemas diversos, tais como integração de redes de trocadores de calor (RAVAGNANI *et al.*, 2009), problemas de tratamento de efluentes (FIORENTIN *et al.*, 2010), problemas de biodegradação (TRIGUEROS *et al.*, 2010), síntese de redes de reuso de água (TRIGUEROS *et al.*, 2012; RAVAGNANI *et al.*, 2014), e outros (Chagas, 2011; Neves *et al.*, 2013).

O método da Busca Tabu (*Tabu Search*) consiste em uma técnica meta-heurística desenvolvida por Glover (1989a,1989b), que explora o espaço de soluções movendo-se de uma solução para outra que seja seu melhor vizinho, executando uma busca local. Dentre outros autores, esta técnica foi utilizada por

Martins *et al.* (2003), Biagio *et al.* (2012), Pureza & Morabito (2006) e Poli & Pureza (2012).

O Algoritmo Genético (*Genetic Algorithm*) é uma técnica de busca estocástica, de Inteligência Artificial que leva em consideração os conceitos da genética e fundamenta-se nas explicações sobre a seleção e evolução das espécies oferecidas por Charles Darwin (ROSA & LUZ, 2009). Este método foi proposto em 1975 por John Holland, com o objetivo de desenvolver sistemas simulados em computador, explicando os processos de adaptação em sistemas naturais, e retendo os mecanismos originais encontrados em sistemas naturais. Esta técnica já foi amplamente utilizada em bioprocessos, como por exemplo por Weuster-Botz e Wandrey (1995), Weuster-Botz *et al.* (1997), Park e Froment (1998) e Etschmann *et al.* (2004).

3.9 Algoritmo Genético

O Algoritmo Genético (AG) é um procedimento computacional estocástico, utilizado para a busca e otimização de respostas, geralmente de problemas complexos, cuja solução por meio das técnicas tradicionais é extremamente difícil ou demorada. Assim, essa técnica vem sendo estudada para tentar superar as limitações apresentadas por métodos tradicionais, embora não garanta a obtenção da solução ótima global do problema.

Sob um ponto de vista simples, a principal diferença de métodos baseados em algoritmo genético quando comparados às técnicas tradicionais está na forma que a estimativa inicial é fornecida ao programa. Enquanto os métodos convencionais recebem esta estimativa de forma pontual e realizam a busca em torno deste ponto, em algoritmo genético a busca compreende a avaliação dos parâmetros em seus respectivos intervalos, os quais são pré-estabelecidos.

A técnica de algoritmo genético possui uma ampla gama de aplicações, sendo utilizada em diversas áreas como, por exemplo, roteamento de veículos (ALVARENGA, 2005; HEINEN & OSÓRIO, 2006), composições musicais (ROCHA, 2011), problemas de otimização industrial (CONSTANTINO & JUNIOR, 2002) e

síntese de redes de reuso de água (LAVRIC et al., 2005; TUDOR & LAVRIC, 2010; TUDOR & LAVRIC, 2011).

Sua aplicação consiste em um processo iterativo, que mantém uma população de possíveis soluções no domínio especificado, em competição para manterem-se no sistema. A aptidão de cada indivíduo no sistema – conjunto de possíveis soluções –, é calculada por meio da função objetivo. Após a seleção dos indivíduos que continuarão no sistema, gera-se uma nova população com base nos operadores genéticos: reprodução, cruzamento e mutação. Assim, sua implementação possui etapas bem definidas, que abrangem: (i) a escolha da população inicial (conjunto de pontos no espaço de busca); (ii) a avaliação desta população perante as condições estabelecidas; (iii) o cálculo da aptidão de cada indivíduo (cada ponto avaliado) e, (iv) a melhoria da população, que será novamente avaliada com relação à função objetivo.

Os principais parâmetros a serem controlados em um algoritmo genético são: o tamanho da população, a taxa de cruzamento, a taxa de mutação e o intervalo de geração.

O tamanho da população corresponde ao número inicial de conjuntos de possíveis soluções que será avaliado, partindo-se do intervalo fornecido como estimativa inicial. A taxa de cruzamento define a velocidade com que novas estruturas são inseridas na população. Se esse valor for muito baixo, o algoritmo pode se tornar muito lento, por outro lado, se for muito alto, pode ocorrer a perda de estruturas de alta aptidão devido à grande substituição da população. Quanto à taxa de mutação, esta evita que o resultado caia em um extremo local (mínimo ou máximo), sendo que valores muito elevados fornecem a busca essencialmente aleatória. O intervalo de geração controla a porcentagem da população que será substituída durante a próxima geração.

As etapas que compõem um algoritmo genético são basicamente sete, conforme demonstrado na Figura 3.6.

1. **Inicialização:** nesta etapa é gerada uma população inicial, que representa uma possível solução do sistema. Esta geração pode ser realizada de forma aleatória ou determinística.

2. **Cálculo da Aptidão:** todos os indivíduos gerados na etapa da inicialização são aplicados ao modelo fornecido e os valores retornados são avaliados perante uma função objetivo. Esta etapa verifica a aptidão de cada indivíduo, e lhe confere uma nota, dada pela relação (nota do indivíduo (f_i) / média da população (f)).

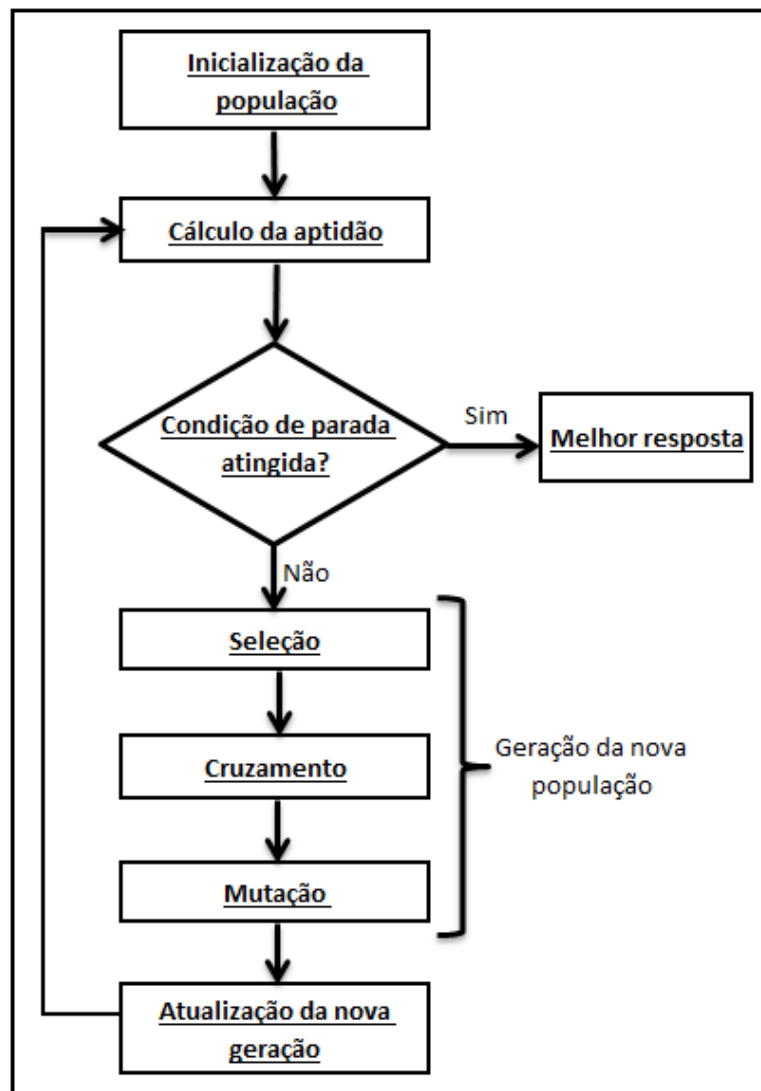


Figura 3.6 – Esquema do funcionamento de Algoritmo Genético

3. **Seleção:** sua implementação é baseada no processo de seleção natural, sendo que os indivíduos mais aptos têm maior probabilidade de gerar descendentes, e os menos aptos tem maior probabilidade de serem excluídos do processo. Existem várias técnicas para a seleção de indivíduos, tais como: roleta, torneio, dizimação, entre outros, conforme segue.

- **Roleta:** neste caso os indivíduos são representados em uma roleta (ver Figura 3.7), ocupando um espaço proporcional ao seu valor de aptidão. A roleta é girada quantas vezes for necessário.

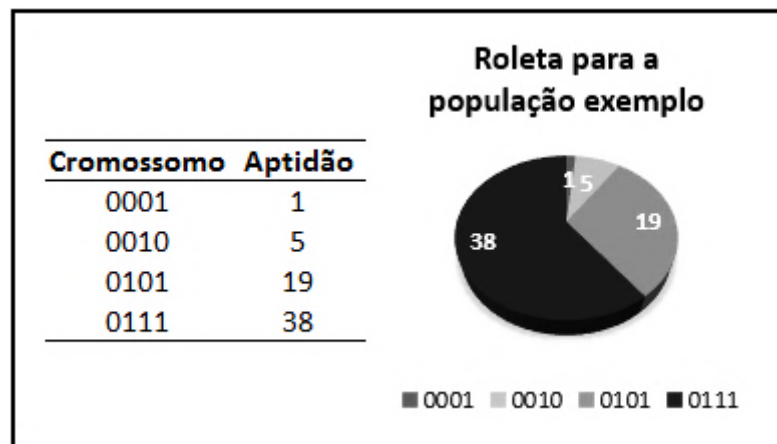


Figura 3.7 – Esquema do método da seleção por roleta
 Fonte: Adaptado de Linden (2006)

- **Torneio:** nesse caso, n indivíduos são escolhidos de forma aleatória (ver Figura 3.8), e então aquele com melhor valor de aptidão é selecionado para compor uma população intermediária. Os demais indivíduos são recolocados na população e o mesmo processo é repetido até que a nova população seja formada.

População	Cromossomos candidatos	Selecionados
0010, 0101, 0001, 0111,	0010, 1011, 1100	1011
1011, 1110, 1010, 1100,	0100, 1111, 0011	0011
1001, 0110, 0100, 1111,	⋮	⋮
0000, 1000, 0011, 1011	1001, 0110, 1011	0110

Figura 3.8 – Esquema do método da seleção por torneio
 Fonte: Adaptado de Rosa e Luz, (2009)

- **Dizimação:** nesta técnica, os indivíduos são ordenados de acordo com seus valores de aptidão, e alguns indivíduos menos adaptados são excluídos. A partir dos restantes, é escolhida a nova população aleatoriamente (ver Figura 3.9).

Indivíduos	Aptidão	Selecionados
0100	25	0100
0001	20	0001
1110	12	1110
1010	8	1010
1100	6	1100
1011	1	

Figura 3.9 – Esquema do método da seleção por dizimação
 Fonte: Adaptado de Rosa e Luz, (2009)

4. **Cruzamento:** nesta etapa, pares de indivíduos previamente selecionados (os pais) são cruzados entre si, pela troca de segmentos, gerando pares de novos indivíduos (os filhos). O cruzamento pode ocorrer de várias formas, dentre as quais as mais conhecidas são: ponto único; ponto duplo e pontos aleatórios.

- **Ponto único:** neste caso, um ponto é escolhido de forma aleatória, e a partir deste ponto, o material genético dos pais é trocado entre si, gerando dois novos filhos, conforme demonstrado na Figura 3.10.

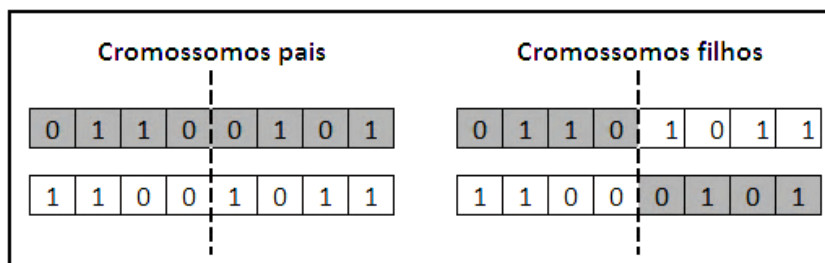


Figura 3.10 – Esquema do método do cruzamento por ponto único
 Fonte: Adaptado de Rosa e Luz, (2009)

- **Ponto duplo:** no cruzamento por ponto duplo, são escolhidos, aleatoriamente, dois pontos de corte, e o material genético dos pais é trocado de forma intercalada, como mostra a Figura 3.11.

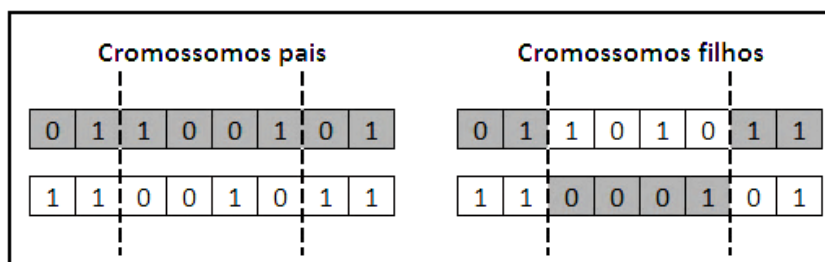


Figura 3.11 – Esquema do método do cruzamento por ponto duplo
 Fonte: Adaptado de Rosa e Luz, (2009)

- **Pontos aleatórios:** este tipo de cruzamento ocorre por meio de cromossomos binários, chamados de máscaras. A partir da máscara, quando o alelo possui o valor 1, um dos filhos recebe o material do primeiro pai, e quando o alelo é 0, esse filho recebe o material genético do segundo pai. Conseqüentemente, o mesmo ocorrerá para a geração do segundo filho, conforme demonstrado na Figura 3.12.

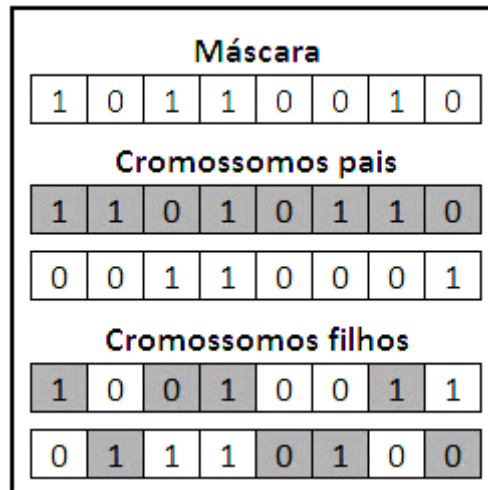


Figura 3.12 – Esquema do método do cruzamento por pontos aleatórios
 Fonte: Adaptado de Rosa e Luz, (2009)

5. **Mutação:** essa etapa garante a diversidade genética da população, inserindo características, que antes não existiam ou eram muito escassas. Esta operação deve acometer apenas uma pequena parcela da população, para que os indivíduos gerados não sejam muito diferentes de seus pais. Mas também, não pode ser tão pequena, a ponto de comprometer a diversidade da população. Para isso, existem várias técnicas de mutação, dentre as quais estão: a mutação aleatória e a mutação por troca.

- **Mutação aleatória:** neste caso, é escolhido um ponto aleatório do cromossomo, que tem o seu material trocado. Se o valor for 1, troca-se por 0, e vice versa, conforme apresentado na Figura 3.13.

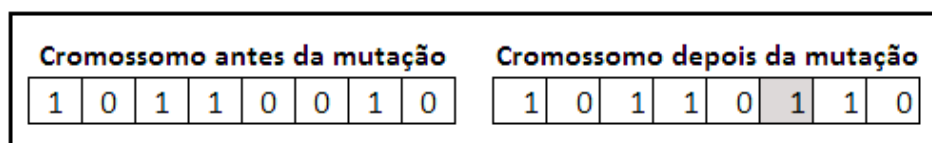


Figura 3.13 – Esquema do método da mutação aleatória
 Fonte: Adaptado de Rosa e Luz, (2009)

- Mutação por troca: neste processo, n pares de genes são escolhidos aleatoriamente, e seus valores são trocados entre si, conforme demonstrado na Figura 3.14.

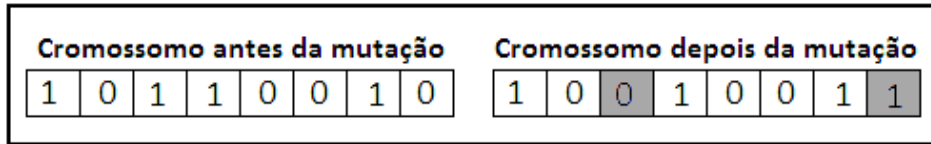


Figura 3.14 – Esquema do método da mutação por troca
 Fonte: Adaptado de Rosa e Luz, (2009)

6. Atualização: consiste na formação da nova população, sendo que neste ponto, o processo de geração já está concluído. A nova população pode ser formada de duas formas diferentes, sendo elas $(x+y)$ e (x,y) , que podem ser chamadas de estratégia de soma e vírgula, respectivamente.

- Estratégia de soma: neste caso, os novos indivíduos convivem com a população antiga, e geralmente uma percentagem muito pequena é selecionada para passar para a próxima geração, para evitar uma possível convergência prematura do método.
- Estratégia de vírgula: neste caso, os indivíduos da população antiga não convivem com os novos indivíduos gerados. Este fato pode acabar por excluir soluções com altas aptidões, eliminando bom material genético do processo.

7. Finalização: nesta etapa especifica-se o término da execução do AG a cada n -ésima iteração. Para tanto, os indivíduos da nova população são novamente aplicados ao modelo, e os valores fornecidos são utilizados para o cálculo da função objetivo. Os valores retornados pela função objetivo serão avaliados perante uma condição pré-estabelecida. Esta condição pode ser tanto uma quantidade específica de gerações (iterações), quanto o valor da aptidão de cada indivíduo da população na iteração, vinculada a um erro de convergência pré-definido.

3.10 Análise estatística dos resultados

Em geral, o ajuste de modelos a um conjunto de dados experimentais pode ser avaliado por inspeção visual do perfil simulado em relação aos pontos experimentais, bem como pelo valor da função objetivo estabelecido como critério de minimização, além do valor do coeficiente de correlação entre os valores simulados pelo modelo e os valores experimentais. Entretanto, essa análise é simples e relativa, embora seja importante na medida em que erros experimentais elevados e falta de réplicas são frequentes em processos biotecnológicos.

Contudo, é importante submeter os resultados dos ajustes a possíveis análises estatísticas, cujos objetivos são basicamente: (i) identificar a possibilidade de discriminação de um ou mais modelos com relação aos outros; e (ii) concluir se o(s) modelo(s) remanescente(s) representa(m) adequadamente o conjunto de dados experimentais avaliado.

Assim, a não adequação de um modelo matemático pode ser identificada por testes estatísticos, os quais abrangem: (i) o conhecimento da variância do erro experimental; ou (ii) a estimativa da variância do erro experimental; e também (iii) a falta da variância do erro experimental. Para o último caso, aplica-se o teste χ^2 de Bartlett; e para os dois primeiros casos, é possível a aplicação do teste F de Fisher e o teste F modificado, respectivamente (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

O teste χ^2 de Bartlett é bastante utilizado para a discriminação de modelos, por fazer uma avaliação da homogeneidade de suas variâncias. Assim, se χ^2 calculado for maior que χ^2 tabelado para $(1-\alpha)$ nível de confiança e $(M-1)$ número de modelos, então o modelo que corresponde ao maior valor de variância pode ser descartado, pois apresenta-se estatisticamente diferente dos demais (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Outro teste utilizado para a discriminação é o teste F-Fischer para modelos remanescentes. Nesta análise, é avaliado se dois modelos restantes são ou não diferentes do ponto de vista estatístico, e se um pode ser escolhido sobre o outro (SCHWAAB, 2007).

Ainda com o intuito de discriminação entre modelos, o parâmetro F pode ser útil, fornecendo valores que podem ser comparados entre si, embora não possua um embasamento estatístico muito aprofundado. Nesse caso, quanto maior o valor do parâmetro F do modelo, melhor será o seu ajuste aos dados experimentais (SCHWAAB, 2007).

Por fim, considerando-se uma distribuição normal da função objetivo, é possível definir uma distribuição χ^2 para GL graus de liberdade do modelo e (1- α) nível de confiança (BARD, 1974; SCHWAAB & PINTO, 2007, ALBERTON et al., 2012). Apresentam ajuste adequado aos dados experimentais aqueles modelos que possuem valores da função objetivo ordinária dentro do intervalo de confiança definido pela distribuição χ^2 .

É importante ressaltar que estes testes não determinam se um modelo descreve os dados experimentais de forma satisfatória ou não, sendo utilizados apenas para a discriminação de modelos (LOPES, 2007). Assim, outros testes devem ser aplicados para a determinação da qualidade com que um modelo descreve os dados experimentais, como o teste F-Fischer, para os casos em que há réplicas dos ensaios, ou o teste F-modificado, para os casos em que réplicas não foram possíveis (SCHMIDELL *et al.*, 2001). Estas avaliações consideram que a variância do erro do modelo deve ser menor que a variância do erro experimental.

A partir do intervalo de confiança definido pela distribuição χ^2 , é possível quantificar a probabilidade do modelo em ajustar-se aos dados experimentais, a partir do cálculo da probabilidade absoluta do modelo (SCHWAAB, et al. 2006; ALBERTON *et al.*, 2011; ALBERTON *et al.*, 2012).

Outra análise consiste no teste da randomicidade, útil para verificar eventuais tendências de ajuste do modelo aos dados experimentais. Nesse caso, um modelo torna-se adequado se os resíduos fornecidos entre os valores experimentais e calculados pelo modelo são aleatórios (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Conforme verificado, existe uma grande variedade de testes estatísticos que podem ser usados para selecionar o(s) modelo(s) que melhor descreve(m) os dados experimentais, bem como avaliar a qualidade do ajuste.

CAPÍTULO IV – METODOLOGIA

4.1 Descrição Geral

A fim de se estabelecer a modelagem matemática mais adequada para descrever a produção de PHB por *C. necator*, a pesquisa segue as metodologias esquematizadas na Figura 4.1. Frisa-se que, embora o procedimento experimental não tenha sido realizado durante a presente pesquisa, a descrição experimental mostra-se crucial na etapa de análise do processo.

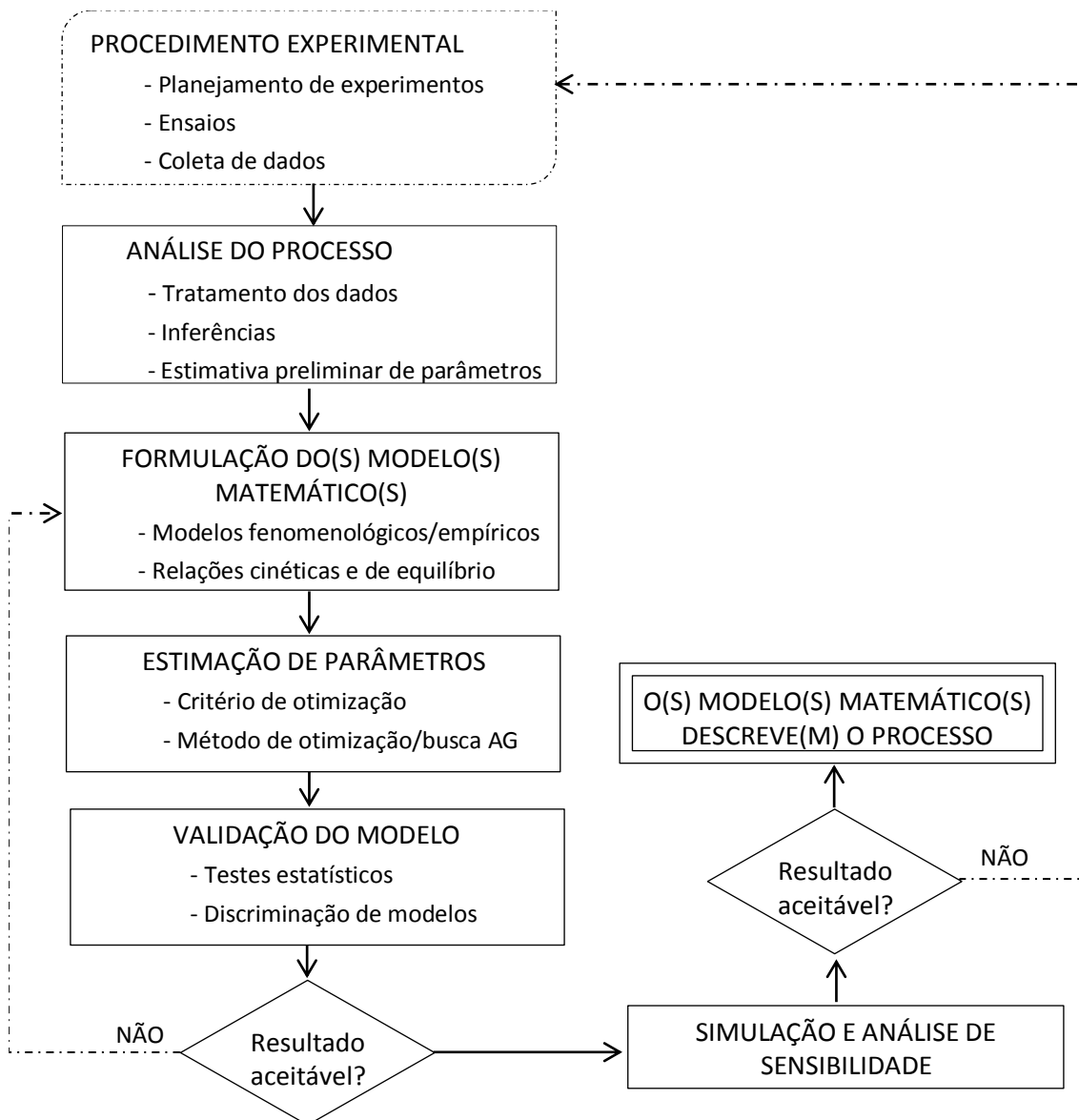


Figura 4.1 – Metodologia geral adotada no trabalho

4.2 Modelagem matemática da produção de PHB

Os dados experimentais da cinética de *C. necator* em cultivo descontínuo foram usados para o ajuste dos modelos de crescimento microbiano, de consumo de substrato e de formação do produto, apresentada na modelagem matemática de processos fermentativos conforme segue no tópico 4.2.1, a partir das seguintes etapas.

- I. Desenvolvimento matemático da cinética de processos fermentativos;
- II. Identificação do sistema de reações metabólicas (desenvolvimento da cinética de reação);
- III. Cálculo das velocidades específicas de transformação;
 - a. *Velocidade específica de crescimento celular*
 - i. Determinação da fase exponencial de crescimento por regressão linear;
 - ii. Aprimoramento da curva de biomassa em função do tempo;
 - iii. Ajuste polinomial da curva aprimorada de biomassa em função do tempo;
 - iv. Estimativa de $\mu_{\text{máx}}$;
 - b. *Velocidade específica de consumo do substrato*
 - i. Ajuste polinomial dos dados experimentais de substrato em função do tempo;
 - c. *Velocidade específica de formação do produto;*
 - i. Ajuste polinomial dos dados experimentais do produto em função do tempo;
 - d. *Classificação da cinética de formação do produto;*
- IV. Estimativa preliminar dos coeficientes de rendimento;
- V. Escolha dos modelos cinéticos a serem avaliados com base na literatura;
- VI. Desenvolvimento do balanço de massa em sistema descontínuo.

4.2.1 Cinética de processos fermentativos

Neste estudo admite-se a modelagem fenomenológica de modelos não estruturados e não segregados. A modelagem matemática da cinética em sistema descontínuo foi expressa em função do crescimento de biomassa residual (X_r), de consumo de substrato carbono (S_C) e de substrato nitrogênio (S_N) e de produção de PHB (P), cujas taxas de velocidades específicas de transformação são descritas conforme as Equações 4.1 a 4.4.

$$\mu_{X_r} = \frac{1}{X_r} \frac{dX_r}{dt} \quad (4.1)$$

$$\mu_{S_C} = \frac{1}{X_r} \left(-\frac{dS_C}{dt} \right) \quad (4.2)$$

$$\mu_{S_N} = \frac{1}{X_r} \left(-\frac{dS_N}{dt} \right) \quad (4.3)$$

$$\mu_P = \frac{1}{X_r} \frac{dP}{dt} \quad (4.4)$$

A biomassa residual (X_r) foi determinada, conforme a Equação (4.5), pela diferença entre a concentração de biomassa total (X_T) e a concentração de PHB (P), pois o polímero fica retido no interior das células (MULCHANDANI *et al.*, 1989).

$$X_r = X_T - P \quad (4.5)$$

A influência das variáveis de estado nas velocidades de transformação dos componentes foi representada por equações de balanço de massa do processo que foram construídas a partir da identificação do sistema simplificado de reações metabólicas. Assim, as Equações 4.6 a 4.9 descrevem de forma generalizada o sistema de equações diferenciais ordinárias que correlacionam o consumo dos substratos ao polímero produzido vinculado ao crescimento celular.

$$\frac{dX_r}{dt} = f(S_C, S_N) \quad (4.6)$$

$$\frac{dS_C}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S_C}} f(S_C, S_N) \quad (4.7)$$

$$\frac{dS_N}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S_N}} f(S_C, S_N) \quad (4.8)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_{X/P}} f(S_C, S_N) \quad (4.9)$$

4.2.2 Identificação do sistema de reações metabólicas

O estudo da cinética de reação começa usualmente com um esquema simplificado de reações derivadas do conhecimento das vias metabólicas envolvidas. Para tanto, como não eram conhecidas as rotas metabólicas deste processo, foram feitas algumas propostas para serem posteriormente analisadas. As propostas de mecanismos de reação para a produção de PHB por *Cupriavidus necator* são apresentadas na Tabela 4.1.

Nestas propostas, a etapa 1 representa a fase de crescimento e multiplicação de células, onde não há a limitação de nitrogênio e considerando-se que não exista acúmulo significativo de produto.

Já a etapa 2 representa a fase de acúmulo de produto, onde há limitação de nitrogênio e admitindo-se que não exista mais multiplicação de células.

Estas propostas foram analisadas para determinar qual a rota metabólica simplificada está sendo seguida durante o processo. Esta análise foi realizada por meio de regressão utilizando-se a ferramenta Análise de Dados do Excel, para cada temperatura de operação, sendo que o critério de seleção da melhor proposta foi o coeficiente de correlação da regressão.

Tabela 4.1 – Propostas de mecanismo de reação na produção de PHB por *C. necator*

Proposta	Etapas	Mecanismo
Proposta 1	Etapa 1	$S_C \rightarrow X$
	Etapa 2	$S_C \rightarrow P$
Proposta 2	Etapa 1	$S_N \rightarrow X$
	Etapa 2	$S_C \rightarrow P$

Proposta 3	Etapa 1	$S_N \rightarrow X$
	Etapa 2	$S_N \rightarrow P$
Proposta 4	Etapa 1	$S_C \rightarrow X$
	Etapa 2	$S_C + S_N \rightarrow P$
Proposta 5	Etapa 1	$S_C + S_N \rightarrow X$
	Etapa 2	$S_C + S_N \rightarrow P$
Proposta 6	Etapa 1	$S_C + S_N \rightarrow X$
	Etapa 2	$S_N \rightarrow P$
Proposta 7	Etapa 1	$S_C + S_N \rightarrow X$
	Etapa 2	$S_C \rightarrow P$

4.2.3 Cálculo das velocidades específicas de transformação

As velocidades específicas de crescimento celular (μ_{Xr}), de produção de PHB (μ_P), de consumo da fonte de carbono (μ_{Sc}) e de consumo da fonte de nitrogênio (μ_{SN}) foram determinadas a partir da derivada do ajuste polinomial aos dados experimentais de $X_r(t)$, $P(t)$, $S_C(t)$ e $S_N(t)$, respectivamente, conforme definições matemáticas apresentadas nos itens 3.3 e 3.4, implementadas no *software* Excel®.

As velocidades específicas de crescimento celular (μ_{Xr}) e de produção de PHB (μ_P) serão úteis para identificar o comportamento cinético da cultura *Cupriavidus necator*. E as velocidades específicas de consumo dos substratos carbono e nitrogênio, limitantes do processo fermentativo, servirão para identificar possíveis consumos desses para a manutenção celular.

4.2.3.1. Cálculo da velocidade específica de crescimento celular

A metodologia empregada para esse cálculo é iniciada pela detecção da fase de crescimento exponencial, seguido pelo aprimoramento do perfil de crescimento

celular em função do tempo e, por fim, por um ajuste polinomial aplicado aos dados experimentais.

a) Detecção da fase de crescimento exponencial

Nessa etapa foram traçados gráficos de $\ln(X_r)$ em função do tempo (Figura 4.2) para diferentes limites iniciais e finais de tempo, assumindo fase lag desprezível. A partir destes gráficos realizaram-se as regressões lineares, cujo melhor coeficiente de correlação indicou o início e a duração da fase exponencial de crescimento celular. Assim, a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) foi estimada pelo coeficiente angular da equação de melhor correlação.

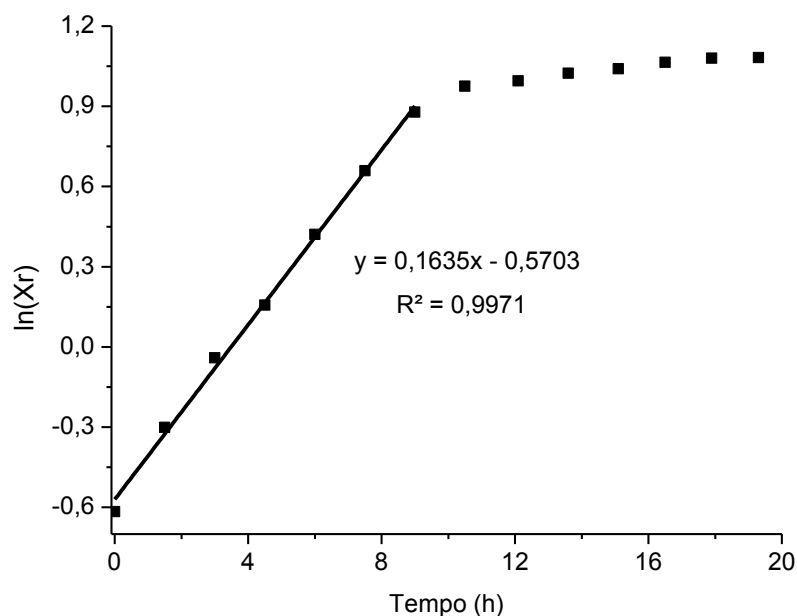


Figura 4.2 – Detecção da fase de crescimento exponencial

b) Aprimoramento do perfil de X_r em função do tempo

Utilizando-se a equação obtida pela regressão linear na etapa anterior, foram incluídos alguns pontos durante a fase exponencial, a fim de melhorar a precisão dos cálculos posteriores. Assim, obteve-se a curva aprimorada de biomassa (X_r) em função do tempo (t), conforme a Figura 4.3.

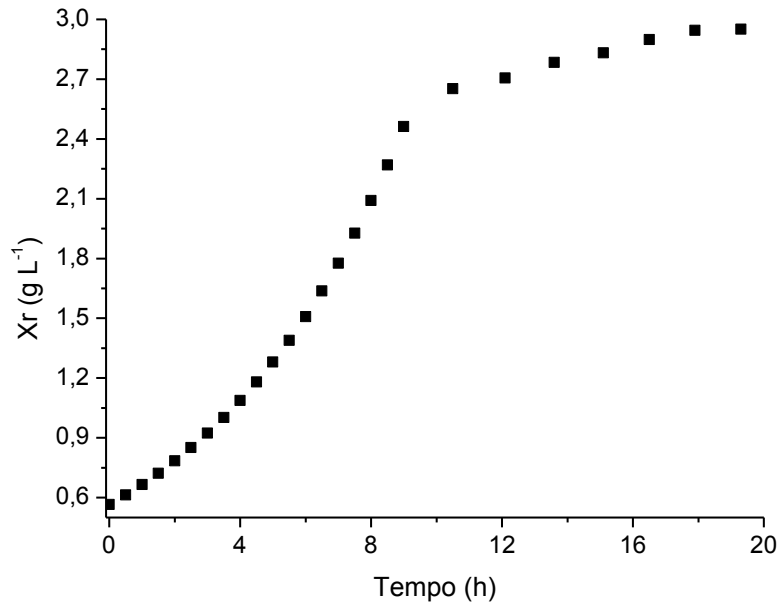


Figura 4.3 – Aprimoramento do perfil de Xr em função do tempo

c) Ajuste polinomial

A partir do perfil aprimorado de Xr em função do tempo ajustou-se um polinômio de grau n no tempo aos valores de Xr, obtendo-se uma função $X=f(t)$. O grau do polinômio foi definido pela análise do coeficiente de correlação.

Por fim, a velocidade instantânea de crescimento foi determinada pela derivada do polinômio $Xr=f(t)$, que dividida pelos valores de Xr forneceu o perfil da velocidade específica de crescimento celular (μ_{Xr}).

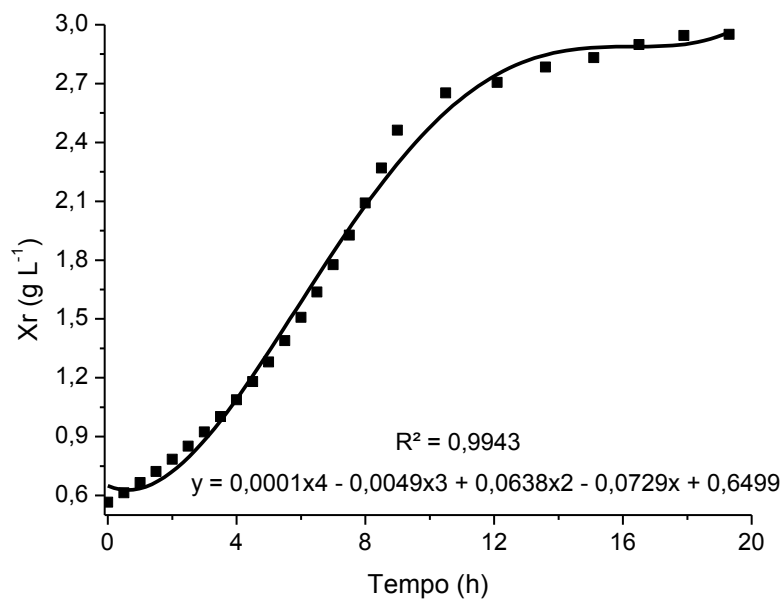


Figura 4.4 – Ajuste polinomial

4.2.3.2 Cálculo da velocidade específica de consumo dos substratos

O método de ajuste polinomial foi diretamente aplicado aos dados experimentais de consumo da fonte de carbono (S_C) em função do tempo e da fonte de nitrogênio (S_N) em função do tempo, respectivamente. A partir do polinômio $S_C=f(t)$ e $S_N=f(t)$ as velocidades instantâneas de consumo foram determinadas por derivada, as quais divididas pelos valores de X_r aprimorados forneceu o perfil da velocidade específica de consumo de carbono (μ_{SC}) e de nitrogênio (μ_{SN}), respectivamente.

4.2.3.3 Cálculo da velocidade específica de produção de PHB

O cálculo da velocidade específica do produto foi realizado pelo método de ajuste polinomial, conforme o procedimento apresentado anteriormente.

4.2.4 Estimativa preliminar dos coeficientes de rendimento

Em uma etapa inicial, os coeficientes de rendimento foram estimados por simples regressão linear, os quais foram utilizados para definir o espaço de busca do procedimento de estimação de parâmetros. Seus valores são fornecidos diretamente pelo coeficiente angular do intervalo de correlação linear dos perfis de concentração. O rendimento de PHB a partir do substrato fonte de carbono foi estimado a partir do perfil de concentração de produto (P) em função da concentração de substrato (S_C), conforme a Equação 4.14. Os coeficientes de acúmulo de biomassa a partir dos substratos fonte de nitrogênio e de carbono foram estimados respectivamente, conforme as Equações 4.15 e 4.16, pelos gráficos de concentração de biomassa residual (X_r) em função da concentração de substrato (S_C e S_N). Finalmente, o coeficiente de rendimento celular por produto formado foi estimado pela Equação 4.17.

$$Y_{P/S_C} = -\frac{dP}{dS_C} \quad (4.14)$$

$$Y_{Xr/Sc} = -\frac{dX_r}{dS_C} \quad (4.15)$$

$$Y_{Xr/SN} = -\frac{dX_r}{dS_N} \quad (4.16)$$

$$Y_{Xr/P} = \frac{Y_{Xr/Sc}}{Y_{P/Sc}} \quad (4.17)$$

4.2.5 Classificação do processo fermentativo

A partir dos perfis de velocidades específicas é possível sugerir se o produto está ou não associado ao crescimento celular e, então, sugerir a avaliação dos modelos cinéticos de crescimento que descrevem esse comportamento.

4.2.6 Escolha dos modelos cinéticos de crescimento microbiano

Em condições adequadas de nutrientes, pH e temperatura, e na ausência de nitrogênio, as células viáveis de *Cupriavidus necator* são capazes de produzir e acumular em seu interior o polímero PHB. Contudo, durante esse processo ocorrem inibições e/ou limitações pelo substrato, uma vez que os metabólitos resultantes das diversas reações enzimáticas interferem no crescimento celular, diminuindo a produtividade de PHB.

Conhecer a concentração de substrato associada a elevadas taxas de crescimento microbiano é fundamental para alcançar altas taxas de produção de PHB. Neste trabalho, o efeito das concentrações dos substratos nitrogênio e carbono foram avaliados a partir de 4 modelos cinéticos que descrevem a taxa de crescimento de células (μ_{Xr}) e 1 modelo que descreve a taxa de produção de PHB (μ_P), os quais são apresentados na Tabela 4.2. Esses modelos foram escolhidos por meio da análise da literatura e são apresentados detalhadamente na seção 2.4. A Tabela 4.2 mostra modelos de μ_{Xr} e μ_P em função dos substratos S_C e/ou S_N , e em alguns casos em função da razão entre ambos, S_r , bem como as hipóteses admitidas para suas aplicações.

Tabela 4.2 – Modelos cinéticos de crescimentos celular e produção de produto utilizados para avaliar o efeito das concentrações dos substratos carbono e nitrogênio

Modelo	Hipótese/Aplicação	Referência
$\mu_x = \mu_{max} \left(\frac{S_C}{S_C + K_{S_C}} \right) \left(\frac{S_N}{S_N + K_{S_N}} \right)$	Admite que ambos os substratos são limitantes do meio	MONOD (1949)
$\mu_x = \mu_{max} \left(\frac{S_N}{S_N + K_{S_N} + \frac{S_N^2}{K_{i_N}}} \right) \left(\frac{S_C}{S_C + K_{S_C} + \frac{S_C^2}{K_{i_C}}} \right)$	Descreve a inibição pela concentração de ambos os substratos	ANDREWS (1968)
$\mu_p = \alpha \mu_x + \frac{\beta_m S}{K_{\beta S} + S}$	Considera que o produto está parcialmente associado ao crescimento celular	LUEDEKING e PIRET (1959)
$\mu_x = \mu_{maxC} \frac{S_C}{K_{S_C} + S_C} \mu_{maxN} \frac{(S_N/K_{S_N})^n}{1 + (S_N/K_{S_N})^n}$	Ambos os substratos são limitantes do meio e possuem uma relação sigmoidal	HEINZLE e LAFFERTY (1980)
$\mu_x = \left(\frac{\mu_{maxN} S_N}{S_N + K_{S_N}} \right) \left(\frac{\mu_{maxC} S_C}{S_C + K_{S_C} + \frac{S_C^2}{K_{i_C}}} \right)$	Ambos os substratos são limitantes e o consumo de nitrogênio é preferencial	DUNN <i>et al.</i> , (1992)
μ_x	velocidade específica de crescimento celular	T ⁻¹
μ_p	velocidade específica de produção de PHB	T ⁻¹
S_C, S_N	concentração de fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente	M L ⁻³
X_T	concentração de biomassa total	M L ⁻³
S_r	razão entre as concentrações dos substratos	---
$K_{i_C}, K_{i_N}, K_{S_C}, K_{S_N}, K_P, K_1, K_{i_N}^P, K_{S_C}^P, K_{i_C}^P, S_{m_N}, S_{m_C}, a, n_1, n_2, n_3, n_4, n, m$	Parâmetros cinéticos	

4.2.7 Balanço de massa em sistema descontínuo

As equações diferenciais apresentadas na modelagem fenomenológica de modelos não estruturados e não segregados (Equações 4.1 a 4.4) foram correlacionadas com as equações dos modelos cinéticos escolhidos (Tabela 4.2), levando em consideração o sistema de reações metabólicas (Tabela 4.1) que melhor descreveu a produção de PHB. Como resultado gerou-se para cada modelo avaliado, um sistema de EDO's (Equações 4.6 a 4.9) vinculando os parâmetros estequiométricos da reação aos parâmetros do modelo cinético.

4.3 Estimação de parâmetros

Os parâmetros dos modelos foram estimados por um método de otimização baseado em Algoritmo Genético (HOLLAND, 1975) implementado no *software* Maple®. A resolução do sistema de equações diferenciais ordinárias (Equações 4.6 a 4.9) foi realizada pelo método de *Rosenbrock* (1960). A função dos mínimos quadrados (Equação 4.18) foi utilizada como critério de minimização, admitindo-se distribuição normal das variações experimentais e erros constantes em todas as condições experimentais.

$$FObj = \sum_{i=1}^{NV} \sum_{j=1}^{NP} \left(\frac{\tilde{y}_{ij} - y_{ij}}{y_i^{max}} \right)^2 \quad (4.18)$$

Sendo y_{ij} o valor experimental da variável i em j -ésimo ponto experimental; \tilde{y}_{ij} o valor calculado da variável i em j -ésimo ponto do modelo; e y_i^{max} o maior valor experimental da variável i .

Todas as execuções foram realizadas em microcomputador Intel Core i5 (2,5 GHz e 3 MB de memória cache), com 6 GB de memória RAM.

4.4 Algoritmo Genético

O método foi implementado no *software* Maple®, conforme o fluxograma dado pela Figura 4.5.

Gerou-se randomicamente a matriz da população inicial, com tamanho igual ao número de indivíduos pré-estabelecido, além do número de parâmetros, considerando-se o intervalo de busca pré-definido para cada parâmetro. Assim, cada indivíduo foi representado por um vetor com posições igual ao número de parâmetros, caracterizando uma possível solução para o modelo. Dessa forma, avaliou-se cada vetor linha da população inicial no sistema de EDO's, obtendo-se a aptidão de cada indivíduo, isto é, o valor da função objetivo para o conjunto de parâmetros.

Na próxima etapa gerou-se a nova população selecionando, a partir da população inicial, os pais pelo método do torneio, cuja taxa de seleção foi especificada em 30%.

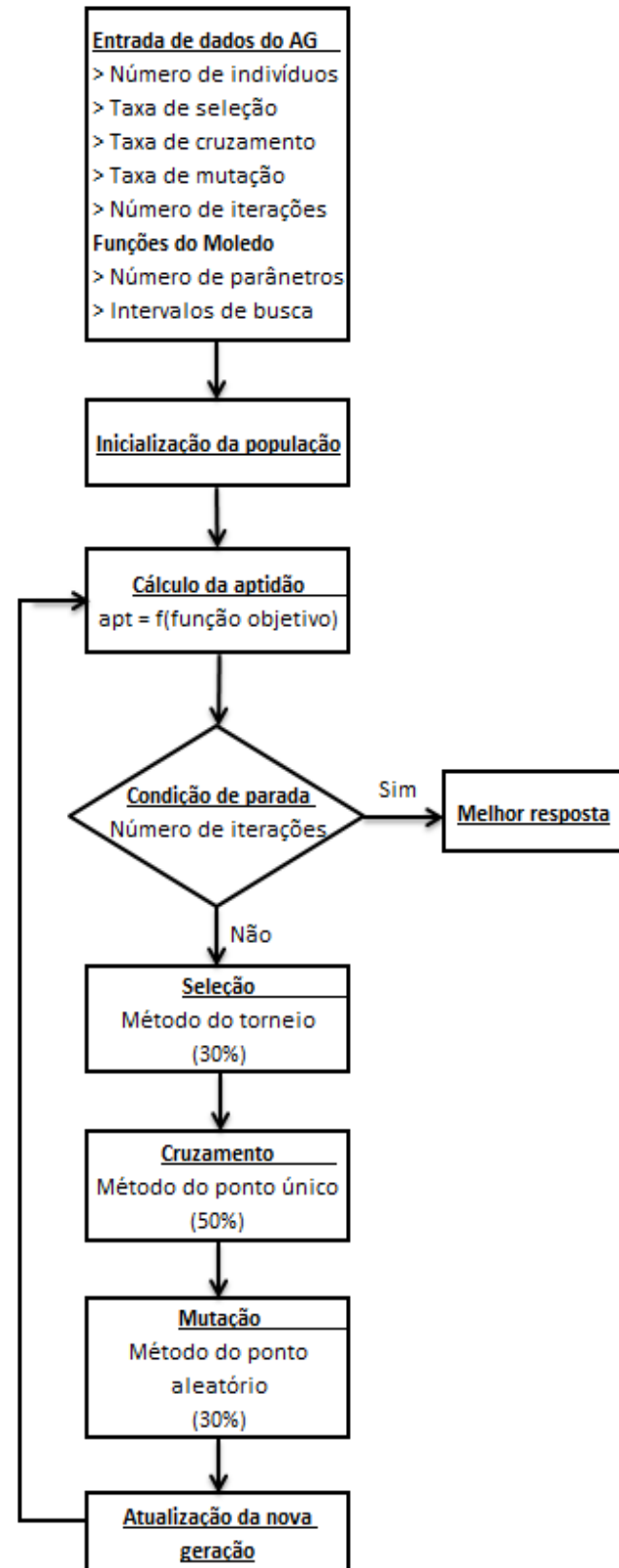


Figura 4.5 – Esquema do AG implementado

Após selecionada, a população de pais foi cruzada pelo método do ponto único em uma taxa de 50%, gerando-se a nova população de indivíduos, agora denominada de filhos. Em seguida, a população de filhos passou para o processo de mutação a uma taxa de 30%, pelo método do ponto aleatório. Portanto, a cada iteração, surge uma nova população a partir dos pais selecionados, seus cruzamentos e, mutação dos filhos gerados.

Assim, até atingir o número pré-estabelecido de iterações, a aptidão de cada indivíduo que compõe a nova população foi analisada junto ao sistema de equações diferenciais por meio do valor da função objetivo, mantendo-se a população de melhor aptidão para a geração da população futura. Nesse caso, os indivíduos mais aptos a participarem das futuras gerações foram aqueles que resultaram menor valor para a função objetivo.

O procedimento de busca é finalizado na última iteração, fornecendo como resultado aquele indivíduo com melhor aptidão dentro de sua população e dentre todas as gerações que existiram. Esse indivíduo corresponde ao conjunto de parâmetros que melhor descreve o modelo matemático avaliado durante o procedimento.

4.5 Análises Estatísticas

4.5.1 Intervalo de confiança da função objetivo

Adotou-se o princípio da máxima verossimilhança, conforme Fisher (1912), para assegurar a interpretação estatística dos resultados, o qual estabelece que os parâmetros devem ser ajustados de forma a maximizar a função de densidade de probabilidade das variáveis experimentais, o que implica minimizar a função objetivo dos mínimos quadrados. Assim, admitiu-se que os dados experimentais sofreram perturbações aleatórias segundo uma distribuição normal.

Considerando que os desvios entre os dados experimentais e os valores calculados pelo modelo seguem uma distribuição normal, então a função objetivo

representou a soma ponderada do quadrado das variáveis aleatórias com distribuição normal, o que resultou na definição da distribuição χ^2 .

Devido à falta das réplicas experimentais, admitiu-se os erros médios de 12, 15 e 10% para as concentrações de substrato, biomassa e produto, respectivamente (LOPES, 2007) para o cálculo das variâncias dos erros experimentais.

Assim, a função dos mínimos quadrados ponderados, isto é, quadrado das diferenças experimental e calculada pelo modelo ponderadas pelas variâncias foi utilizada na interpretação estatística dada pelo intervalo de confiança na distribuição χ^2 , conforme a Equação 4.19.

$$\chi^2_{GL}^{\left(\frac{1-\alpha}{2}\right)} < FO(\theta) < \chi^2_{GL}^{\left(\frac{1+\alpha}{2}\right)} \quad (4.19)$$

Sendo $GL=N_V.N_P-N_{PAR}$ (N_V variáveis dependentes, N_P pontos experimentais e N_{PAR} parâmetros do modelo) e $(1 \pm \alpha)/2$ o intervalo de confiança definido em $(1-\alpha)$ nível de confiança.

O valor mínimo da função objetivo $FO(\Theta)$ foi analisado sob três hipóteses (SHWAAB *et al.*, 2006) no intervalo de confiança construído para GL graus de liberdade, em um nível de significância de 5%.

- Se $FO(\Theta)$ encontrou-se dentro dos limites definidos pela distribuição χ^2 , então o modelo foi capaz de descrever os dados experimentais;
- Se $FO(\Theta)$ encontrou-se acima do limite superior da distribuição χ^2 , então o modelo não pode descrever os dados experimentais e foi desconsiderado;
- Se $FO(\Theta)$ encontrou-se abaixo do limite inferior da distribuição χ^2 , então o modelo pode descrever os dados experimentais, porém com superparametrização, isto é, com uma precisão muito superior que os erros experimentais.

4.5.2 Parâmetro F

Para a discriminação dos modelos matemáticos foi utilizado o cálculo do Parâmetro F de Fisher, conforme a Equação 4.20. A sua utilização reforçou a escolha do modelo mais adequado aos dados experimentais, embora não apresente uma avaliação estatística aprofundada. Assim, quanto maior foi o valor F_{calc} , mais adequado tornou-se modelo.

$$F_{calc} = \frac{GL}{NE - 1} \sum_{i=1}^{NV} \sum_{j=1}^{NP} \frac{(y_{ij} - \bar{y}_{ij})^2}{(\tilde{y}_{ij} - y_{ij})^2} \quad (4.20)$$

Sendo GL graus de liberdade do modelo; NE número de experimentos; N_V número de variáveis e N_P número de pontos experimentais.

Ressalta-se que o Parâmetro F é falho para os modelos superparametrizados, já que nesses casos o denominador da Equação 4.20 – que representa a função objetivo dos mínimos quadrados ordinários –, será tão pequeno quanto possível, resultando em elevados valores para o F_{calc} .

4.5.3 Teste F-Fischer

O teste F de Fischer foi aplicado considerando-se que, embora não tenham sido realizadas as réplicas dos ensaios, os valores do erro experimental pudessem ser estimados a partir dos erros médios de 12, 15 e 10% para os substratos, biomassa e produto, respectivamente, conforme propostas de Lopes (2007).

O cálculo de F_F foi dado pela Equação 4.21, levando-se em conta a estimativa da variância do erro do modelo (s_C^2) e do erro experimental (s_e^2) representados pelas Equações 4.22 e 4.23, respectivamente.

$$F_F = \frac{s_C^2}{s_e^2} \quad (4.21)$$

$$s_c^2 = \frac{\sum_{i=1}^{NE} (\tilde{y}_i - y_i)^2}{NE - N_{PAR}} \quad (4.22)$$

$$s_e^2 = \frac{\sum_{i=1}^{NE_R} (y_i - \bar{y}_i)^2}{NE_R - N_V} \quad (4.23)$$

Sendo NE número de experimentos; NE_R número de experimentos repetidos; N_{PAR} número de parâmetros do modelo; N_V número de variáveis.

A partir do teste F de Fisher, o modelo descreveu adequadamente os dados experimentais se a variância do erro do modelo foi menor que a variância do erro experimental ($s_c^2 < s_e^2$), ou seja, quando o valor de $F_F < 1$.

4.5.4 Teste F-modificado

O teste F-modificado foi aplicado para a estimativa do erro experimental (ε) conforme a Equação 4.24. Foi considerado $s_c^2 < s_e^2$, e calculado a variância do erro do modelo por meio da Equação 4.22 (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

$$\varepsilon = \sqrt{\frac{s_c^2(NE - N_V)}{\sum_{i=1}^{NE} (y_i)^2}} \quad (4.24)$$

Sendo s_c^2 variância do erro do modelo; NE número de experimentos; N_V número de variáveis.

O modelo foi considerado adequado aos dados experimentais, se o valor do erro experimental estimado (ε) foi menor que o valor do erro experimental admitido de 12, 15 e 10% para os substratos, biomassa e produto, respectivamente, conforme propostas de Lopes (2007).

4.5.5 Teste χ^2 de Bartlett

O teste χ^2 de Bartlett foi aplicado para verificar se o valor da variância de algum modelo é estatisticamente diferente dos demais modelos avaliados, conforme a Equação 4.25, sendo a variância do i -ésimo modelo dado pela Equação 4.26, e a variância combinada apresentada pela Equação 4.27.

$$\chi^2 = \frac{\ln(\bar{s}^2) \sum_{i=1}^M (GL)_i - \sum_{i=1}^M (GL)_i \ln(s_i^2)}{\left(1 + \frac{1}{3(M-1)}\right) \left[\sum_{i=1}^M \frac{1}{(GL)_i} - \frac{1}{\sum_{i=1}^M (GL)_i} \right]} \quad (4.25)$$

$$s_i^2 = \sum_{k=1}^{NE} \frac{(\tilde{y}_{ki} - y_k)^2}{GL} \quad (4.26)$$

$$\bar{s}^2 = \frac{\sum_{i=1}^M (GL)_i s_i^2}{\sum_{i=1}^M (GL)_i} \quad (4.27)$$

Sendo M número de modelos; GL graus de liberdade do modelo; S^2 variância do modelo e \bar{S}^2 variância combinada dos modelos.

Duas hipóteses foram avaliadas com valores tabelados $\chi^2(\alpha, M-1)$ para 5% de significância e $M-1$ número de modelos, conforme Schmidell *et al.*, (2001):

- Se $\chi^2_{\text{calculado}} > \chi^2_{\text{tabelado}}$: descartou-se o modelo que apresentou o maior valor de variância;
- Se $\chi^2_{\text{calculado}} < \chi^2_{\text{tabelado}}$: nenhum dos modelos propostos foi desconsiderado.

4.5.6 Probabilidade absoluta

Para o cálculo da probabilidade de distribuição χ^2 dos modelo (ϕ_M) foram feitas as seguintes considerações: os desvios entre o modelo M e os dados experimentais seguem uma distribuição normal; e as incertezas das variáveis dependentes são constantes.

Os valores de ϕ_M foram obtidos para um nível de confiança de 95%, por meio do *software* Statistica[®]. Conforme a definição apresentada pela Equação 4.28, quando a função objetivo $FO(\Theta)$ apresentou um valor muito pequeno, então a sua probabilidade ser maior que χ^2 aproximou-se de zero, ao passo que a probabilidade do modelo aproximou-se de um. Por outro lado, quando $FO(\Theta)$ mostrou um valor muito grande, então a probabilidade desse valor ser maior que χ^2 aproximou-se de um, resultando na probabilidade do modelo próxima de zero.

$$\phi_M = 1 - p[\chi_{GL}^2 \leq FO(\theta)] \quad (4.28)$$

Sendo $GL=N_V.N_P-N_{PAR}$ (N_V variáveis dependentes, N_P pontos experimentais e N_{PAR} parâmetros do modelo).

A partir do valor ϕ_M do modelo, duas hipóteses foram analisadas, conforme Schwaab *et al.* (2006) e Alberton *et al.*, (2012):

- Se $\phi_M < \left(\frac{1-\alpha}{2}\right)$, então o modelo foi descartado;
- Se $\phi_M > \left(\frac{1+\alpha}{2}\right)$, então o modelo foi considerado adequado.

4.5.7 Teste de Randonicidade

O teste de randomicidade avaliou possíveis tendências no ajuste do modelo aos dados experimentais, analisando se os sinais dos resíduos entre os valores das variáveis calculadas e experimentais mudaram de forma randômica conforme a distribuição normal dada pela Equação 4.29.

$$Z = \frac{R - \bar{R}}{\sigma_R} \quad (4.29)$$

Sendo R o número de vezes que a sequência de resíduos muda de sinal.

A média da distribuição R foi calculada pela Equação 4.30, e o seu desvio padrão foi calculado pela Equação 4.31.

$$\bar{R} = \frac{2N^+N^-}{N^+ + N^-} + 1 \quad (4.30)$$

$$\sigma_R = \sqrt{\frac{2N^+N^-(2N^+N^- - N^+ - N^-)}{(N^+ + N^-)^2(N^+ + N^- - 1)}} \quad (4.31)$$

Sendo N^+ o número de resíduos positivos e N^- o número de resíduos negativos.

A partir da distribuição normal em um nível de confiança, três hipóteses foram analisadas, conforme Schmidell *et al.* (2001):

- Se $-1,96 < Z < 1,96$, os resíduos foram considerados aleatórios, e então o ajuste do modelo foi satisfatório;
- Se $Z > 1,96$, o ajuste do modelo não foi satisfatório, pois ocorreu uma oscilação padrão dos resíduos em relação a zero;
- Se $Z < -1,96$, o ajuste do modelo não foi satisfatório, pois ocorreu uma tendência dos resíduos de positivo para negativo ou vice-versa, conforme baixo valor de R.

4.5.8 Teste F-Fischer para dois modelos

A partir da Equação 4.32, o teste F_{F2} foi aplicado para os dois modelos remanescentes, calculando-se o quociente entre os valores da função objetivo de cada modelo – mínimos quadrados ordinário (FO).

$$F_{F2} = \frac{FO^{M1}}{FO^{M2}} \quad (4.32)$$

Sendo M1 modelo 1 e M2 modelo 2.

Os intervalos da distribuição de probabilidade acumulada F-Fisher foram definidos em um nível de confiança de $(1-\alpha)$ e GL1 e GL2 graus de liberdade dos modelos M1 e M2, respectivamente, conforme a Equação 4.33.

$$F_{GL1;GL2}^{\left(\frac{1-\alpha}{2}\right)} < F_{F2} < F_{GL1;GL2}^{\left(\frac{1+\alpha}{2}\right)} \quad (4.33)$$

Para um nível de 95% de confiança, duas hipóteses foram analisadas, conforme Schwaab *et al.*, (2006):

- Se F_{F2} encontrou-se dentro dos limites da distribuição F-Fisher, então as variâncias dos modelos não foram ditas estatisticamente diferentes, e nenhum deles foi descartado;
- Se F_{F2} encontrou-se fora dos limites da distribuição F-Fisher, então as variâncias dos modelos foram ditas estatisticamente diferentes, e o melhor ajuste foi atribuído ao modelo com menor valor da função objetivo $FO(\Theta)$.

CAPÍTULO V – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados cinéticos do cultivo de *C. necator* foram obtidos por Fiorese (2008). Sua apresentação e discussão estão descritas no Anexo C deste trabalho, sendo a melhor temperatura, tanto para o cultivo quanto para a produção de PHB, de 32,5°C.

5.1 Estudo da cinética de reação

Primeiramente, foram realizados testes de regressão para se determinar a melhor proposta de rota metabólica. Estas análises foram realizadas para todas as temperaturas de operação.

Como já é um fato conhecido, é necessária a presença de carbono para que possa haver multiplicação celular (etapa 1), sendo que este é o chamado de combustível para as células. Como não pode haver a reprodução celular sem que haja carbono disponível no meio, foram preliminarmente descartadas as propostas 2 e 3 da Tabela 4.1.

Da mesma forma, como o produto armazenado é composto por cadeias de carbono, é também necessária a sua presença na etapa 2. Logo, foi descartada também a proposta 6.

Desta forma, foram analisadas as propostas 1, 4, 5 e 7 da Tabela 4.1. Os resultados encontrados para o coeficiente de regressão para as temperaturas de 30, 32,5, 35 e 37,5°C estão demonstrados na Tabela 5.1..

Os dados dos experimentos realizados a 40°C não foram analisados nesta etapa por terem apresentado inibição do crescimento devido à elevação da temperatura.

Como esperado, o comportamento dos coeficientes de regressão encontrados foi o mesmo para todas as temperaturas estudadas, exceto 32,5°C. Assim, as análises serão feitas em conjunto.

Na Etapa 1, o coeficiente de correlação ficou melhor para os modelos que consideraram que as células se multiplicam na presença de carbono e nitrogênio ($S_C + S_N$), o que é confirmado pelo fato que, quando a concentração de nitrogênio é igual a zero, praticamente não há mais formação de células. Assim, são descartadas as propostas 1 e 4.

Os valores dos coeficientes de regressão ficaram iguais para a etapa 2 em todas as propostas, exceto para 32,5°C. Isto pode ser explicado pelo fato que, enquanto para as outras temperaturas nesta etapa não há variação na concentração de nitrogênio, logo sua presença ou ausência no modelo não acarretariam mudanças no coeficiente de regressão, à temperatura de 32,5°C é observada uma pequena variação, levando a uma variação também no coeficiente. Este fato, por si só já justifica a hipótese de que apenas o carbono é utilizado para a produção do polímero, que é confirmado pela teoria, que diz que deve haver ausência de um nutriente, no caso o nitrogênio, para que possa haver o acúmulo do produto. Desta forma, são eliminadas as propostas 4 e 5.

Assim, a melhor rota metabólica corresponde a proposta 7, que demonstra que na etapa de multiplicação celular é necessária a presença de ambos os substratos (carbono e nitrogênio) e na etapa de acúmulo de produto, deve haver apenas carbono disponível. Esta proposta é suportada pela literatura que diz que os microrganismos acumulam o produto como forma de armazenamento de energia no caso de ausência de algum nutriente.

Tabela 5.1 – Coeficientes de correlação para as propostas de rotas metabólicas

	Etapa	Equação	Coeficiente de correlação			
			30°C	32,5°C	35°C	37,5°C
Proposta 1	Etapa 1	$S_C \rightarrow X$	0,982	0,935	0,924	0,956
	Etapa 2	$S_C \rightarrow P$	0,878	0,899	0,926	0,597
Proposta 4	Etapa 1	$S_C \rightarrow X$	0,982	0,935	0,924	0,956
	Etapa 2	$S_C + S_N \rightarrow P$	0,878	0,601	0,926	0,597
Proposta 5	Etapa 1	$S_C + S_N \rightarrow X$	0,986	0,936	0,933	0,958
	Etapa 2	$S_C + S_N \rightarrow P$	0,878	0,601	0,926	0,597
Proposta 7	Etapa 1	$S_C + S_N \rightarrow X$	0,986	0,936	0,933	0,958
	Etapa 2	$S_C \rightarrow P$	0,878	0,899	0,926	0,597

5.1.1 Velocidades específicas

As curvas de velocidade específica de crescimento celular (μ_{X_r}), formação do produto (μ_P), e consumo dos substratos (μ_{S_C} e μ_{S_N}) foram obtidas pelo método do ajuste polinomial e são apresentadas nas Figura 5.1 a Figura 5.4. Ainda pelo mesmo método foram obtidos os valores de μ_{max} (velocidade específica máxima de crescimento celular), duração da fase de crescimento exponencial e tempo de geração para todas as temperaturas, cujos valores são apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Valores de μ_{max} , duração da fase exponencial e tempo de geração estimados por regressão linear de $\ln(X)$ em função do tempo

Temperatura (°C)	Fase Exponencial (h)	μ_{max} (h ⁻¹)	t_g (h)
30	9,0	0,1635	4,24
32,5	8,3	0,1963	3,53
35	6,1	0,2878	2,40
37,5	8,8	0,2099	3,30
40	5,0	0,2029	3,41

Verifica-se pelas velocidades específicas (Figura 5.1 a Figura 5.4) que durante a fermentação não ocorreu uma associação bem definida entre os componentes, e que essas relações variaram com a temperatura. Assim, analisando-se o processo fermentativo em duas fases definidas como o crescimento celular e produção de PHB, nota-se que no início do processo predominam as transformações da biomassa.

Nos cultivos a 32,5 e 35°C, observa-se que as velocidades específicas μ_{X_r} , μ_{S_C} e μ_{S_N} correlacionam-se bem, apresentando perfis similares na 1ª fase. Esse comportamento mantém-se na 2ª fase, quando a temperatura é de 32,5°C, e tende a um decaimento à medida que μ_P torna-se significativo aumentando constantemente. Isso mostra que o acúmulo de PHB não está vinculado à reprodução celular, e sim à atividade das células que não se reproduzem.

A complexidade do processo ficou evidente quando verificou-se que a similaridade entre μ_{X_r} , μ_{S_C} e μ_{S_N} não se manteve durante a produção de PHB no cultivo a 35°C. Neste caso, durante a 2ª fase os aumentos de μ_{S_C} e μ_{S_N} podem ser explicados pela elevação da biomassa devido ao acúmulo de componentes lipídicos na parede celular. Esse fenômeno também ocorreu no cultivo a 37,5°C, conforme verificado no perfil de μ_{S_C} durante a 2ª fase.

Nos cultivos a 30 e 37,5°C também se verificou a predominância da produção de energia para o crescimento celular na 1ª fase, embora μ_{X_r} tenha necessitado alcançar um valor máximo μ_{max} . A correlação entre μ_{X_r} , μ_{S_C} e μ_{S_N} manteve-se durante a 2ª fase, cujos perfis diminuíram à medida que a velocidade específica de produção μ_P aumentava, sugerindo que a produção de PHB está vinculada apenas à atividade das células que não se reproduzem.

Portanto, a produção de PHB não está diretamente ligada à rota metabólica de produção de energia, indicando que a formação do produto está parcialmente associada ao crescimento celular. Essa classificação do processo fermentativo não é absoluta, já que depende das condições operacionais, mas tem sido sugerida na produção de PHB, ácido cítrico, ácido láctico, novobiocina, entre outros (SCHMIDELL, 2001).

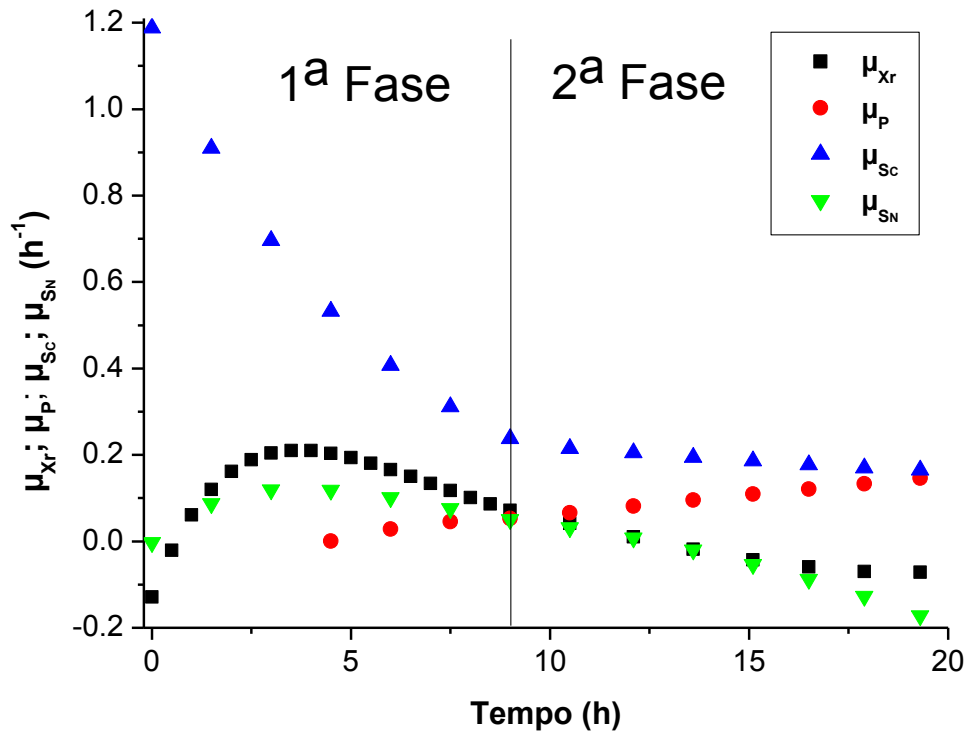


Figura 5.1 – Perfis de velocidade específica do cultivo de *C. necator* na temperatura de 30°C

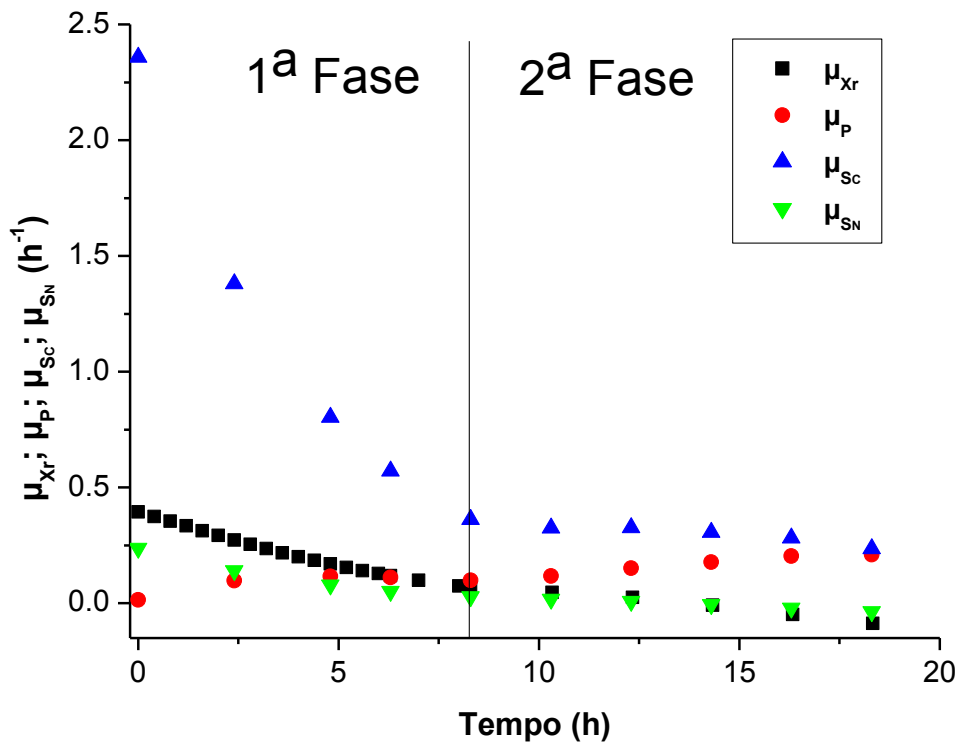


Figura 5.2 – Perfis de velocidade específica do cultivo de *C. necator* na temperatura de 32,5°C

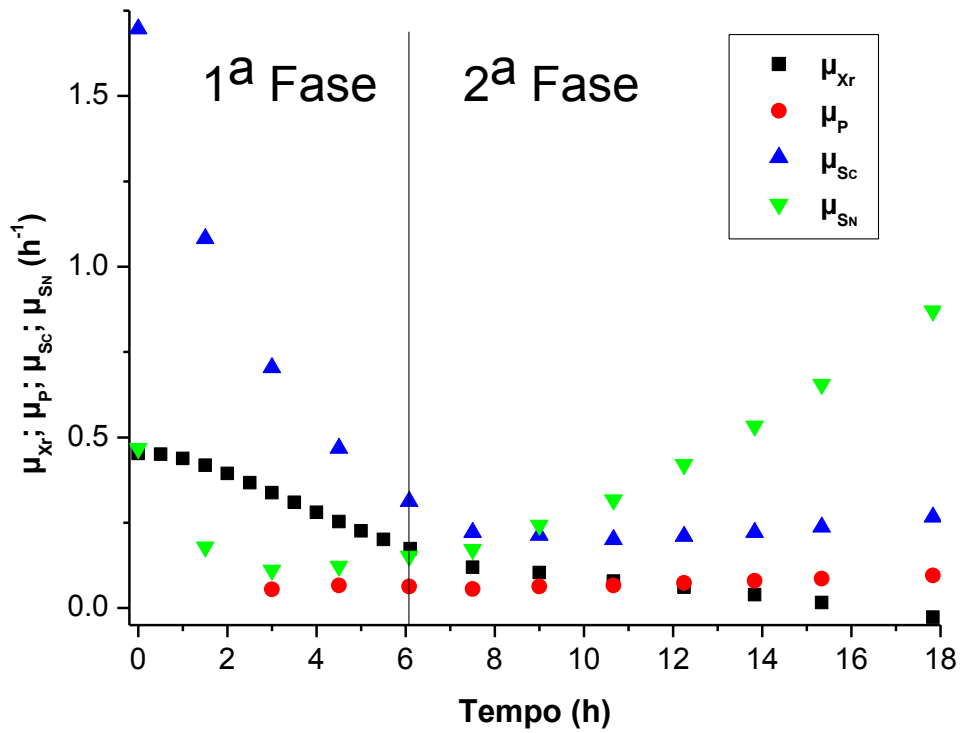


Figura 5.3 – Perfis de velocidade específica do cultivo de *C. necator* na temperatura de 35°C

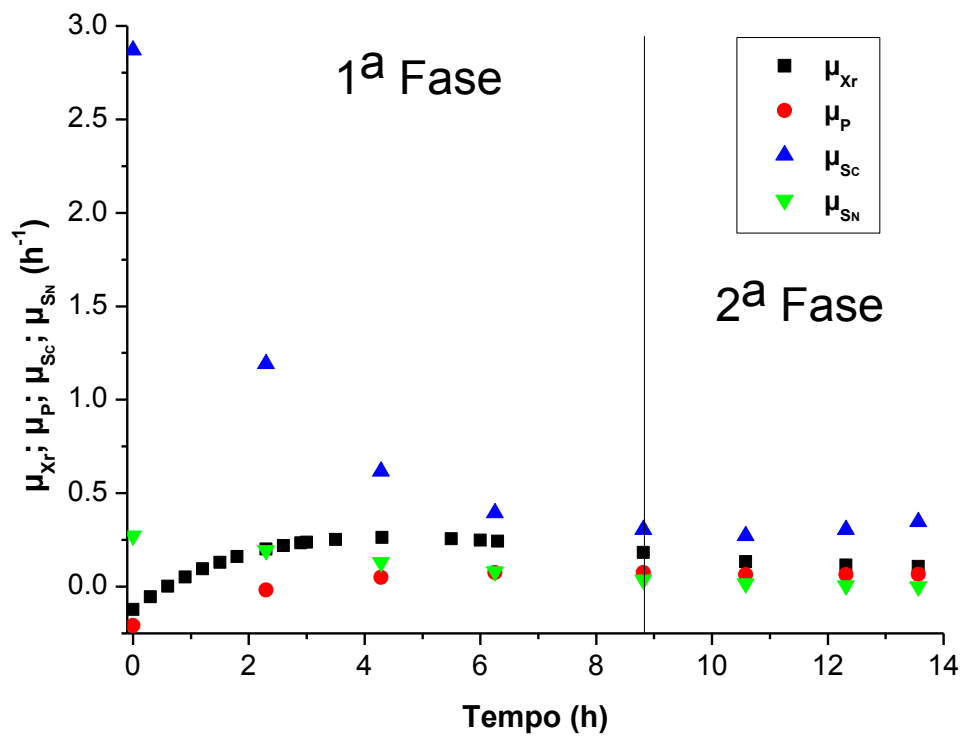


Figura 5.4 – Perfis de velocidade específica do cultivo de *C. necator* na temperatura de 37,5°C

Para as temperaturas de 30 e 37,5°C verifica-se que os perfis fornecem uma taxa máxima de crescimento celular de 0,2 – 0,25 h⁻¹, que depois sofre um decaimento ao longo do tempo. Para as demais temperaturas (32,5 e 35°C), os comportamentos das curvas de crescimento específico de biomassa apresentam um decaimento constante ao longo do tempo, partindo de um valor de biomassa cerca de duas vezes maior que os valores máximos obtidos nas demais temperaturas. Isso forneceu os melhores rendimentos de biomassa com relação ao nitrogênio ($Y_{X/SN}$) e ao carbono ($Y_{X/SC}$), além da melhor produtividade em biomassa e em PHB. O fato de a velocidade de crescimento específico ($\mu_{X,r}$) estar no seu valor máximo já no início do processo, indica que 32,5 e 35°C favorecem a fermentação, já que o crescimento celular ocorreu em sua maior parte durante o pré-cultivo.

A Figura 5.5 mostra o comportamento da taxa específica de crescimento celular ($\mu_{X,r}$) em função da razão entre a fonte de nitrogênio e carbono (S_N/S_C). Pressupondo-se que existe uma relação importante entre as fontes de energia, buscou-se encontrar uma relação significativa para o crescimento celular ao longo das frações de nitrogênio e carbono. Os dados apresentados para as temperaturas de 30 e 37,5°C indicam que um valor ótimo entre ambas as fontes de energia ocorreu em aproximadamente 0,03 e 0,025, respectivamente. Isso mostra que a concentração máxima da fonte de nitrogênio deve ser de 2,5 e 3% da fonte de carbono, quando as temperaturas de cultivo são de 37,5 e 30°C. Acima desses valores, o crescimento celular encontra-se inibido pelas concentrações dos substratos.

Analisando-se as temperaturas mais favoráveis à fermentação (32,5 e 35°C), é possível perceber que a concentração da fonte de nitrogênio igual a 4% em relação à concentração da fonte de carbono mostrou as maiores taxas de crescimento celular ($\mu_{X,r}$) e, portanto não apontou efeito de inibição por ambas as concentrações de substratos.

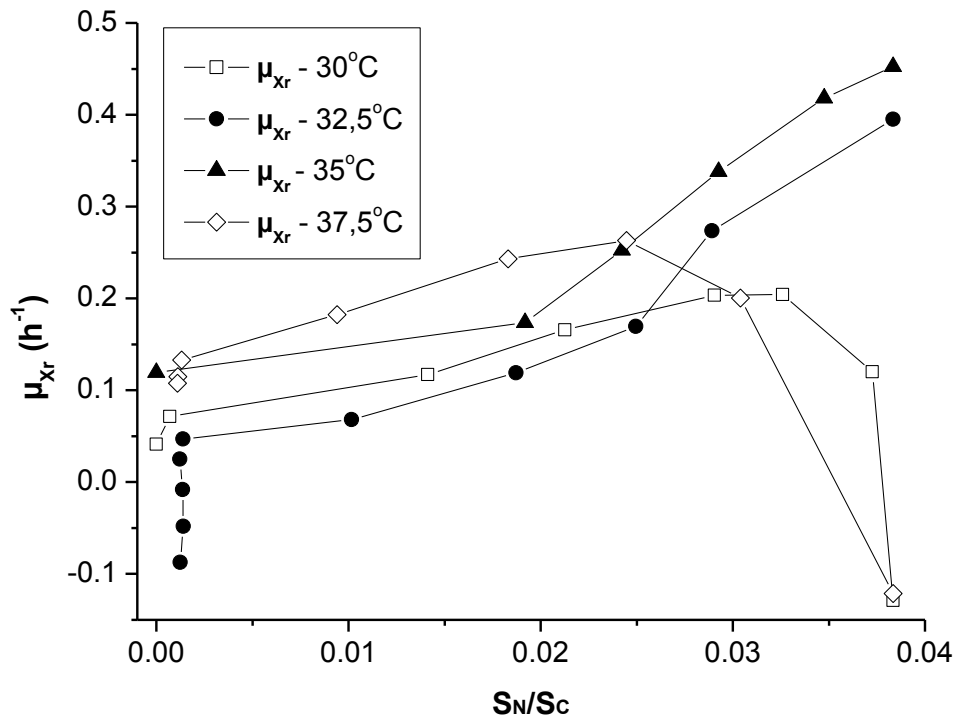


Figura 5.5 – Velocidade específica de crescimento de *C. necator* em função da razão entre a fonte de nitrogênio e carbono

O comportamento de inibição pelas concentrações dos substratos pode ser observado no perfil da taxa de crescimento específico (μ_{x_r}) em função da concentração (S), conforme apresentado na Figura 5.6. Assim, os efeitos inibitórios ocorreram após concentrações críticas de substratos, quando os cultivos foram realizados a 30 e 37,5°C (ver Figura 5.6). Portanto, em fermentações realizadas a 30°C em concentrações de nitrogênio e carbono maiores de 0,9 e 28 g L⁻¹, respectivamente, conferindo razões (S_N/S_C) entre ambas maiores que 3%, apresentam o crescimento celular desfavorecido. O mesmo fenômeno foi observado no cultivo a 37,5°C, cujos valores críticos foram aqueles superiores a 0,7g L⁻¹ para a fonte de nitrogênio e 27g L⁻¹ para a fonte de carbono, implicando razões entre ambas maiores que 2,5%. Por outro lado, esse fenômeno inibitório não foi observado para os cultivos a 32,5 e 35°C, conforme apresentado nos perfis de crescimento em função da concentração (ver Figura 5.6), indicando que ambas as temperaturas são as mais favoráveis à produção de PHB.

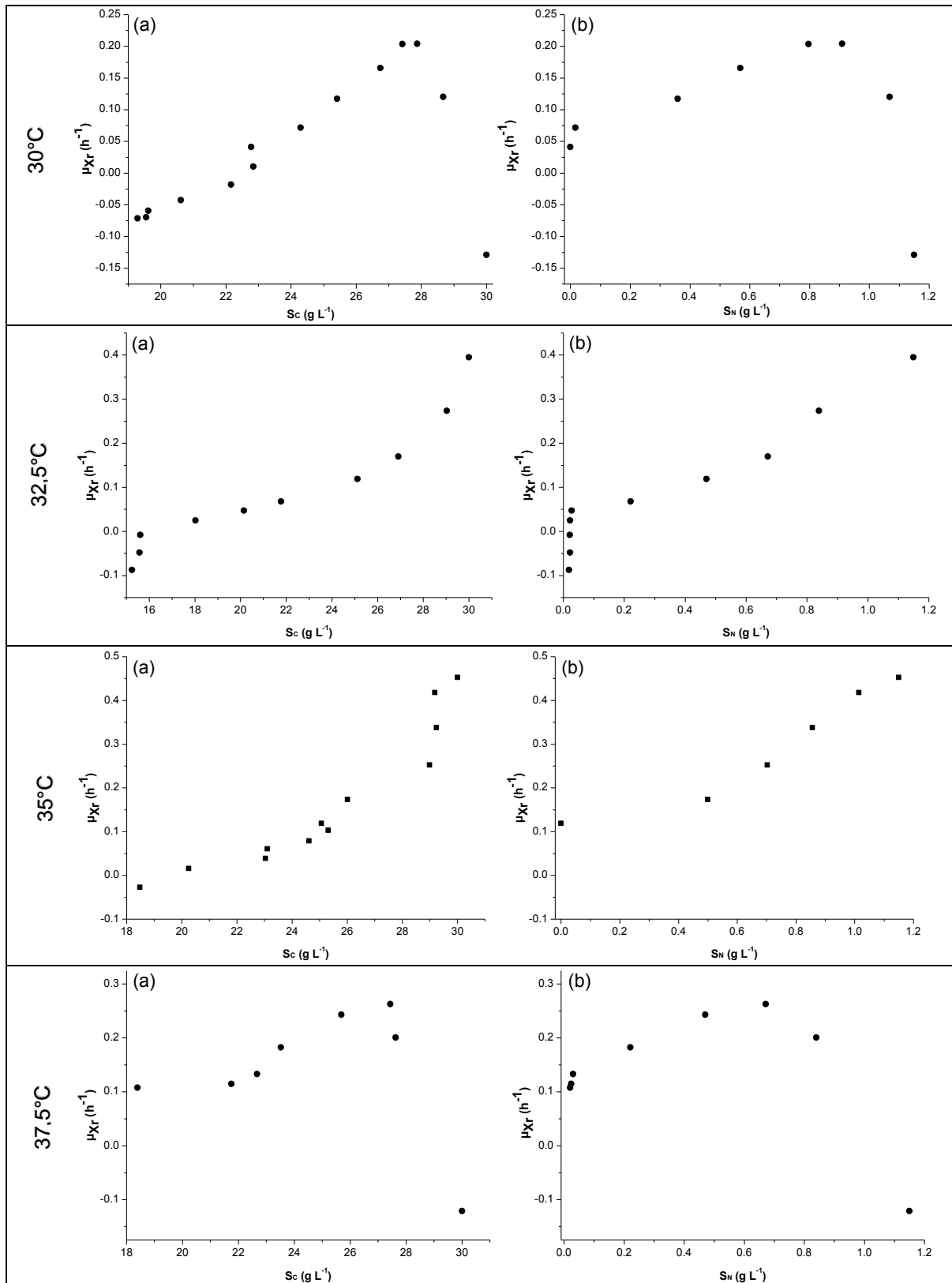


Figura 5.6 – Velocidade específica de crescimento microbiano com relação à: (a) concentração de carbono (S_c); e (b) concentração de nitrogênio (S_N)

5.1.2 Coeficientes de rendimento

Para a determinação dos coeficientes de rendimento de biomassa ($Y_{XR/S}$, $Y_{XR/SC}$ e $Y_{XR/SN}$), foram considerados apenas os dados obtidos durante a primeira fase da reação (fase de crescimento exponencial), de acordo com a Tabela 5.2. Da mesma forma, para os coeficientes de rendimento de produto ($Y_{P/SC}$ e $Y_{XR/P}$), foram considerados apenas os dados obtidos para a segunda fase da reação, a fase de produção de PHB.

Os perfis apresentados nas Figura 5.7 a Figura 5.10 foram utilizados para a determinação preliminar dos parâmetros estequiométricos de acordo com as equações 4.14 a 4.17, cujos resultados estão demonstrados na Tabela 5.4.

Tabela 5.3 – Valores preliminares dos parâmetros estequiométricos

Estequiometria	Temperatura (°C)			
	30,0	32,5	35,0	37,5
$Y_{XR/S}$	0,2851	0,2626	0,3105	0,2807
$Y_{XR/Sc}$	0,3426	0,2908	0,3468	0,3217
$Y_{XR/Sn}$	1,6466	2,5615	2,2476	2,1487
$Y_{P/Sc}$	0,5672	0,5557	0,3506	0,1473
$Y_{XR/P}$	0,1200	0,0205	0,5410	1,5651

A Tabela 5.4 resume os parâmetros estimados conforme Tabela C.1 e Tabela 5.3, sendo que a média dos dados foram utilizados como ponto central do intervalo definido como espaço de busca no procedimento de otimização e estimação de parâmetros.

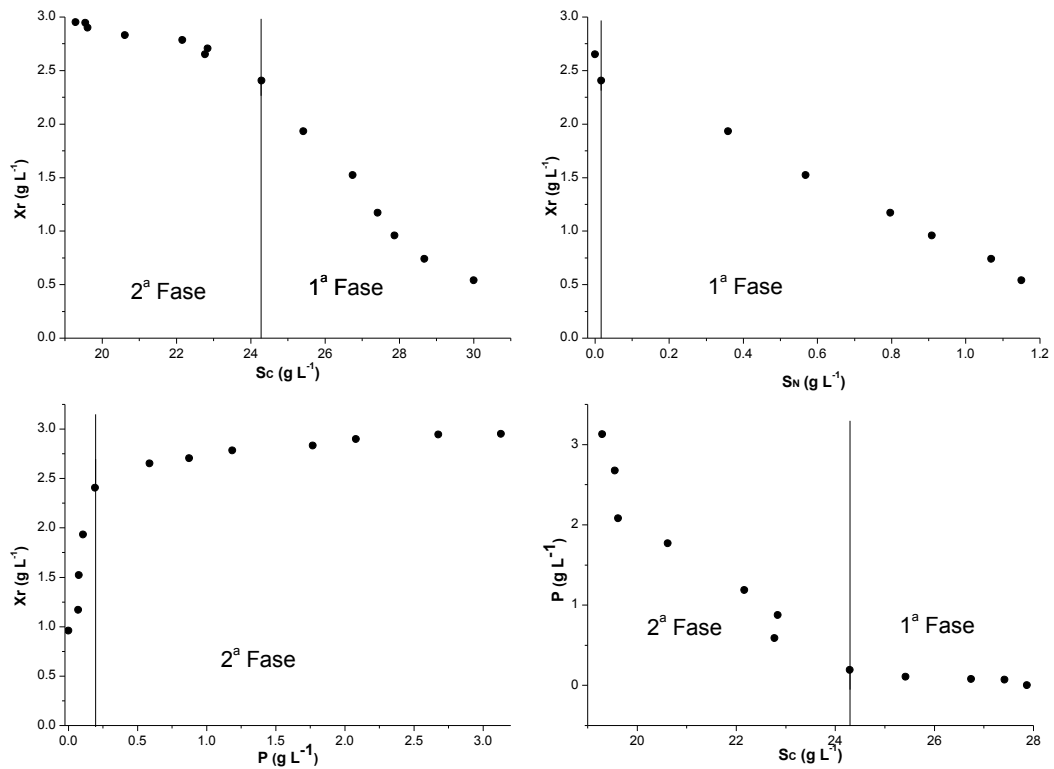


Figura 5.7 – Perfis utilizados para a obtenção dos coeficientes de rendimento à 30°C

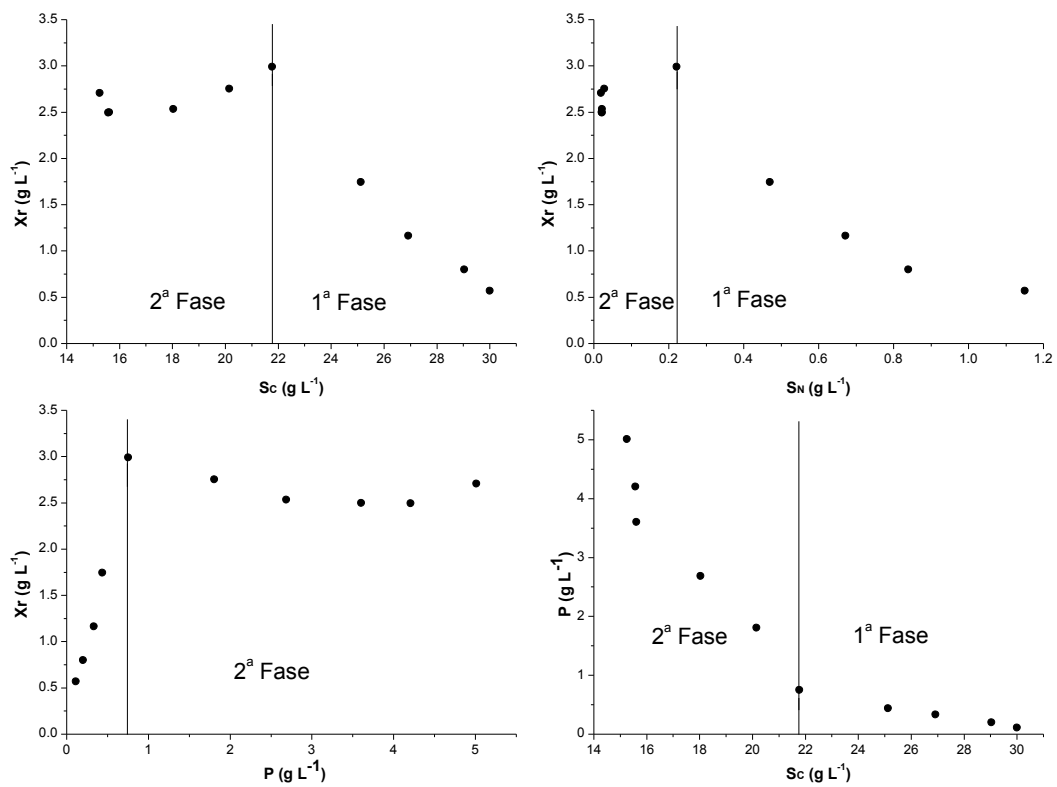


Figura 5.8 – Perfis utilizados para a obtenção dos coeficientes de rendimento à 32,5°C

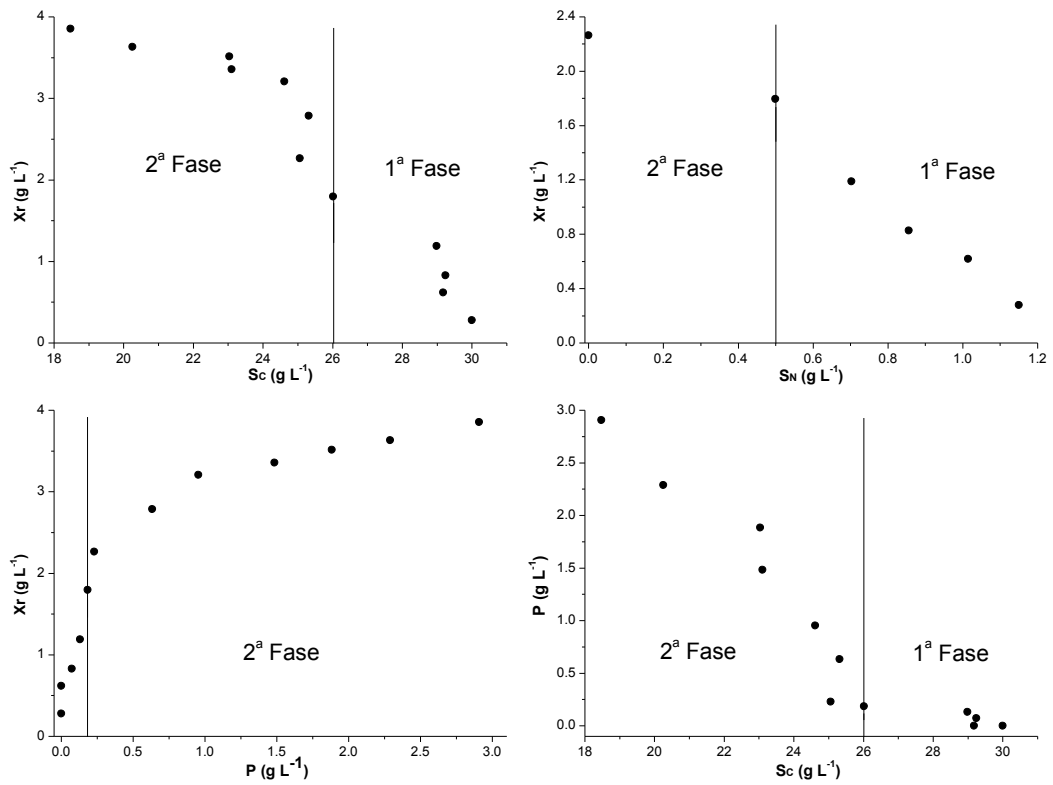


Figura 5.9 – Perfis utilizados para a obtenção dos coeficientes de rendimento à 35°C

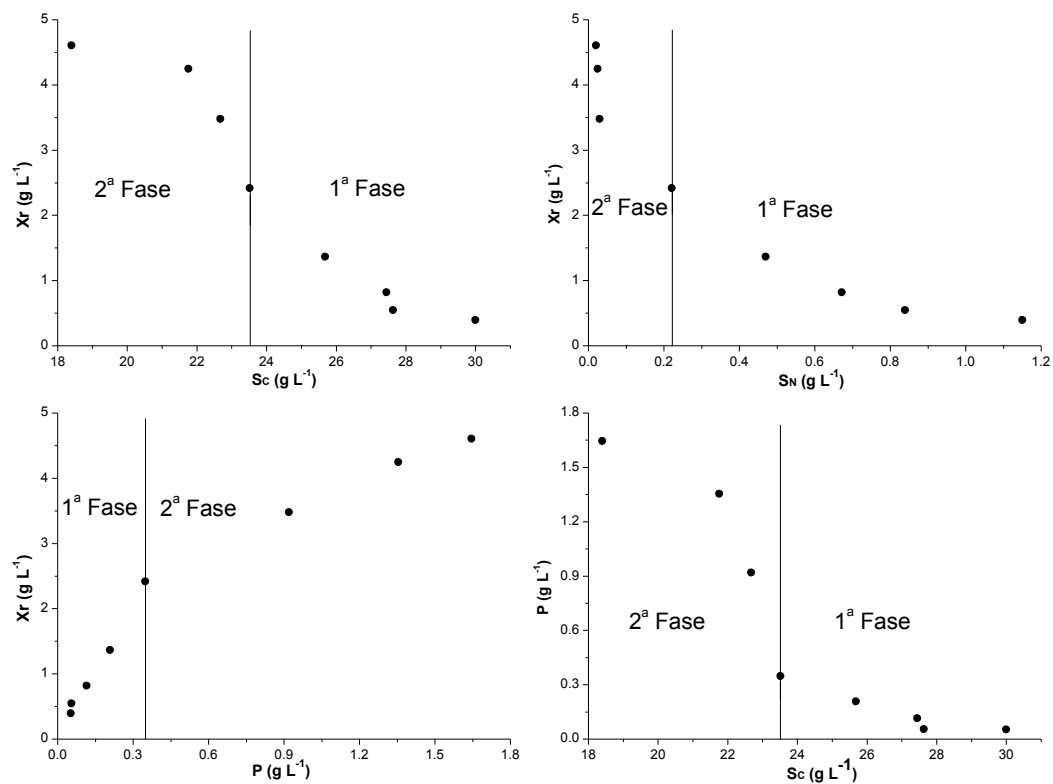


Figura 5.10 – Perfis utilizados para a obtenção dos coeficientes de rendimento à 37,5°C

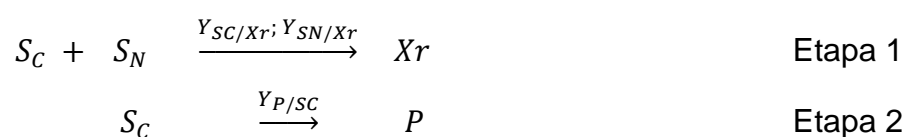
Tabela 5.4 – Estimativa inicial dos parâmetros estequiométricos

Estequiometria		Temperatura (°C)			
		30,0	32,5	35,0	37,5
$Y_{Xr/Sc}$	Tabela 5.1	0,420	0,460	0,450	0,370
	Tabela 5.4	0,3426	0,2908	0,3468	0,3217
	Média	0,381	0,375	0,398	0,346
$Y_{Xr/Sn}$	Tabela 5.1	2,76	3,23	2,76	2,59
	Tabela 5.4	1,6466	2,5615	2,2476	2,1487
	Média	2,203	2,896	2,504	2,369
$Y_{P/Sc}$	Tabela 5.1	0,63	0,77	0,39	0,32
	Tabela 5.4	0,5672	0,5557	0,3506	0,1473
	Média	0,599	0,663	0,370	0,234
$Y_{Xr/P}$	Tabela 5.4	0,1200	0,0205	0,5410	1,5651
$Y_{Xr/S}$	Tabela 5.4	0,2851	0,2626	0,3105	0,2807

5.2 Modelagem matemática do processo de produção de PHB

Assumindo que o processo fermentativo ocorreu em duas fases e partindo do mais adequado sistema simplificado de reações metabólicas descrito pela Proposta 7 (Tabela 4.1), a modelagem matemática da cultivo de *C. necator* e produção de PHB pode ser dada pelas Equações 5.1 a 5.4, conforme hipóteses que seguem.

- ✓ Na fase de crescimento de *C. necator* os substratos carbono e nitrogênio são limitantes do meio balanceado;
- ✓ Na fase de produção de PHB somente o carbono é limitante do meio balanceado, na ausência de nitrogênio.



$$\frac{dS_C}{dt} = -\frac{1}{Y_{Xr/S_C}} \frac{dX_r}{dt} - \frac{1}{Y_{P/S_C}} \frac{dP}{dt} \quad (5.1)$$

$$\frac{dS_N}{dt} = -\frac{1}{Y_{Xr/S_N}} \frac{dX_r}{dt} \quad (5.2)$$

$$\frac{dP}{dt} = -Y_{P/S_C} \frac{dS_C}{dt} \quad (5.3)$$

$$\frac{dX_r}{dt} = \mu_{Xr} X_r \quad (5.4)$$

5.2.1 Cinética de crescimento de *Cupriavidus Necator* em cultivo descontínuo

Reescrevendo o sistema de equações diferenciais em função da taxa de crescimento de *C. necator* (μ_{Xr_C} e μ_{Xr_N}) e da taxa de produção de PHB (μ_P), obtêm-se as Equações 5.5 a 5.8, onde se considerou também as taxas de manutenção celular por ambos os substratos – nitrogênio (m_{SN}) e carbono (m_{SC}) – para a construção do perfil de consumo dos substratos, e a taxa de morte celular (k_d) para construção do perfil de crescimento da biomassa.

$$\frac{dS_C}{dt} = -\left(\frac{\mu_{Xr_C}}{Y_{Xr/S_C}} + \frac{\mu_P}{Y_{P/S_C}} + m_{SC}\right) X_r \quad (5.5)$$

$$\frac{dS_N}{dt} = -\left(\frac{\mu_{Xr_N}}{Y_{Xr/S_N}} + m_{SN}\right) X_r \quad (5.6)$$

$$\frac{dP}{dt} = \mu_P X_r \quad (5.7)$$

$$\frac{dX_r}{dt} = (\mu_{Xr} - k_d) X_r \quad (5.8)$$

Para os modelos de crescimento microbiano que não apresentam uma definição específica para μ_P foi utilizada a Equação 5.9 nas Equações 5.5 e 5.7.

$$\mu_P = \frac{\mu_{Xr_C}}{Y_{Xr/P}} \quad (5.9)$$

A partir da avaliação realizada no item 5.2.1, foi possível inferir que a formação de PHB está parcialmente associada ao crescimento, isto é, na primeira fase ocorre o crescimento de *C. necator* não associado e, na segunda fase ocorre o decréscimo da velocidade específica de crescimento, associada à velocidade

específica de produção de PHB. Assim, o valor de rendimento de biomassa a partir do produto pode ser determinado conforme a Equação 5.10.

$$Y_{Xr/P} = \frac{Y_{Xr/Sc}}{Y_{P/Sc}} \quad (5.10)$$

O sistema de equações diferenciais resultou em sete parâmetros estequiométricos ($Y_{Xr/Sc}$, $Y_{P/Sc}$, m_{SC} , $Y_{Xr/SN}$, m_{SN} , $Y_{Xr/P}$, k_d), dos quais seis são os parâmetros a serem estimados pelo algoritmo de otimização, e um é calculado pela Equação 5.10, conforme descrição dada na Tabela 5.5.

5.2.2 Avaliação dos modelos cinéticos

Os dados experimentais da cinética do cultivo de *C. necator* e produção de PHB em biorreator descontínuo foram utilizados para avaliar cinco modelos que descrevem a taxa de crescimento da biomassa (μ_{X_r}) e um modelo que descreve a taxa de formação do produto (μ_P). A qualificação e a quantificação dos parâmetros cinéticos a serem estimados pelo algoritmo de otimização proposto neste trabalho são apresentados na Tabela 5.5.

Os valores encontrados para os parâmetros estimados pelo algoritmo genético são apresentados nas Tabela 5.6 a Tabela 5.14, cujas simulações são mostradas nas Figura 5.11 a Figura 5.23. A partir de uma análise conjunta das simulações e dos valores obtidos para a função objetivo (FObj) e para o coeficiente de correlação (r^2), pode-se dizer que todos os modelos estudados ajustaram-se bem aos dados experimentais de produção de PHB por *C. necator*, em todas as temperaturas de cultivo.

Tabela 5.5 – Parâmetros cinéticos dos modelos e parâmetros estequiométricos do sistema de EDO's

Nº	Modelo	Número de Parâmetros			Referência	
		Cinético	Estequiométrico	Total		
		Estimado	Estimado	Calculado		
1	$\mu_x = \mu_{maxC} \left(\frac{S_C}{S_C + K_{S_C}} \right) \mu_{maxN} \left(\frac{S_N}{S_N + K_{S_N}} \right)$	4	6	1	11	MONOD (1949)
2	$\mu_x = \mu_{maxC} \left(\frac{S_C}{S_C + K_{S_C} + \frac{S_C^2}{K_{i_C}}} \right) \mu_{maxN} \left(\frac{S_N}{S_N + K_{S_N} + \frac{S_N^2}{K_{i_N}}} \right)$	6	6	1	13	ANDREWS (1968)
3	$\mu_x = \mu_{maxC} \left(\frac{S_C}{S_C + K_{S_C}} \right) \mu_{maxN} \left(\frac{S_N}{S_N + K_{S_N}} \right)$ (MONOD, 1949) $\mu_p = \alpha \mu_x + \frac{\beta_m S}{K_{\beta_s} + S}$	7	6	1	14	LUEDEKING e PIRET (1959)
4	$\mu_x = \mu_{maxC} \frac{S_C}{K_{S_C} + S_C} \mu_{maxN} \frac{(S_N/K_{S_N})^n}{1 + (S_N/K_{S_N})^n}$	5	6	1	12	HEINZLE e LAFFERTY (1980)
5	$\mu_x = \left(\frac{\mu_{maxN} S_N}{S_N + K_{S_N}} \right) \left(\frac{\mu_{maxC} S_C}{S_C + K_{S_C} + \frac{S_C^2}{K_{i_C}}} \right)$	5	6	1	12	DUNN <i>et al.</i> , (1992)

Tabela 5.6 – Parâmetros ajustados pelo modelo de Monod (1949)

		Temperatura (°C)			
		30	32,5	35	37,5
		Parâmetros Estequiométricos			
$Y_{Xr/SC}$	($gX\ gSC^{-1}$)	2,49	4,56	2,10	3,53
$Y_{Xr/SN}$	($gX\ gSN^{-1}$)	14,33	12,64	9,62	8,23
$Y_{P/SC}$	($gP\ gSC^{-1}$)	2,49	2,70	0,49	0,43
$Y_{Xr/P}$	($gX\ gP^{-1}$)	2,47	1,69	4,32	8,22
m_{SC}	($gSC\ gX^{-1}\ h^{-1}$)	0,17	0,39	0,01	0,14
m_{SN}	($gSN\ gX^{-1}\ h^{-1}$)	$4 \cdot 10^{-3}$	0,01	10^{-4}	10^{-4}
k_d	(h^{-1})	10^{-4}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}
		Parâmetros Cinéticos			
μ_{maxC}	(h^{-1})	0,19	0,25	0,38	0,57
KS_C	($g\ L^{-1}$)	7,50	7,19	10,13	13,60
μ_{maxN}	(h^{-1})	2,45	5,25	3,41	3,35
KS_N	($g\ L^{-1}$)	0,91	3,63	1,67	3,41
	$FObj$	0,30	0,24	0,19	0,28
	r^2	0,980	0,975	0,981	0,970

Tabela 5.7 – Parâmetros ajustados pelo modelo de Andrews (1968)

		Temperatura (°C)			
		30	32,5	35	37,5
		Parâmetros Estequiométricos			
$Y_{Xr/SC}$	($gX\ gSC^{-1}$)	1,67	2,15	1,65	1,78
$Y_{Xr/P}$	($gX\ gSN^{-1}$)	2,57	1,30	3,28	4,40
$Y_{P/SC}$	($gP\ gSC^{-1}$)	0,65	1,65	0,50	0,41
m_{SC}	($gX\ gP^{-1}$)	0,15	0,38	0,02	0,15
$Y_{Xr/SN}$	($gSC\ gX^{-1}\ h^{-1}$)	13,43	13,9	13,56	14,42
m_{SN}	($gSN\ gX^{-1}\ h^{-1}$)	10^{-4}	$5 \cdot 10^{-3}$	10^{-7}	10^{-7}
k_d	(h^{-1})	10^{-4}	10^{-7}	10^{-4}	10^{-7}
		Parâmetros Cinéticos			
μ_{maxC}	(h^{-1})	0,71	0,42	0,49	0,89
KS_C	($g\ L^{-1}$)	12,00	6,59	7,51	4,03
Ki_C	($g\ L^{-1}$)	8,09	15,76	24,07	8,58
μ_{maxN}	(h^{-1})	3,74	4,50	3,29	3,12
KS_N	($g\ L^{-1}$)	0,53	1,68	0,77	0,98
Ki_N	($g\ L^{-1}$)	0,66	6,69	15,08	2,43
	$FObj$	0,19	0,19	0,16	0,22
	r^2	0,984	0,977	0,981	0,975

Tabela 5.8 – Valores de K_s/K_i para ambos os substratos para o modelo de Andrews (1968)

Substrato	Temperatura (°C)			
	30	32,5	35	37,5
Carbono	1,48	0,42	0,31	0,47
Nitrogênio	0,80	0,25	0,05	0,40

Tabela 5.9 – Valores da taxa máxima de crescimento específico e concentração crítica dos substratos, carbono e nitrogênio, estimados a partir do modelo de Andrews (1968)

Temperatura (°C)	Carbono		Nitrogênio	
	μ^* (h ⁻¹)	S^* (g L ⁻¹)	μ^* (h ⁻¹)	S^* (g L ⁻¹)
30	0,21	9,85	1,34	0,59
32,5	0,18	10,19	2,25	3,35
35	0,23	13,44	2,27	3,41
37,5	0,37	5,88	1,37	1,54

Tabela 5.10 - Parâmetros ajustados pelo modelo de Luedeking e Piret (1959)

		Temperatura (°C)			
		30	32,5	35	37,5
		Parâmetros Estequiométricos			
$Y_{Xr/Sc}$	(gX gSC ⁻¹)	0,68	1,53	0,94	0,91
$Y_{Xr/P}$	(gX gSN ⁻¹)	0,60	3,05	0,37	0,27
$Y_{P/Sc}$	(gP gSC ⁻¹)	1,14	0,50	2,56	3,36
m_{Sc}	(gX gP ⁻¹)	5.10-3	0,19	0,02	0,06
$Y_{Xr/SN}$	(gSC gX ⁻¹ h ⁻¹)	11,78	16,38	11,77	10,96
m_{SN}	(gSN gX ⁻¹ h ⁻¹)	10 ⁻⁴	0,01	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
k_d	(h ⁻¹)	10 ⁻⁷	10 ⁻⁴	10 ⁻⁷	10 ⁻⁴
		Parâmetros Cinéticos			
μ_{maxC}	(h ⁻¹)	0,33	0,19	0,41	0,29
K_{Sc}	(g L ⁻¹)	27,44	8,11	24,38	1,71
μ_{maxN}	(h ⁻¹)	2,64	3,20	1,58	1,41
K_{SN}	(g L ⁻¹)	1,14	1,23	0,1	0,51
α	(-)	0,28	0,72	0,20	0,13
β	(h ⁻¹)	0,03	0,01	0,06	0,01
$K_{\beta S}$	(g L ⁻¹)	22,36	0,11	53,07	2,35
$FObj$		0,30	0,22	0,19	0,25
r^2		0,981	0,978	0,978	0,973

Tabela 5.11 – Parâmetros ajustados pelo modelo de Heinzle e Lafferty (1980)

		Temperatura (°C)			
		30	32,5	35	37,5
		Parâmetros Estequiométricos			
$Y_{Xr/Sc}$	$(gX gSC^{-1})$	1,83	2,15	1,98	1,22
$Y_{Xr/SN}$	$(gX gSN^{-1})$	7,12	11,18	13,14	12,16
$Y_{P/Sc}$	$(gP gSC^{-1})$	0,41	1,31	0,52	0,20
$Y_{Xr/P}$	$(gX gP^{-1})$	4,48	1,65	3,86	6,22
m_{Sc}	$(gSC gX^{-1} h^{-1})$	0,01	0,34	0,01	8.10^{-3}
m_{SN}	$(gSN gX^{-1} h^{-1})$	10^{-4}	0,01	10^{-4}	4.10^{-4}
k_d	(h^{-1})	10^{-7}	3.10^{-4}	10^{-4}	10^{-7}
		Parâmetros Cinéticos			
μ_{maxC}	(h^{-1})	0,39	0,27	0,28	0,29
K_{Sc}	$(g L^{-1})$	11,04	11,58	5,12	1,44
μ_{maxN}	(h^{-1})	1,64	5,19	2,64	3,98
K_{SN}	$(g L^{-1})$	1,33	3,46	0,86	3,81
n	$(-)$	0,82	1,01	1,68	0,86
	$FObj$	0,27	0,26	0,32	0,29
	r^2	0,982	0,973	0,982	0,976

Tabela 5.12 – Parâmetros ajustados pelo modelo de Dunn *et al.* (1992)

		Temperatura (°C)			
		30	32,5	35	37,5
		Parâmetros Cinéticos			
$Y_{Xr/Sc}$	$(gX gSC^{-1})$	2,89	3,01	1,29	2,78
$Y_{Xr/SN}$	$(gX gSN^{-1})$	14,90	9,86	15,45	12,04
$Y_{P/Sc}$	$(gP gSC^{-1})$	1,15	1,25	0,46	0,48
$Y_{Xr/P}$	$(gX gP^{-1})$	2,51	2,40	2,82	5,83
m_{Sc}	$(gSC gX^{-1} h^{-1})$	0,20	0,30	4.10^{-3}	0,10
m_{SN}	$(gSN gX^{-1} h^{-1})$	10^{-7}	0,01	7.10^{-4}	3.10^{-4}
k_d	(h^{-1})	10^{-4}	10^{-7}	4.10^{-4}	10^{-7}
		Parâmetros Estequiométricos			
μ_{maxC}	(h^{-1})	0,92	0,93	0,51	1,65
K_{Sc}	$(g L^{-1})$	1,22	6,86	5,55	12,49
Ki_C	$(g L^{-1})$	5,09	11,17	16,10	5,82
μ_{maxN}	(h^{-1})	2,19	2,69	2,09	2,50
K_{SN}	$(g L^{-1})$	0,52	1,95	0,10	1,35
	$FObj$	0,19	0,19	0,17	0,24
	r^2	0,985	0,979	0,979	0,976

Tabela 5.13 – Valores de K_s/K_i para o modelo de Dunn *et al.* (1992)

	Temperatura (°C)			
Substrato	30	32,5	35	37,5
Carbono	0,24	0,61	0,34	2,15

Tabela 5.14 – Valores da taxa máxima de crescimento específico e concentração crítica do substrato carbono, estimados a partir do modelo de Dunn *et al.* (1992)

	Carbono	
Temperatura (°C)	μ^* (h ⁻¹)	S^* (g L ⁻¹)
30	0,46	2,49
32,5	0,36	8,75
35	0,23	9,45
37,5	0,42	8,53

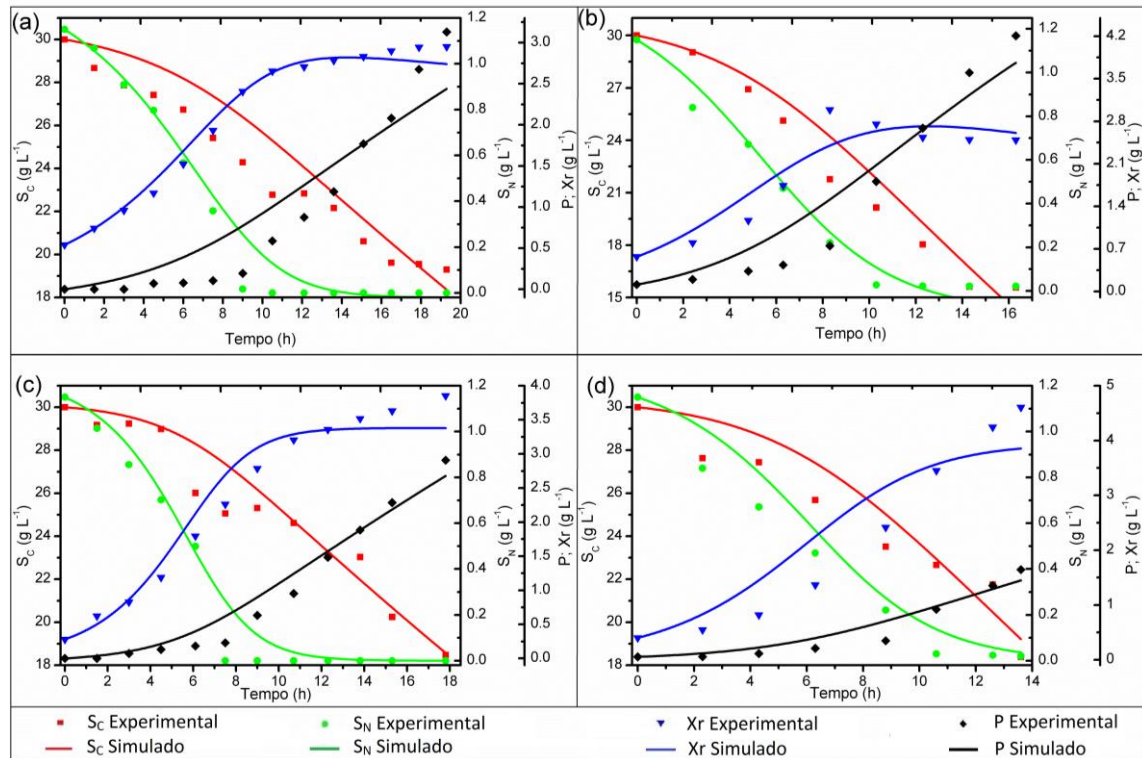


Figura 5.11 – Simulação do modelo de Monod (1949) aplicado aos dados experimentais: (a) 30 °C; (b) 32,5 °C; (c) 35 °C; e (d) 37,5 °C

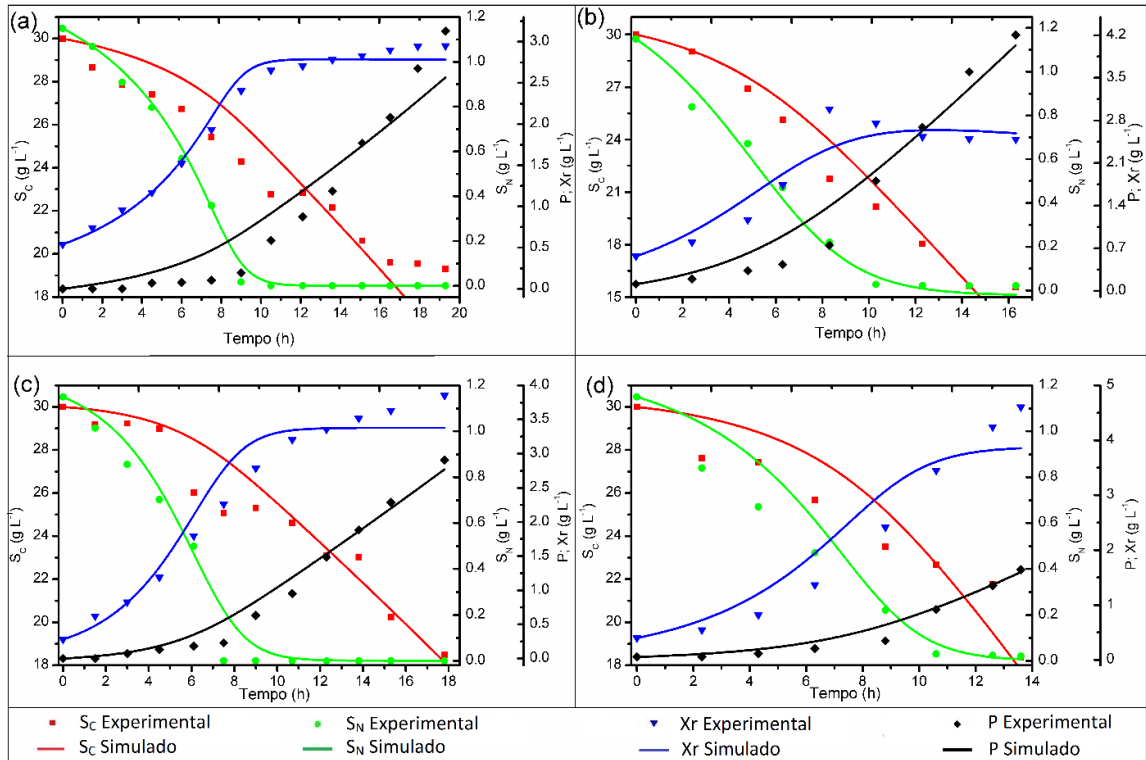


Figura 5.12 – Simulação do modelo de Andrews (1968) aplicado aos dados experimentais: (a) 30 °C; (b) 32,5 °C; (c) 35 °C; e (d) 37,5 °C

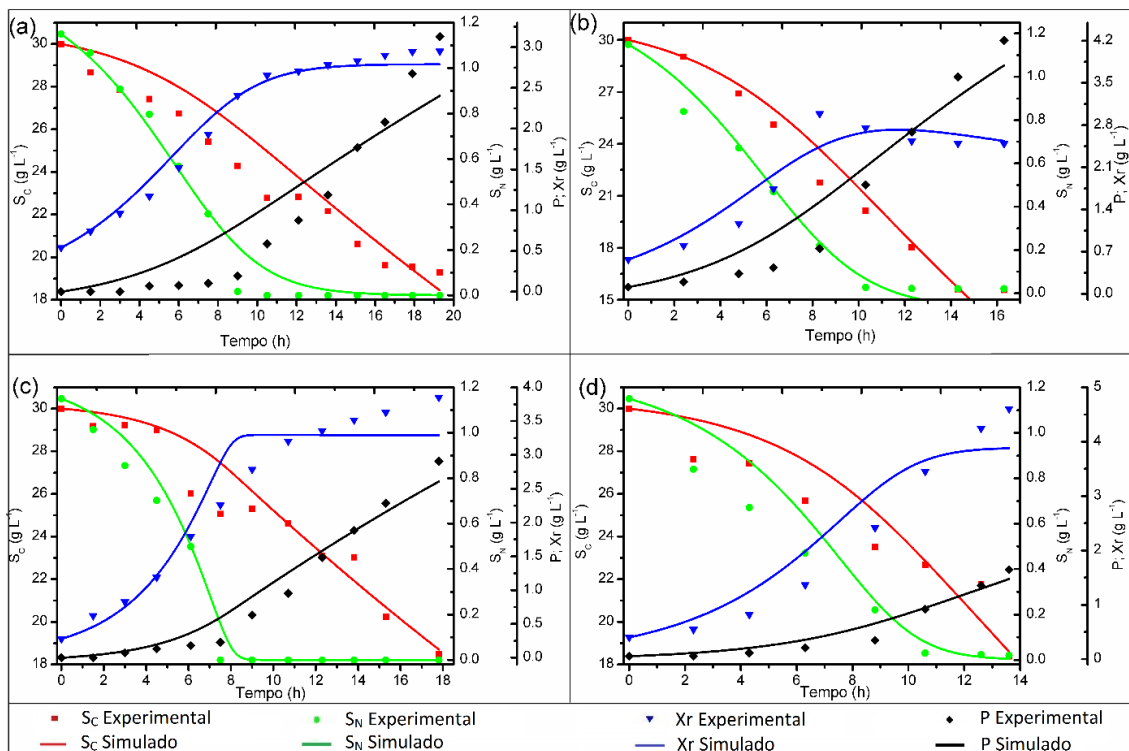


Figura 5.13 – Simulação do modelo de Luedeking e Piret (1959) aplicado aos dados experimentais: (a) 30 °C; (b) 32,5 °C; (c) 35 °C; e (d) 37,5 °C

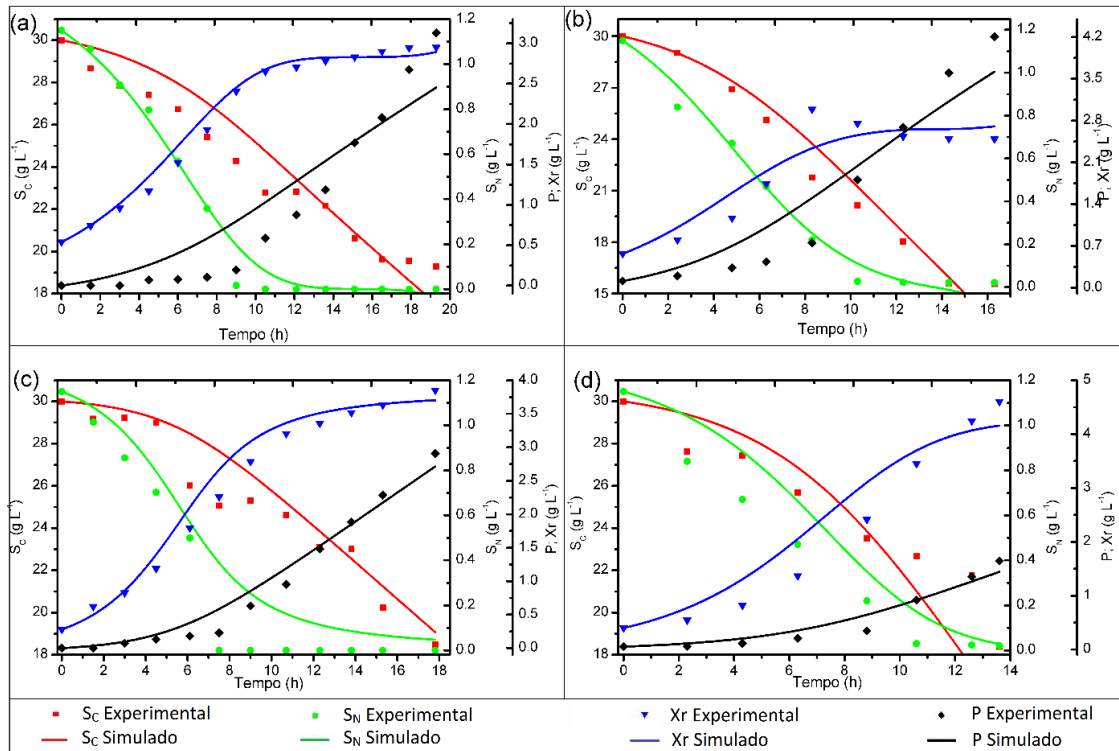


Figura 5.14 – Simulação do modelo de Heinze e Lafferty (1980) aplicado aos dados experimentais: (a) 30°C; (b) 32,5 °C; (c) 35 °C; e (d) 37,5 °C

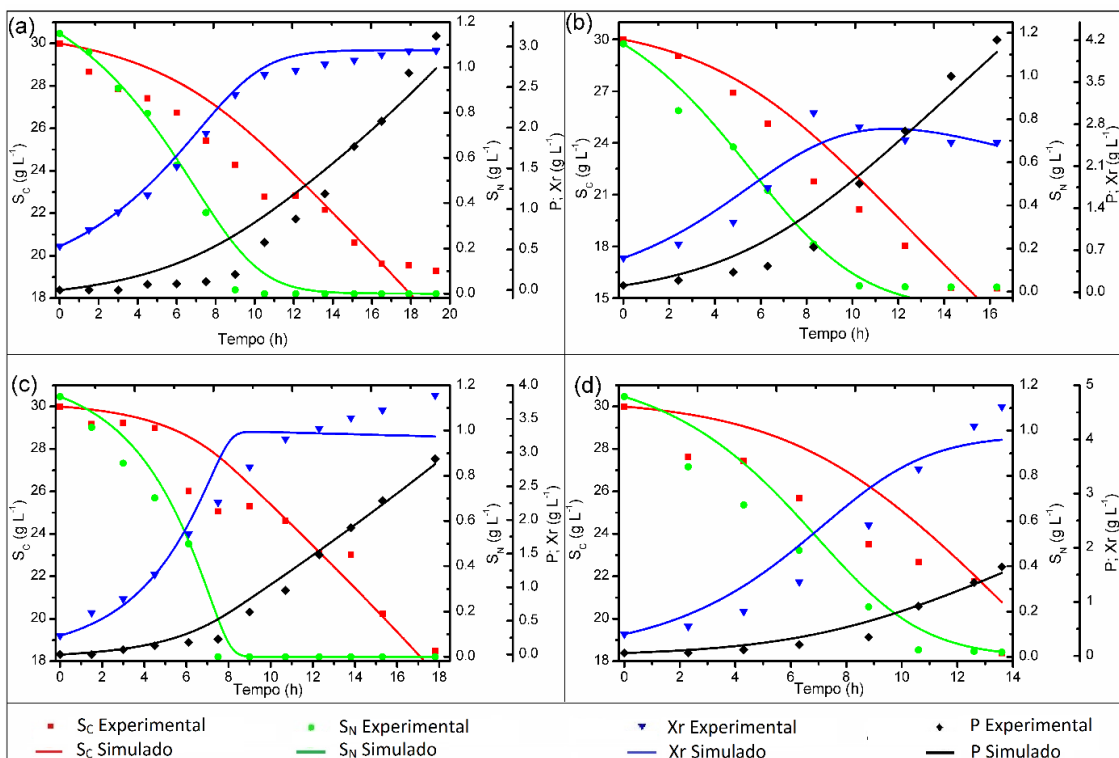


Figura 5.15 – Simulação do modelo de Dunn *et al.* (1992) aplicado aos dados experimentais de: (a) 30 °C; (b) 32,5 °C; (c) 35 °C; e (d) 37,5 °C

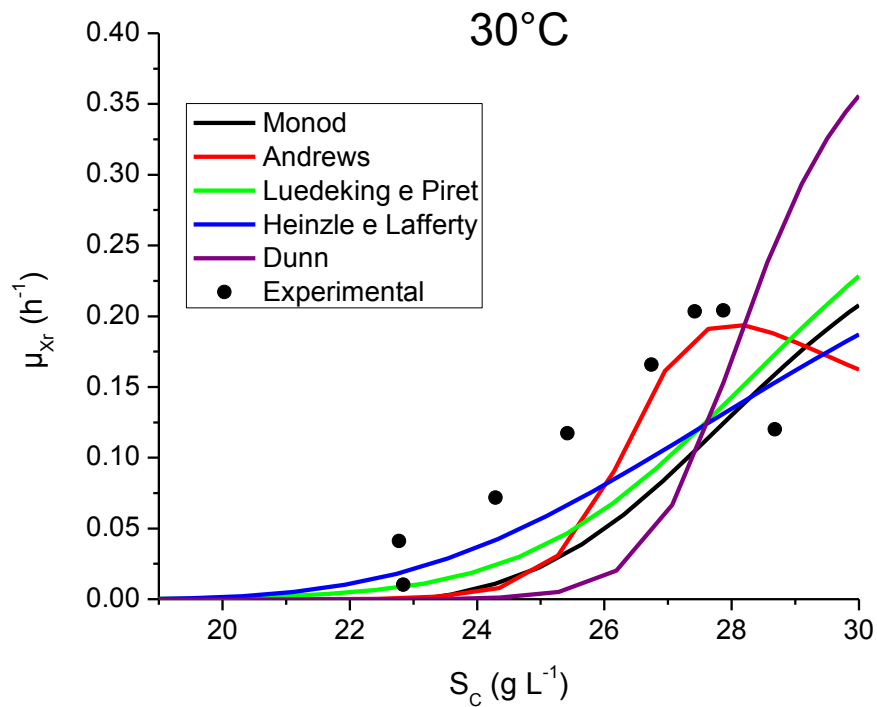


Figura 5.16 – Velocidades específicas calculadas a partir dos modelos avaliados em função da concentração da fonte de carbono, para a temperatura de 30°C

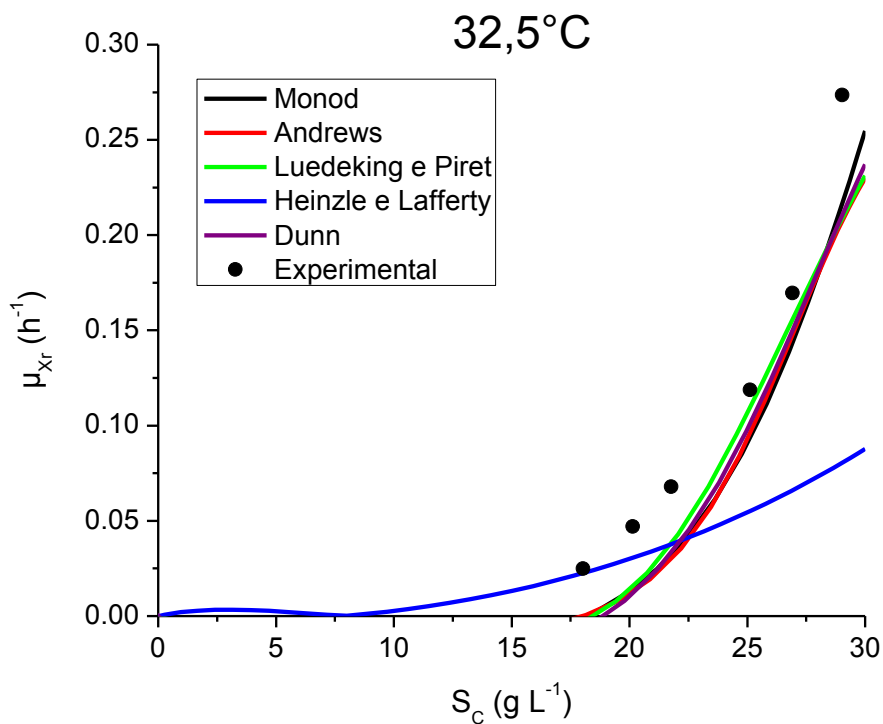


Figura 5.17 – Velocidades específicas calculadas a partir dos modelos avaliados em função da concentração da fonte de carbono, para a temperatura de 32,5°C

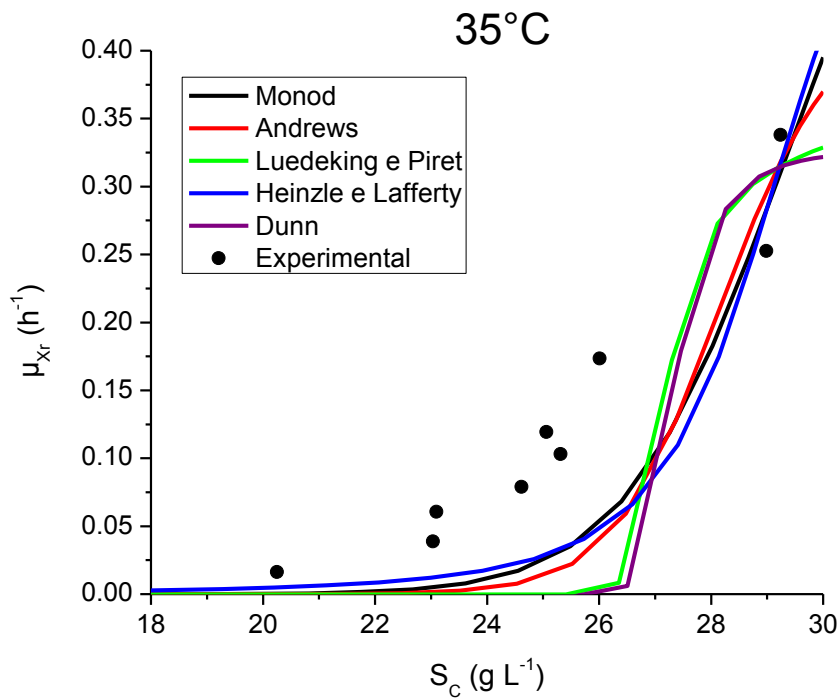


Figura 5.18 – Velocidades específicas calculadas a partir dos modelos avaliados em função da concentração da fonte de carbono, para a temperatura de 35°C

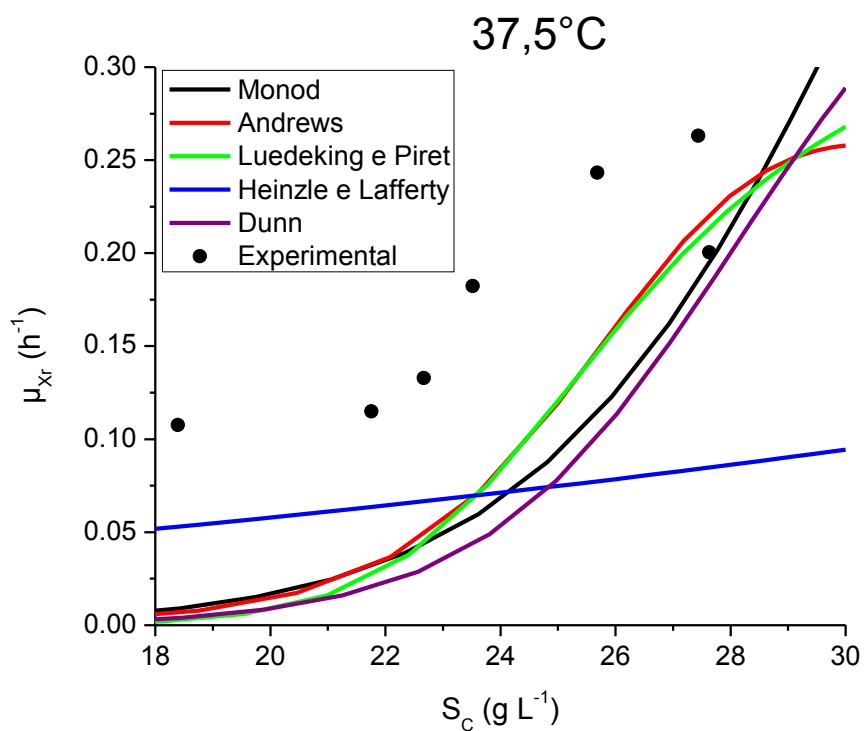


Figura 5.19 – Velocidades específicas calculadas a partir dos modelos avaliados em função da concentração da fonte de carbono, para a temperatura de 37,5°C

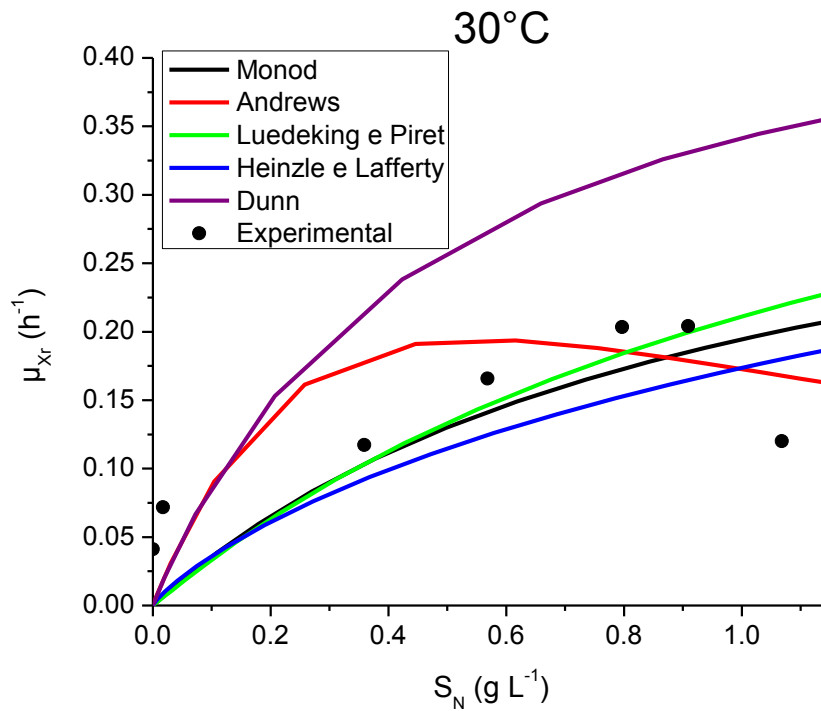


Figura 5.20 – Velocidades específicas calculadas a partir dos modelos avaliados em função da concentração da fonte de nitrogênio, para a temperatura de 30°C

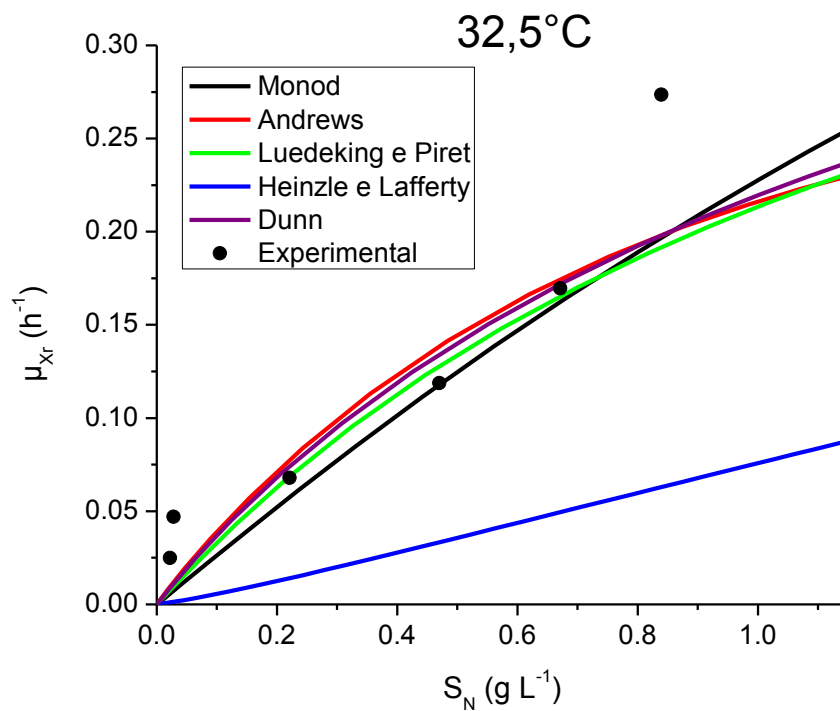


Figura 5.21 – Velocidades específicas calculadas a partir dos modelos avaliados em função da concentração da fonte de nitrogênio, para a temperatura de 32,5°C

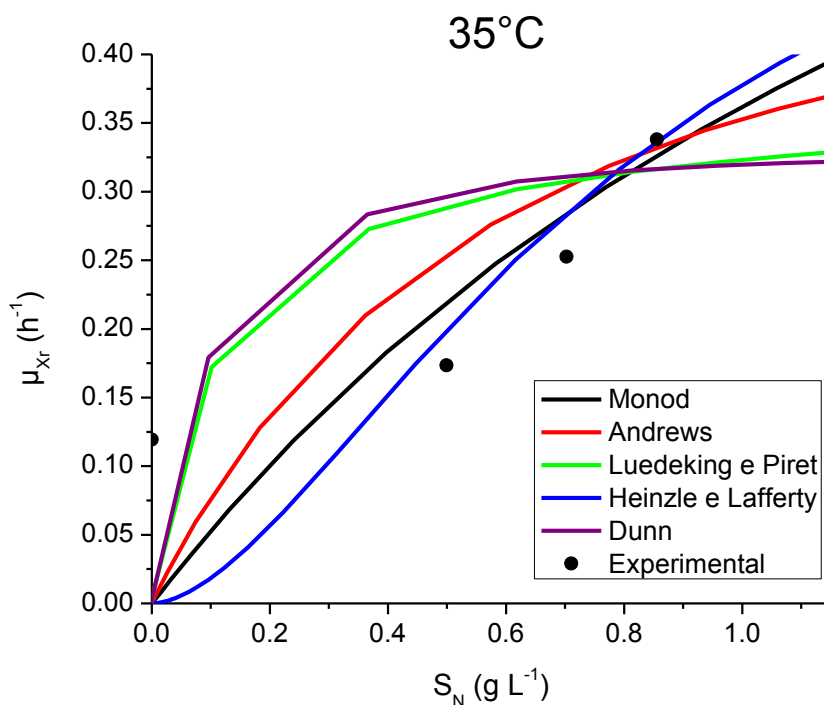


Figura 5.22 – Velocidades específicas calculadas a partir dos modelos avaliados em função da concentração da fonte de nitrogênio, para a temperatura de 35°C

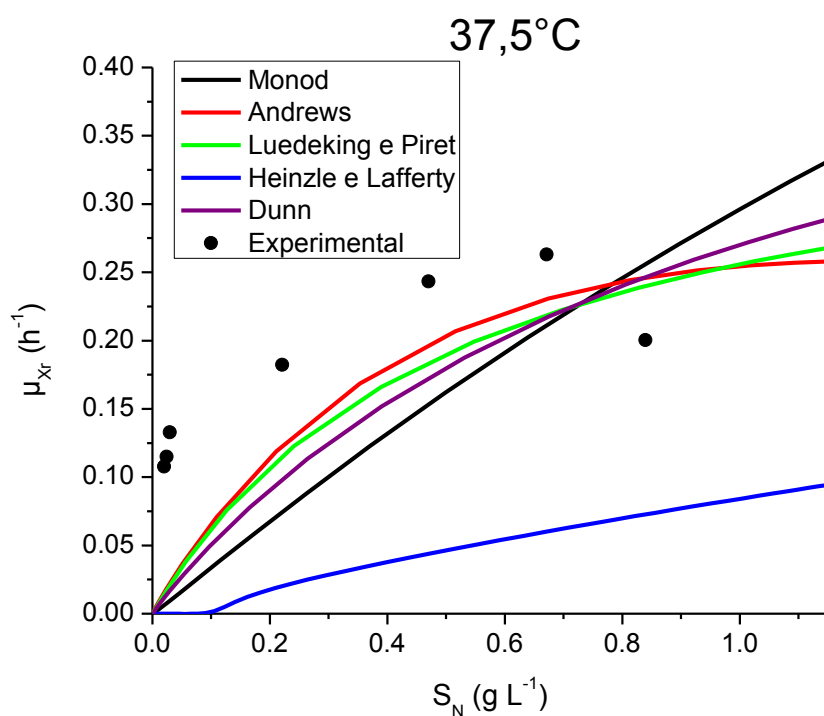


Figura 5.23 – Velocidades específicas calculadas a partir dos modelos avaliados em função da concentração da fonte de nitrogênio, para a temperatura de 37,5°C

A constante de saturação K_S do modelo de Monod (1949) é definida como a concentração de substrato no qual μ_{X_r} é igual à metade de $\mu_{máx}$. Quanto menor o valor de K_S , maior será a afinidade entre o microrganismo e o substrato, e, portanto maior será o seu rendimento em biomassa $Y_{X_r/S}$. Analisando os resultados obtidos a partir dos cinco modelos, verifica-se que a taxa máxima de crescimento específico $\mu_{máxN}$ foi maior que $\mu_{máxC}$, em todas as temperaturas de operação, e, portanto forneceu os mais baixos valores de K_S indicando a grande afinidade da *C. necator* pela fonte de nitrogênio. Isso mostra a importância da fonte de nitrogênio na primeira fase de produção de PHB, a qual se refere essencialmente à etapa de crescimento celular, que se quantifica pelos maiores valores de Y_{X_r/S_N} obtidos em relação à Y_{X_r/S_C} . Este comportamento também indica que se a etapa de exaustão de nitrogênio não ocorresse, o crescimento celular seria mantido.

Com relação às temperaturas estudadas, a taxa máxima de crescimento específico $\mu_{máxN}$ foi maior para 32,5°C, concordando com o padrão visualizado nos dados experimentais. Entretanto, se determinada concentração de substrato inibir o crescimento celular, não será possível observar um $\mu_{máx}$ real e, portanto, K_S assumirá um significado hipotético. O modelo de Andrews (1968), o qual se aplica em casos de inibição pelo substrato, apresenta o parâmetro cinético K_i , cujo valor indica o efeito inibitório do substrato.

É importante dizer que quando o valor do parâmetro K_i é muito elevado, a equação de Andrews (1968) assume a forma da equação de Monod (1949), perdendo o sentido de sua aplicação, já que Monod (1949) expressa um sistema de limitação e não inibição pelo substrato. Esse comportamento não foi verificado durante o ajuste aos modelos de Andrews (1968) e Dunn (1992), na medida em que os valores da constante de inibição K_i apresentaram-se adequados para ambos os substratos.

Pela análise dos dados experimentais (ver tópico 5.2.1 – velocidades específicas) verificou-se que o fenômeno de inibição pelo substrato ocorreu durante os cultivos realizados à temperatura de 30 e 37,5 °C. A taxa máxima de crescimento específico real em substratos cuja concentração encontra-se em valores inibitórios deve ser estimada a partir do ponto crítico da primeira derivada da equação de Andrews (1968). Assim, determinou-se a concentração crítica dos substratos e, a

taxa máxima de crescimento específico de *C. necator*, a partir das Equações 5.11 e 5.12, respectivamente. Os valores obtidos são apresentados na Tabela 5.9, para o modelo de Andrews (1968) e na Tabela 5.15 para o modelo de Dunn *et al.* (1992).

$$S^* = \sqrt{K_s K_i} \quad (5.11)$$

$$\mu^* = \frac{\mu_{max}}{\frac{2\sqrt{K_s K_i}}{K_i} + 1} = \frac{\mu_{max}}{2\sqrt{\frac{K_s}{K_i}} + 1} \quad (5.12)$$

Para um sistema em que ocorre inibição pela concentração de substrato, esse efeito deve ser quantificado pela razão entre as constantes de saturação e inibição do modelo de Andrews (1968), e não somente pelo valor de K_i . As razões de $\frac{K_s}{K_i}$ para ambos os substratos, carbono e nitrogênio, são apresentados na Tabela 5.8, para o modelo de Andrews (1968), e apenas para o carbono, na Tabela 5.14, para o modelo de Dunn *et al.* (1992), mostrando que a concentração de carbono representou o maior efeito inibitório do crescimento celular. Em relação às temperaturas analisadas, este efeito mostrou-se maior para 30 e 37,5 °C. Este comportamento foi observado também pelos dados experimentais, conforme visto na Figura 5.6.

O modelo de produção de PHB proposto por Luedeking e Piret (1959), supõe que uma parcela da produção está associada ao crescimento celular (α) e uma parcela não está associada (β). Conforme apresentado na Tabela 5.9, a parcela associada à biomassa foi maior que a parcela não associada para todas as temperaturas. Estes valores vão ao encontro do fato que o produto é formado no interior das células, logo, está associado ao crescimento das mesmas.

Os valores encontrados para as constantes de manutenção pela fonte de carbono (m_{S_C}) foram muito maiores que pela fonte de nitrogênio (m_{S_N}) para todos os modelos e temperaturas estudadas. Assim, considerando-se que todos os valores de m_{S_N} ficaram muito próximos de zero, pode-se dizer que apenas o carbono é consumido para a manutenção celular.

De forma análoga, os valores de k_d , ficaram muito próximos de zero, o que mostra pequena parcela de morte das células.

Pelas análises das funções objetivo e coeficiente de correlação (r^2) apresentados nas Tabela 5.6, Tabela 5.7, Tabela 5.11,

Tabela 5.11 e Tabela 5.12, juntamente com as Figura 5.11 a Figura 5.15, pode-se afirmar que todos os modelos se ajustaram bem aos dados experimentais. Porém, para se avaliar qual o modelo que melhor descreve os dados experimentais em cada temperatura, devem ser analisados os resultados dos testes estatísticos, apresentados no tópico 5.3.3.

Os parâmetros foram estimados por meio do método baseado em algoritmo genético implementado no *software* Maple®, utilizando um microcomputador Intel Core i5 (2,5 GHz e 3 MB de memória cache), com 6 GB de memória RAM. Para as otimizações, foi necessário um tempo médio de 3 minutos, aplicando-se 500 indivíduos como população inicial e 20 gerações (ou iterações). Com relação à convergência dos dados, esta ocorreu em geral, com menos de 20 iterações, independente da abrangência dos intervalos de busca.

5.2.3 Avaliação estatística dos parâmetros ajustados

Os resultados apresentados na Tabela 5.15 foram obtidos pelo *software* Maple®, durante o ajuste dos modelos estudados aos dados experimentais e são utilizados para os testes estatísticos. A Tabela 5.16 mostra os graus de liberdade de cada modelo para as temperaturas estudadas.

Tabela 5.15 – Resultados obtidos pelo ajuste dos modelos aos dados experimentais

Modelo	Temperatura (°C)	FO padronizada	FO ordinária	r ²	σ ²
Monod (1949)	30	0,30	28,74	0,980	0,625
	32,5	0,24	17,54	0,975	0,840
	35	0,19	14,50	0,981	0,522
	37,5	0,28	15,72	0,970	0,487
Andrews (1968)	30	0,19	36,98	0,984	0,693
	32,5	0,19	11,79	0,977	0,675
	35	0,16	17,12	0,981	0,491
	37,5	0,22	19,50	0,975	0,576
Luedeking e Piret (1959)	30	0,30	22,45	0,981	0,561
	32,5	0,22	13,24	0,978	0,782
	35	0,19	16,07	0,978	0,382
	37,5	0,25	16,74	0,973	0,476
Heinzle e Lafferty (1980)	30	0,27	21,92	0,982	0,459
	32,5	0,26	14,02	0,973	0,502
	35	0,32	18,56	0,981	0,530
	37,5	0,29	36,77	0,976	0,715
Dunn <i>et al.</i> (1992)	30	0,19	31,17	0,985	0,975
	32,5	0,19	19,54	0,979	0,881
	35	0,17	19,62	0,979	1,751
	37,5	0,24	31,07	0,976	1,480

Tabela 5.16 – Graus de liberdade dos modelos

Modelo Cinético		Monod (1949)	Andrews (1968)	Luedeking e Piret (1959)	Heinzle e Lafferty (1980)	Dunn <i>et al.</i> , (1992)
Número de Parâmetros Ajustados		10	12	13	11	11
Temperatura (°C)	NE	Graus de Liberdade (GL)				
30	56	46	44	43	45	45
32,5	36	26	24	23	25	25
35	48	38	36	35	37	37
37,5	32	22	20	19	21	21

5.2.3.1 Teste F-modificado

Uma estimativa do erro experimental mínimo foi obtido pela Equação 4.24 e está apresentado na Tabela 5.17.

Tabela 5.17 – Erro experimental estimado pelo teste F-modificado

Modelo	ϵ (%)			
	30°C	32,5°C	35°C	37,5°C
Monod (1949)	6,22	6,65	4,60	6,31
Andrews (1968)	7,21	5,68	5,14	7,37
Luedeking e Piret (1959)	5,68	6,15	5,05	7,01
Heinzle e Lafferty (1980)	5,49	6,07	5,28	9,88
Dunn <i>et al.</i> (1992)	6,55	7,16	5,43	9,08

Conforme Schmidell *et al.* (2001), para que um modelo seja adequado, seu erro deve ser menor que o erro experimental. Como se trata de um processo biológico, os erros são muito grandes, de acordo com Lopes (2007), entre 10 e 15%. Assim, não se pode descartar nenhum modelo, visto que todos apresentaram erros muito menores que o previsto para este tipo de experimento, em todas as temperaturas estudadas.

5.2.3.2 Teste χ^2 de Bartlett

Os resultados obtidos aplicando-se o teste χ^2 de Bartlett aos cinco modelos ajustados são apresentados na Tabela 5.18.

Caso $\chi_{calc}^2 < \chi_{tab}^2$, as variâncias dos modelos podem ser consideradas homogêneas. Esse cenário foi verificado para os cinco modelos propostos para o cultivo de *C. necator* em todas as temperaturas estudadas.

Assim, novamente nenhum modelo foi descartado, visto que todos apresentaram variâncias homogêneas.

Tabela 5.18 – Resultados do teste do χ^2 de Bartlett

	Modelo	GL	σ_i^2	χ_{calc}^2	χ_{tab}^2
30°C	Monod (1949)	46	0,625	4,27	11,14
	Andrews (1968)	44	0,840		
	Luedeking e Piret (1959)	43	0,522		
	Heinzle e Lafferty (1980)	45	0,487		
	Dunn <i>et al.</i> (1992)	45	0,693		
32,5°C	Monod (1949)	26	0,675	1,58	11,14
	Andrews (1968)	24	0,491		
	Luedeking e Piret (1959)	23	0,576		
	Heinzle e Lafferty (1980)	25	0,561		
	Dunn <i>et al.</i> (1992)	25	0,782		
35°C	Monod (1949)	38	0,382	1,13	11,14
	Andrews (1968)	36	0,476		
	Luedeking e Piret (1959)	35	0,459		
	Heinzle e Lafferty (1980)	37	0,502		
	Dunn <i>et al.</i> (1992)	37	0,530		
37,5°C	Monod (1949)	22	0,715	5,77	11,14
	Andrews (1968)	20	0,975		
	Luedeking e Piret (1959)	19	0,881		
	Heinzle e Lafferty (1980)	21	1,751		
	Dunn <i>et al.</i> (1992)	21	1,480		

5.2.3.3 Intervalo de confiança da função objetivo ponderada

O intervalo de confiança dos modelos na distribuição χ^2 para interpretação da função objetivo dos mínimos quadrados ponderados é apresentada na Tabela 5.19.

Tabela 5.19 – Intervalo de confiança da função objetivo ponderada

	Modelo	FO(Θ)	Limite Inferior	Limite Superior
30°C	Monod (1949)	109,22	29,16	66,62
	Andrews (1968)	73,86	27,57	64,20
	Luedeking e Piret (1959)	121,63	26,79	62,99
	Heinzle e Lafferty (1980)	110,68	28,37	65,41
	Dunn <i>et al.</i> (1992)	62,58	28,37	65,41
32,5°C	Monod (1949)	23,16	13,84	41,92
	Andrews (1968)	14,54	12,40	39,36
	Luedeking e Piret (1959)	18,12	11,69	38,08
	Heinzle e Lafferty (1980)	29,46	13,12	40,65
	Dunn <i>et al.</i> (1992)	15,08	13,12	40,65
35°C	Monod (1949)	39,67	22,88	56,90
	Andrews (1968)	32,98	21,33	54,44
	Luedeking e Piret (1959)	51,11	20,57	53,20
	Heinzle e Lafferty (1980)	27,81	22,11	55,67
	Dunn <i>et al.</i> (1992)	40,80	22,11	55,67
37,5°C	Monod (1949)	76,27	10,98	36,78
	Andrews (1968)	52,48	9,59	34,17
	Luedeking e Piret (1959)	61,27	8,90	32,85
	Heinzle e Lafferty (1980)	63,63	10,28	35,48
	Dunn <i>et al.</i> (1992)	58,38	10,28	35,48

Os resultados mostram que nenhum modelo se ajustou adequadamente à temperatura de 37,5°C. Para a temperatura de 30°C, apenas o modelo de Dunn *et*

al., (1992) foi adequado. Por outro lado, nenhum modelo pode ser descartado nas temperaturas de 32,5 e 35°C, por apresentarem funções objetivo ordinárias dentro dos limites estabelecidos.

5.2.3.4 Probabilidade absoluta

Os valores da probabilidade de distribuição χ^2 para os modelos ajustados estão apresentados na Tabela 5.20, e mostram que, para as temperaturas de 30 e 37,5°C, nenhum dos modelos se ajustou adequadamente. Para a temperatura de 32,5°C, os modelos de Andrews(1968) e Dunn *et al.* (1992) apresentaram resultados positivos, bem como os modelos de Andrews (1968) e Heinzle e Lafferty (1980) para a temperatura de 35°C.

Tabela 5.20 – Valores da probabilidade absoluta dos modelos

Modelo	Probabilidade Absoluta (%)			
	30°C	32,5°C	35°C	37,5°C
Monod (1949)	0,00	62,40	39,54	0,00
Andrews (1968)	0,00	<u>93,35</u>	<u>61,30</u>	0,00
Luedeking e Piret (1959)	0,00	75,01	3,85	0,00
Heinzle e Lafferty (1980)	0,00	24,51	<u>86,28</u>	0,00
Dunn <i>et al.</i> (1992)	4,24	<u>93,94</u>	30,70	0,00

5.2.3.5 Teste F-Fischer para dois modelos

Como restaram apenas dois modelos adequados para as temperaturas de 32,5 e 35°C, foi aplicado o teste F de Fischer para dois modelos, cujos resultados são apresentados na Tabela 5.21. Para tanto, foram considerados os modelos de Andrews (1968) e Dunn *et al.* (1992) para 32.5°C, e os modelos de Andrews (1968) e Heinzle e Lafferty (1980) para 35°C.

Tabela 5.21 – Valores da distribuição F-Fischer

Temperatura (°C)	F _{F2}	F _{mínimo}	F _{máximo}	p-valor
32,5	0,603	0,443	2,242	0,890
35	0,922	0,516	1,930	0,595

Pelos resultados apresentados na Tabela 5.21, os valores de F_{F2} estão dentro dos limites para as duas temperaturas estudadas, indicando que os dois modelos considerados para cada temperatura são estatisticamente iguais, o que não permite a escolha de apenas um deles como o melhor.

5.2.3.6 Teste de Randomicidade

A randomicidade dos resíduos gerados foi avaliada pela Equação 4.29, cujos resultados são apresentados na Tabela 5.22. De acordo com Schmidell *et al.* (2001), para que os resíduos sejam considerados randômicos, os valores de Z devem estar entre -1,96 e 1,96. Assim, para 30°C apenas o modelo de Dunn *et al.* (1992) pode ser considerado adequado, porém ele já foi descartado por apresentar um valor de probabilidade absoluta muito baixo. O mesmo ocorreu para os modelos de Monod (1949), Andrews (1968), Luedeking e Piret (1959) e Dunn *et al.* (1992) para a temperatura de 37,5°C.

Para 35°C, dos dois modelos ainda considerados satisfatórios pelos demais testes, apenas o de Heinzle e Lafferty (1980) apresentou-se randômico. Assim, pode-se afirmar que esse é o modelo que melhor descreve os dados nessa temperatura.

Para 32,5°C todos os modelos são considerados randômicos, o que impossibilita a escolha de apenas um como melhor.

Tabela 5.22 – Resultados do teste de randomicidade

	Modelo	N ⁺	N ⁻	R	\bar{R}	σ_z	Z
30°C	Monod (1949)	33	19	14	25,12	3,31	-3,36
	Andrews (1968)	31	21	11	26,04	3,44	-4,38
	Luedeking e Piret (1959)	35	17	8	23,88	3,13	-5,07
	Heinzle e Lafferty (1980)	36	16	13	23,15	3,03	-3,35
	Dunn <i>et al.</i> (1992)	45	7	10	13,11	1,62	<u>-1,92</u>
32,5°C	Monod (1949)	23	9	9	13,94	2,23	-2,21
	Andrews (1968)	20	12	11	16,00	2,60	<u>-1,92</u>
	Luedeking e Piret (1959)	23	9	10	13,94	3,56	<u>-1,76</u>
	Heinzle e Lafferty (1980)	21	11	12	15,44	2,50	<u>-1,37</u>
	Dunn <i>et al.</i> (1992)	20	12	12	16,00	2,60	<u>-1,54</u>
35°C	Monod (1949)	33	11	12	17,50	2,44	-2,26
	Andrews (1968)	33	11	12	17,50	2,44	-2,25
	Luedeking e Piret (1959)	28	16	12	21,36	3,03	-3,09
	Heinzle e Lafferty (1980)	38	6	9	11,36	1,50	<u>-1,57</u>
	Dunn <i>et al.</i> (1992)	26	18	9	22,27	3,17	-4,19
37,5°C	Monod (1949)	23	5	8	9,21	1,48	<u>-0,82</u>
	Andrews (1968)	21	7	8	11,50	1,92	<u>-1,82</u>
	Luedeking e Piret (1959)	21	7	9	11,50	1,92	<u>-1,30</u>
	Heinzle e Lafferty (1980)	20	8	7	12,43	2,10	-2,58
	Dunn <i>et al.</i> (1992)	24	4	6	7,86	1,22	<u>-1,52</u>

5.2.3.7 Parâmetro F

Devido à falta de réplicas do mesmo ensaio, foi calculado o valor do parâmetro F, conforme a Equação 4.20, cujos resultados são apresentados na Tabela 5.23. Avaliando-se os modelos de Andrews (1968) e Dunn *et al.* (1992), ainda considerados adequados pelos testes estatísticos para a temperatura de 32,5°C, o maior valor do parâmetro F (F_{calc}) é observado para o modelo de Andrews (1968), o que sugere que este é o modelo que melhor representa os dados a esta temperatura.

Tabela 5.23 – Valores do Parâmetro F dos modelos

Modelo	F_{calc}			
	30°C	32,5°C	35°C	37,5°C
Monod (1949)	5,74	11,18	14,98	6,94
Andrews (1968)	4,26	15,30	11,99	5,06
Luedeking e Piret (1959)	6,86	13,03	12,41	5,58
Heinzle e Lafferty (1980)	7,36	13,42	11,38	2,82
Dunn <i>et al.</i> (1992)	5,18	9,63	10,76	3,34

Como o parâmetro F não possui um embasamento estatístico muito aprofundado, este resultado foi avaliado também pelo teste F de Fischer, para se ter maior certeza sobre sua veracidade.

5.2.3.8 Teste F-Fischer

Para o teste F de Fischer é necessário que se tenha réplicas de um mesmo ensaio. Como os experimentos avaliados foram realizados apenas uma vez, foram considerados erros médios, propostos por Lopes (2007), de 12, 15 e 10% para os substratos, biomassa e produto, respectivamente. Esses erros forneceram os valores estimados para a variância experimental, conforme os resultados apresentados na Tabela 5.24.

Tabela 5.24 – Estimativa da variância experimental

Temperatura (°C)	s_e^2
30	1,75
32,5	0,75
35	1,93
37,5	1,76

Os valores de F_F , obtidos a partir da Equação 4.21, estão apresentados na Tabela 5.25. A partir do teste F-Fisher determinou-se a não adequação do modelo

de Dunn *et al.* (1992) para a temperatura de 32,5°C. Por resultar em $F_F > 1$, o erro desse modelo é maior que o erro experimental (s_e^2).

Tabela 5.25 – Resultados do teste F-Fisher

Modelo	F_F			
	30°C	32,5°C	35°C	37,5°C
Monod (1949)	0,357	0,904	0,198	0,407
Andrews (1968)	0,480	0,659	0,247	0,555
Luedeking e Piret (1959)	0,298	0,772	0,238	0,501
Heinzle e Lafferty (1980)	0,278	0,752	0,260	0,997
Dunn <i>et al.</i> (1992)	0,396	<u>1,048</u>	0,275	0,842

Assim, para a temperatura de 32,5 °C, apenas o modelo de Andrews (1968) pode ser considerado adequado.

5.2.3.8 Considerações finais sobre os modelos estudados

A partir de uma análise conjunta dos valores das funções objetivo, simulações dos modelos e testes estatísticos, conclui-se que:

- i. Nenhum modelo avaliado foi capaz de descrever os dados experimentais obtidos nas temperaturas de 30 e 37,5°C
- ii. O modelo de Andrews (1968) foi o mais adequado dentre os modelos estudados no ajuste dos dados obtidos a 32,5°C. Esse modelo considera que a limitação e inibição por ambos os substratos, carbono e nitrogênio;
- iii. O modelo de Heinzle e Lafferty (1980) melhor descreveu os dados experimentais obtidos na temperatura de 35°C.

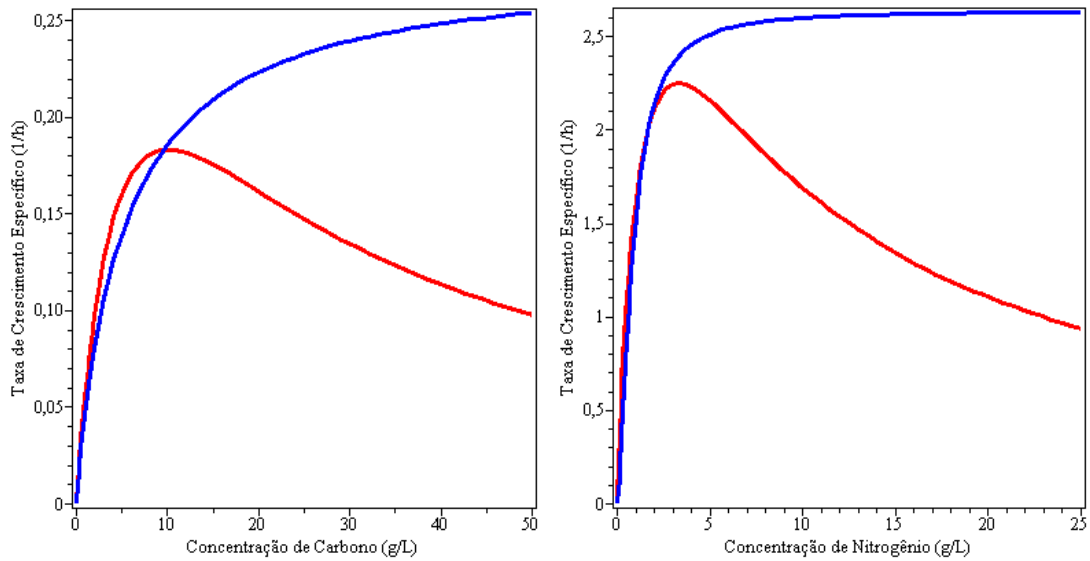


Figura 5.24 – Taxas de crescimento específico para 32,5°C (Andrews, 1968) e para 35°C (Heinzle & Lafferty, 1980)

5.3 Simulação da Transferência de Oxigênio e Respiração Microbiana

Para as análises da transferência de oxigênio e respiração microbiana, foram considerados apenas os dados obtidos na melhor temperatura de cultivo (32,5°C), e os parâmetros obtidos para o modelo de Andrews (1968), por ter sido o modelo de melhor ajuste aos dados experimentais nessa temperatura.

A expressão para a taxa de crescimento específico microbiano μ_{Xr} (Equação 5.13) que resultou das Equações 5.14 e 5.15, segue as considerações:

- Cinética de Monod (1949) para o consumo de oxigênio (Equação 3.23);
- Cinética de Andrews (1968) para o consumo de nitrogênio e carbono (Modelo n.2, Tabela 5.6).

$$\mu_{Xr} = \mu_{Xr_C} \mu_{Xr_N} \quad (5.13)$$

$$\mu_{Xr_C} = \mu_{maxC} \left(\frac{S_C}{S_C + K_{S_C} + \frac{S_C^2}{K_{I_C}}} \right) \left(\frac{C_{ox}}{K_{S_{ox}} + C_{ox}} \right) \quad (5.14)$$

$$\mu_{Xr_N} = \mu_{maxN} \left(\frac{S_N}{S_N + K_{S_N} + \frac{S_N^2}{K_{i_N}}} \right) \left(\frac{C_{ox}}{K_{S_{ox}} + C_{ox}} \right) \quad (5.15)$$

Os balanços de massa para O₂ e CO₂ na fase líquida (Equações 5.16 e 5.17) e na fase gasosa (Equações 5.18 a 5.19) são adicionados ao sistema de equações diferenciais formulado para descrever o processo de produção de PHB em sistema descontínuo (Equações 5.5 a 5.10).

$$\frac{dC_{ox}^L}{dt} = K_{La}^{ox} (C_{ox}^* - C_{ox}^L) - \frac{1}{Y_{ox/c}} \mu_{Xr_c} Xr - \frac{1}{Y_{ox/N}} \mu_{Xr_N} Xr - m_{ox} Xr \quad (5.16)$$

$$\frac{dC_{CO_2}^L}{dt} = K_{La}^{CO_2} (C_{CO_2}^L - C_{CO_2}^*) + \frac{1}{Y_{CO_2/c}} \mu_{Xr_c} Xr + \frac{1}{Y_{CO_2/N}} \mu_{Xr_N} Xr \quad (5.17)$$

$$\frac{dC_{ox}^g}{dt} = -K_{La}^{ox} (C_{ox}^* - C_{ox}^g) \quad (5.18)$$

$$\frac{dC_{CO_2}^g}{dt} = K_{La}^{CO_2} (C_{CO_2}^g - C_{CO_2}^*) \quad (5.19)$$

Os valores dos parâmetros de transferência de oxigênio e respiração microbiana foram obtidos pelo algoritmo genético implementado no *software* Maple®.

Os parâmetros estequiométricos para o O₂ e CO₂ (Y_{ox/c}, Y_{ox/N}, Y_{co2/c}, Y_{co2/N}) foram estimados pelo algoritmo AG, cujos intervalos de busca foram definidos conforme dados da literatura.

A constante de saturação de oxigênio K_{s_{ox}} foi estimada em um intervalo muito abaixo da concentração crítica de oxigênio (C_{crit}), o qual esteve cerca de 20% da concentração de saturação do oxigênio (C*_{ox}) no meio de cultivo.

A concentração de saturação do oxigênio (C*_{ox}) no meio de cultivo foi estimada entre 6,5 a 7,6 mgL⁻¹, o que corresponde a cerca de 10 a 15% menor que a concentração de saturação do oxigênio em água.

O valor de K_{La} para O_2 foi definido a partir da estimativa preliminar encontrada por regressão linear (Equação 4.7), e o valor de K_{La} para o CO_2 foi estimado em valores cerca de 75% de K_{La} para O_2 .

A concentração inicial de O_2 foi de 99,5% da concentração de saturação de oxigênio (C^*_{ox}) no meio de cultivo, conforme o método dinâmico de análise de O_2 dissolvido.

A estimação dos parâmetros de transferência de oxigênio e respiração microbiana resultou os perfis de crescimento microbiano, consumo de substratos e produção de PHB, conforme a Figura 5.25. Os perfis de CO_2 e O_2 dissolvido são apresentados na Figura 5.26, e CO_2 e O_2 em ambas as fases estão na Figura 5.27.

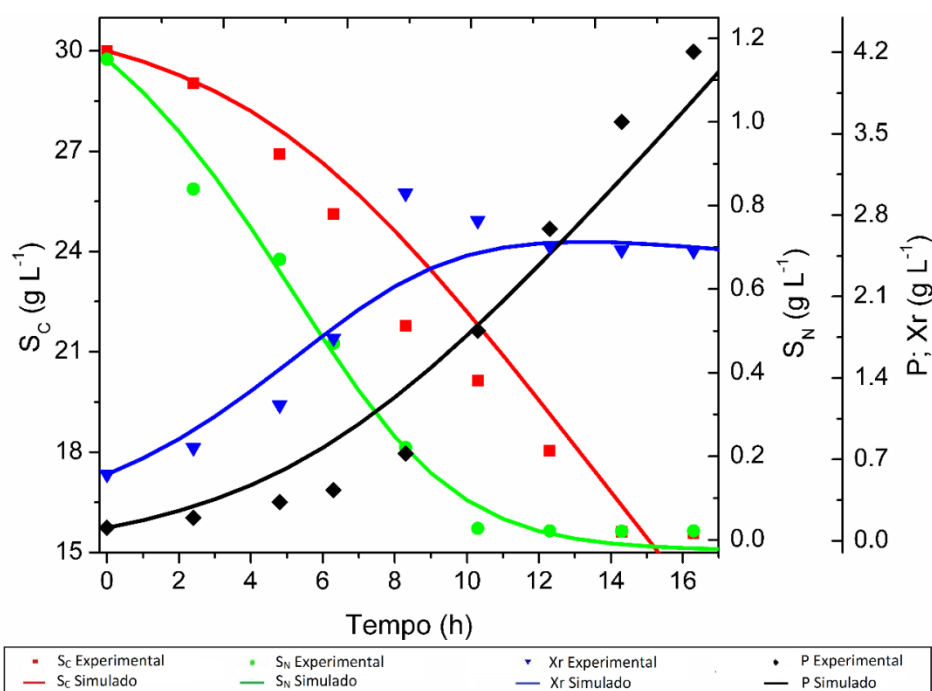


Figura 5.25 – Simulação do modelo de Andrews (1968) aplicado aos dados experimentais a temperatura de 32,5°C considerando-se a transferência e consumo de oxigênio

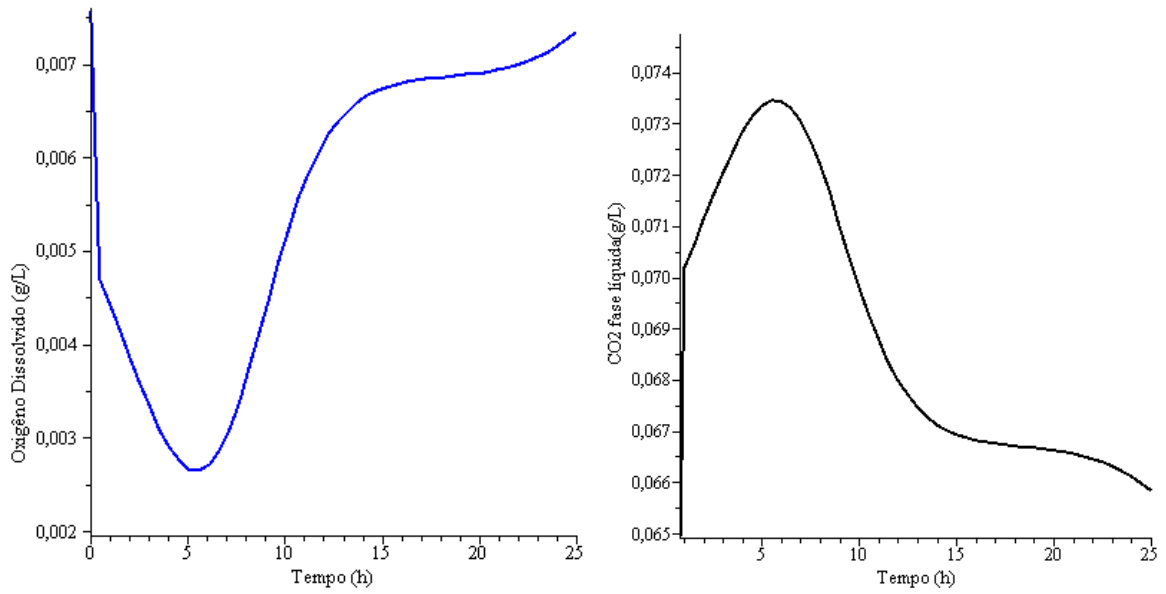


Figura 5.26 – Simulações da respiração microbiana: (A) O₂ dissolvido e (B) CO₂ dissolvido

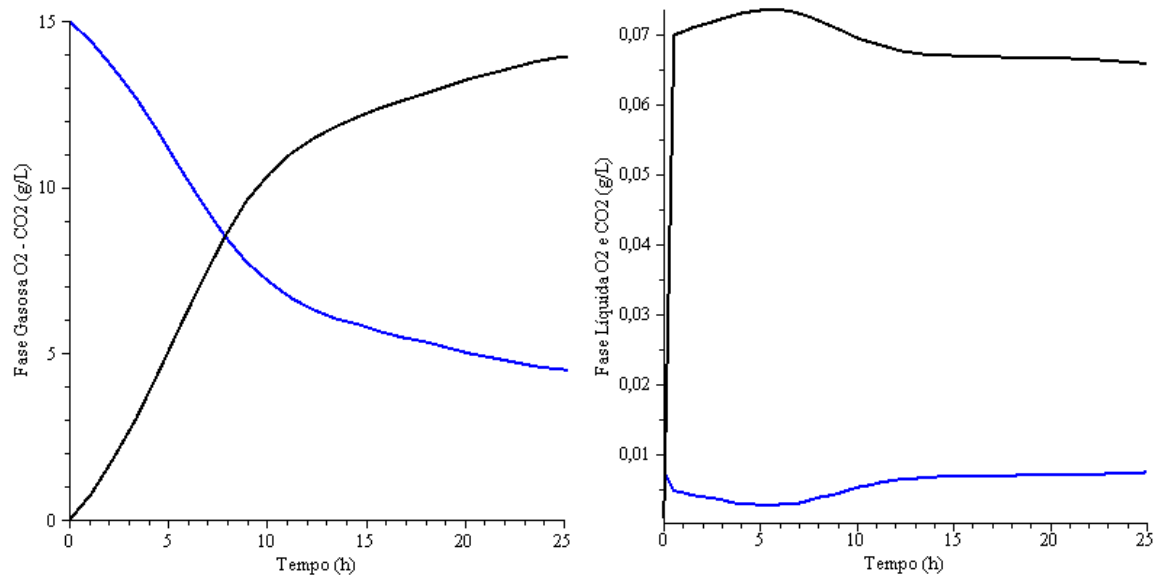


Figura 5.27 – Simulações da respiração microbiana: (A) O₂ e CO₂ na fase gasosa e (B) líquida

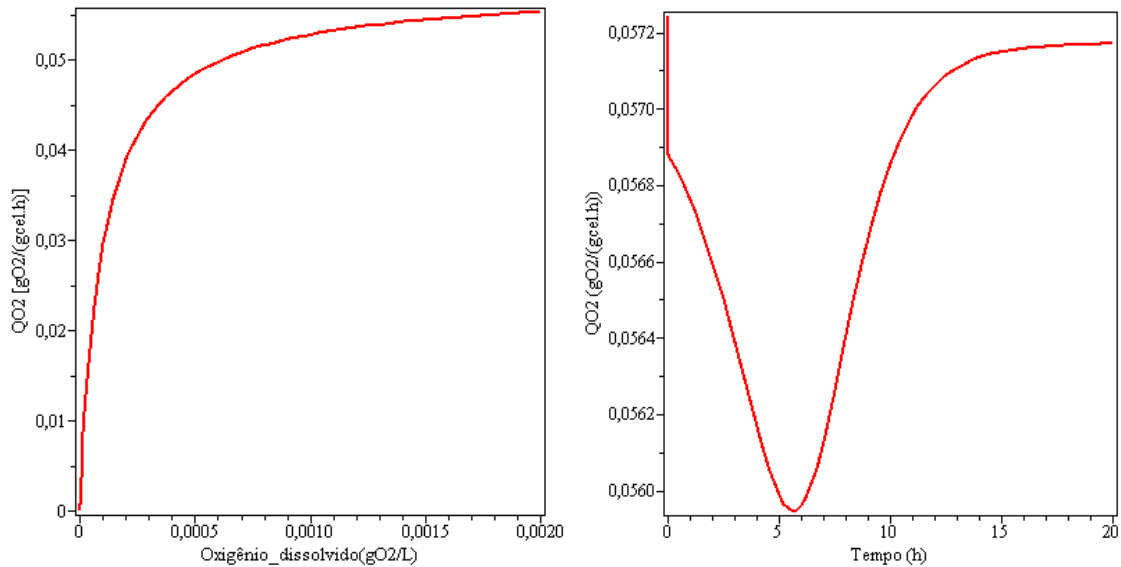


Figura 5.28 – Perfil de consumo de O₂ (A) em função de O₂ dissolvido e (B) ao longo do tempo

São apresentados na Tabela 5.26 os valores dos parâmetros estimados para a transferência e consumo de oxigênio, bem como parâmetros fixos do modelo de Andrews (1968).

A simulação do comportamento de O₂ dissolvido mostra que a concentração não atingiu o valor crítico ($< 0,002 \text{ gO}_2\text{L}^{-1}$) que compromete o metabolismo celular.

A taxa máxima de respiração microbiana ocorreu a $0,058 \text{ gO}_2 \text{ gcel}^{-1}\text{h}^{-1}$, conforme verifica-se nos perfis de consumo de O₂ em função da concentração de O₂ dissolvido (Figura 3.33A) e ao longo do tempo (Figura 3.33B).

Pela Figura 5.31A e 5.33B, verifica-se que o oxigênio não será limitante acima de $0,002 \text{ gO}_2\text{L}^{-1}$ de O₂ dissolvido.

Tabela 5.26 – Valores dos parâmetros do modelo de Andrews (1968) e da transferência e consumo de oxigênio ajustados aos dados de 32,5°C

Parâmetros Estequiométricos		
$Y_{Xr/Sc}$	$(gX gSC^{-1})$	2,15
$Y_{Xr/P}$	$(gX gSN^{-1})$	1,30
$Y_{P/Sc}$	$(gP gSC^{-1})$	1,65
m_{Sc}	$(gX gP^{-1})$	0,38
$Y_{Xr/SN}$	$(gSC gX^{-1} h^{-1})$	13,9
m_{SN}	$(gSN gX^{-1} h^{-1})$	5.10^{-3}
k_d	(h^{-1})	10^{-7}
$Y_{ox/C}$	$(gO_2 gSC^{-1})$	2,00
$Y_{ox/N}$	$(gO_2 gSN^{-1})$	2,00
$Y_{CO_2/C}$	$(gCO_2 gSC^{-1})$	1,22
$Y_{CO_2/N}$	$(gCO_2 gSN^{-1})$	1,51
m_{ox}	$(gO_2 gX^{-1} h^{-1})$	0,0001
K_{La}^{ox}	(h^{-1})	195
$K_{La}^{CO_2}$	(h^{-1})	153
C_{ox}^*	$(g L^{-1})$	0,0076
$C_{CO_2}^*$	$(g L^{-1})$	0,065
Parâmetros Cinéticos		
μ_{maxC}	(h^{-1})	0,42
Ks_C	$(g L^{-1})$	6,59
Ki_C	$(g L^{-1})$	15,76
μ_{maxN}	(h^{-1})	4,50
Ks_N	$(g L^{-1})$	1,68
Ki_N	$(g L^{-1})$	6,69
Ks_{Ox}	$(g L^{-1})$	10^{-4}
	FObj	0,22
	r^2	0,95

CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES

6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram determinadas as cinéticas de crescimento de *Cupriavidus necator*, consumo de substratos e produção de poli (3-hidroxiacetato) a partir de cultivos batelada utilizando-se de glicose e frutose como fonte de carbono em experimentos realizados para diferentes temperaturas, cujos dados experimentais foram fornecidos por FIORESE (2008).

A estratégia de identificação do sistema de reações metabólicas foi utilizada fornecendo um conjunto simplificado de reações que correlacionam as variáveis de estado: concentração celular, concentração de substratos e concentração de PHB.

Os modelos cinéticos de crescimento microbiano escolhidos para a avaliação dos dados experimentais foram utilizados para prever o processo de produção do poli (3-hidroxiacetato) por *Cupriavidus necator*, sendo os parâmetros cinéticos e estequiométricos estimados a partir de um método Algoritmo Genético.

O método Algoritmo Genético implementado no *software* Maple®, utilizando-se de um microcomputador Intel Core i5, 5 GB de memória RAM, cujo procedimento de otimização foi baseado na minimização entre o valor experimental e o valor calculado pelo modelo mostrou-se eficiente no ajuste dos modelos, conforme a evolução da função objetivo e o valor do coeficiente de correlação (r^2).

Para a avaliação da qualidade do ajuste dos modelos avaliados foram aplicados alguns testes estatísticos, cujos resultados mostram como melhor modelo para representar os dados a 32,5 °C o de Andrews (1968), e para os dados a 35 °C o de Heinle e Lafferty (1980). Já para os dados as temperaturas de 30 e 37,5 °C nenhum modelo se apresentou estatisticamente válido.

A sequência de análises aplicadas, desde o estudo dos modelos da literatura, até a discriminação e avaliação dos modelos pelos testes estatísticos forneceu informações confiáveis para a otimização das condições operacionais, como a transferência de oxigênio e respiração microbiana, entre outras.

REFERÊNCIAS

AIBA, S.; SHODA, M.; NAGALANI, M. **Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation.** *Biotechnology and Bioengineering*, v.10, p. 845-864, 1968.

ALBERTON, A. L.; SCHWAAB, M.; LOBÃO, M. W. N.; PINTO, J. C. **Experimental design for the joint model discrimination and precise parameter estimation through information measures.** *Chemical Engineering Sciences*, v. 66, p. 1940-1952, 2011.

ALBERTON, A. L.; SCHWAAB, M.; LOBÃO, M. W. N.; PINTO, J. C. **Design of experiments for discrimination of rival models based on the expected number of eliminated models.** *Chemical Engineering Science*, v. 75, p. 120-131, 2012.

ALVARENGA, G. B. **Um algoritmo híbrido para o problema do roteamento de veículos estático e dinâmico com janela de tempo.** Departamento de Ciência da Computação, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2005. Tese (Doutorado)

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. **Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates.** *Microbiology Reviews*, v. 54, n. 4, p. 450-472, 1990.

ANDREWS, L. F. **A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibition substrates.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 10, p. 70-723, 1968.

ARAGÃO, G. M. F. **Production de polyhydroxyalcanoates par *Alcaligenes eutrophus*: caractérisation cinétique et contribution à l'optimisation de la mise en oeuvre des cultures.** These (Doctorat spécialité: Biologie et génétique Moléculaires et Cellulaires - Biotechnologie) - *L'institut National des Sciences appliquées de Toulouse*, Toulouse. 1996.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2ª ed. New York, McGraw-Hill, 1986.

BARD, Y. **Nonlinear Parameter Estimation**. *Academic Press*, New York, 1974.

BIAGIO, M. A.; COELHO, M. A.; FRANCO, P. E. C. **Heuristic for solving capacitor allocation problems in electric energy radial distribution networks**. *Pesquisa Operacional*, v. 32, n. 01, 2012.

BRAUNEGG, G., LEFEBVRE, G., GENSER, K. F. **"Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects"**. *Journal of Biotechnology*, v. 65, p. 127-161, 1998.

BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTY, R.M. **A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass**. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 6, p. 29-37, 1978.

BYROM, D. **Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics**. *TIBTECH*, v. 5, p. 246-250, 1987.

CHAGAS, M. A. R. **Otimização do projeto da antena Yagi-Uda pelo método Particle Swarm Optimization (PSO)**. Belém. Instituto de ciências exatas e naturais, Universidade Federal do Pará, 2011, 72p. (Mestrado)

COMEAU, Y.; HALL, K. J.; OLDHAM, W. K. **Determination of poly- β -hydroxybutyric in activated sludge by gas-liquid chromatography**. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 54, n. 9, p. 2325-2327, 1988.

CONSTANTINO, A. A.; JUNIOR, A. M. G. **Um algoritmo genético híbrido para o problema de corte industrial bidimensional**. *Acta Scientiarum*, v. 24, n. 06, p. 1727-1731, 2002.

CONTOIS, D. E. **Kinetics of bacterial growth: relationship between population density and specific growth rate of continuous cultures.** *Journal of General Microbiology*, n.21, v.40, 1959.

DEMAJOROVIC, J. **Da Política Tradicional de Tratamento do Lixo à Política de Gestão de Resíduos Sólidos. As Novas Prioridades.** *Revista de Administração de Empresas*. São Paulo, v. 35, n. 3, p. 88-93. Maio/Junho, 1995.

DOI, Y.; KAWAGUCHI, Y.; KOYAMA, N.; NAKAMURA, S.; HIRAMITSU, M.; YOSHIDA, Y.; KIMURA, H. **Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*.** *FEMS Microbiology Reviews*, v. 103, p. 103-108, 1992.

DONAIRE, D. **Gestão Ambiental na Empresa.** 2a Ed., São Paulo. Editora Atlas S.A., 1999. 169 p.

DUFRESNE, A.; DUPEYRE, D.; PAILLET, M. **Lignocellulosic Flour-reinforced poly(hydroxybutyrate-co-valerate) composites.** *Journal of Applied Polymer Science*, v. 87, p. 1302–1315, 2003.

DUNN, I. J.; HEINZLE, E.; INGHAM, J.; PRENOSIL, J. E. **Biological Reaction Engineering**, VHC, 1992.

EDWARDS, V. H. **The influence of high substrate concentrations on microbial kinetics.** *Biotechnology and Bioengineering*, v.12, p.679-712, 1970.

ETSCHMANN, D.; SHELL, D.; SCHRADER, J. **Medium optimization for the production of the aroma compound 2-phenylethanol using a genetic algorithm.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 29, p. 187-193, 2004.

FACCIN, D. J. L. **Avaliação de condições de cultivo para aumento da produção de P(3HB) por *Bacillus megaterium* e modelagem do bioprocesso.** Porto Alegre. Faculdade de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012. 160p. Tese (Doutorado).

FIORENTIN, L. D.; TRIGUEROS, D. E. G.; MÓDENES, A. N.; ESPINOZA-QUIÑONES, F. R.; PEREIRA, N. C.; BARROS, S. T. D.; SANTOS, O. A. A. **Biosorption of reactive blue 5G dye onto drying orange bagasse in batch system: kinetic and equilibrium modeling.** *Chemical Engineering Journal*, v. 163, p. 68-77, 2010.

FIORESE, M. L. Estratégias de cultivo e recuperação e caracterização de Poli (3-hidroxi-butirato) produzido por *Ralstonia eutropha*. Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008. 199p. Tese (Doutorado)

FISHER, R. A. On an absolute criterion for fitting frequency curves. *Messenger of Mathematics*, v. 01, n. 41, p. 155-160, 1912.

FORMOLO, M. C.; DUARTE, M. A. T.; SCHNEIDER, A. L.; FURLAN, S. A.; PEZZIN, A. P. T. **Poliidroxialcanoatos: biopoliésteres produzidos a partir de fontes renováveis.** *Revista Saúde e Ambiente*, v.4, n.2, p.14-21, 2003.

GAHLAWAT, G.; SRIVASTAVA, A. K. **Development of a mathematical model for the growth associated Polyhydroxybutyrate fermentation by *Azohydromonas australica* and its use for the design of fed-batch cultivation strategies.** *Bioresource Technology*, v. 137, p. 98-105, 2013.

GLOVER, F. **Tabu search – part I.** *ORSA Journal on Computing*, v. 1, n. 3, p. 190-206, 1989a.

GLOVER, F. **Tabu search – part II.** *ORSA Journal on Computing*, v. 2, n. 1, p. 4-32, 1989b.

GORDILLO, M. A. **Estratègies d'operació em “fed-batch”:** aplicació a la producció de lípases per *Candida rugosa*; D. Sc. Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona, Espanha, 1996.

HEINEN, M. R.; OSÓRIO, F. S. **Algoritmos genéticos aplicados ao problema de roteamento de veículos.** *Hifen*, v. 30, n. 58, 2006.

HEINZLE, E.; LAFFERTY, R. M. **A kinetic model for growth and synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) in *Alcaligenes eutrophus* H16.** *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 11, p. 8-16, 1980.

HOLLAND, J. H. **Adaptation in Natural and Artificial Systems**, University of Michigan Press, 1975.

HOLMES, P. A. **Applications of PHB – A microbially produced biodegradable thermoplastic.** *Physics in Technology*, v. 16, n. 32, p. 32 – 36, 1985.

IERUSALIMSKY, N.D. **Bottlenecks in metabolism as growth rate controlling factor.** In: Powel, E.O., Eans, C.G.P., Strange, R.E., Tempest, D.W. (Eds.), *Microbial Physiology and Continuous Culture*. HMSO, London, p. 23–33, 1967.

KENNEDY, J.; EBERHART, R. **Particle Swarm Optimization.** 1995.

KENNEDY, J.; EBERHART, R. **Swarm Intelligence.** Morgan Kaufmann Publishers, 512p. 2001.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. **Computer simulated fed-batch cultivation for over production of PHB: A comparison of simultaneous and alternate feeding of carbon and nitrogen.** *Biochemical and Bioengineering Journal*, v. 27, p. 197-203, 2006.

KIM, B. S., LEE, S. C., LEE, S. Y., CHANG, H. N., CHANG, Y. K., WOO, S. I. **Production of Poly(3-Hydroxybutyric Acid) by Fed-Batch Culture of *Alcaligenes eutrophus* with Glucose Concentration Control.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 43, p. 892-898, 1994.

KIM, Y. B., LENZ, R. W. **“Polyesters from microorganisms”**. In: Biopolyesters, v. 71, *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, Springer-Verlag, p. 51-79, 2001.

LAVRIC, V.; IANCU, P.; PLESU, V. **Genetic algorithm optimization of water consumption and wastewater network topology**. *Journal of Cleaner Production*, v. 13, p. 1405-1415, 2005.

LEE, S. Y. **Plastic bacteria: Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria**. *Trends Biotechnology*, v.14, p. 431-438, 1996.

LINDEN, R. **Algoritmos Genéticos: Uma importante ferramenta da inteligência computacional**. Rio de Janeiro: Brasport, 2006.

LOPES, J. S. **Modelagem matemática do processo fermentativo de produção de retamicina por microrganismo filamentosso *Streptomyces olindensis***. São Paulo. Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 2007. 105p. (Mestrado)

LÓPEZ, S., PRIETO, M., DIJKSTRA, J., DHANOA, M. S. E FRANCE, J. **Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth**. *International Journal of Food Microbiology*, v. 96, p. 289-300, 2004.

LUEDEKING, R., PIRET, E. L. **A kinetic study of the lactic acid fermentation: batch process at controlled pH**. *J. Biochem. Microbiol. Tech. Eng.*, v. 1, p. 393-412, 1959.

LUENGO, J. M.; GARCÍA, B.; SANDOVAL, A.; NAHARRO, G.; OLIVERA, E. R. **Boplastics from microorganisms**. *Current Opinion in Microbiology*, v. 6, n. 3, p. 251-260, 2003.

LUONG, J. H. T. **Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation**. *Biotechnol. Bioeng.* v. 27, p. 280–285, 1985.

LUONG, J. H. T. **Generalisation of Monod Kinetics for analysis of growth data with substrate inhibition.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. XXIX, p. 242-248, 1987.

LUVIZETTO, D. J. **Cultivo da bactéria *Bacillus megaterium* para a produção do biopolímero poli(3-hidroxi-butirato) e modelagem matemática do bioprocesso.** Porto Alegre. Escola de Engenharia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007. 119 p. (Mestrado)

LUVIZETTO, D. J.; GAMBETTA, R.; SECCHI, A. R.; CARDOSO, N. S. M.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z. **Produção do biopolímero poly(3-hydroxybutyrate).** V-Oktober Fórum - PPGEQ. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Outubro, 2006.

MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. BROCK. **Biology of Microorganisms**, Prentice-Hall International Editions, Upper Saddle River, 2000.

MARTINS, V. C.; COELHO, L. S.; CÂNDIDO, M. A. B.; PACHECO, R. F. **Otimização de layouts industriais com base em busca tabu.** *Gestão & Produção*, v. 10, n. 1, São Carlos, 2003.

MEGEE, R. D.; DRAKE, J. F.; FREDRICKSON, A. G.; TSUCHIYA, H. M. **Studies in intermicrobial symbiosis *S. cerevisiae* and *L. casei*.** *Canadian Journal of Microbiology*, v.18, p.1733-1742, 1972.

MENDES, A. J. B.; VALDMAN, B.; SOUZA JUNIOR, M. B. **Uma revisão de modelagem matemática em bioprocessos. Parte I: Fundamentos básicos e classificação.** *Revista Militar de Ciência e Tecnologia*, v. XXVIII, p. 40-59, 2011.

MILLER, G. L. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MONOD, J. **The growth of bacterial cultures.** *Annual Review of Microbiology*, v. 03, p. 371-394, 1949.

MOSER, H. **The dynamics of bacterial populations maintained in the chemostat.** Carnegie Institution of Washington, 1958.

MULCHANDANI, A.; LUONG, J. H. T.; GROOM, C. Substrate inhibition kinetics for microbial **growth and synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* ATCC 17697.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 30, p. 11-17, 1989.

NEVES, P. S.; MOREIRA, T. G.; OLIVEIRA, L. W.; JUNIOR, I. C. S. **Otimização da operação de usinas termoelétricas de ciclo combinado através da técnica Particle Swarm Optimization – PSO.** Congresso Brasileiro de P&D em petróleo e gás, Aracaju, 2013.

NIELSEN, J.; VILLADSEN, J.; LIDÉN, G.; **Bioreaction engineering principles**, 2^a ed, Kluwer Academic /Plenum Publishers: New York, 2003.

OLSSON, L.; NIELSEN, J. **On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations.** *TIBTECH*, v. 15, 1997.

PARK, T. Y.; FROMENT, G. F. **A hybrid genetic algorithm for the estimation of parameters in detailed kinetic models.** *Computers & Chemical Engineering*, v. 22, p. s103-s110, 1998.

PATNAIK, P. R. **Are microbes intelligent beings? An assessment of cybernetic modeling.** *Biotechnology Advances*, v.18, p.267-288, 2000.

PATNAIK, P. R. **Dispersion optimization to enhance PHB production in fed-batch cultures of *Ralstonia eutropha*.** *Bioresource Technology*, v. 97, p. 1994-2001, 2006-a.

PATNAIK, P. R. **Enhancement of PHB biosynthesis by *Ralstonia eutropha* in fed-batch cultures by neural filtering and control.** *Food and Bioprocess Processing*, v. 84, p. 150-156, 2006-b.

PATWARDHAN, P. R.; SRIVASTAVA, A. K. **Model-based fed-batch cultivation of *R. eutropha* for enhanced biopolymer production.** *Biochemical and Bioengineering Journal*, v. 20, p. 21-28, 2004.

POLI, G. I.; PUREZA, V. **Um algoritmo de busca tabu para o carregamento de contêineres com caixas idênticas.** *Gestão & Produção*, v. 19, n. 02, p. 323-336, 2012.

PRADELLA, J. G. C. **Biopolímeros e Intermediários Químicos.** Centro de Gestão e Estudos Energéticos, Relatório Técnico nº 84 396-205. São Paulo, Março de 2006.

PRESSER, K. A.; RATKOWSKY, D. A.; ROSS, T. **Modeling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, p. 2355-2360, 1997.

PUREZA, V.; MORABITO, R. **Some experiments with a simple tabu search algorithm for the manufacturer's pallet loading problem.** *Computers and Operations Research*, v. 33 p. 804-819, 2006.

RAMSAY, B. A., LOMALIZA, K., CHAVARIE, C., DUBE, B., BATAILLE, P., RAMSAY, J. A. **Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric) acids.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, p. 2093-2098, 1990.

RAJE, P.; SRIVASTAVA, A. K. **Updated mathematical model and fed-batch strategies for poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by *Alcaligenes eutrophus*.** *Bioresource technology*, v. 64, p. 185-192, 1998.

RAVAGNANI, M.A.S.S.; SILVA, A. P.; BISCAIA JR, E. C.; CABALLERO, J. A. **Optimal design of shell-and-tube heat exchangers using particle swarm optimization.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 48, p. 2927-2935, 2009.

RAVAGNANI, M. A. S. S.; TRIGUEROS, D. E. G.; MÓDENES, A. N.; ESPINOZA-QUIÑONES, F. R. **Synthesis of Multicomponent Reuse Water Networks by PSO Approach.** *Transactions on Computational Collective Intelligence*, v. 17, p. 282-294, 2014.

REPASKE, R. **Nutritional requirements for *Hydrogenomonas eutropha*.** *Journal of Bacteriology*, v. 83, n. 2, p. 418-422, 1962.

RIIS, V.; MAI, W. **Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis.** *Journal of Chromatography A*, v. 445, p. 285-289, 1988.

ROCHA, A. J. S. **Análise dinâmica de composições musicais.** Departamento de Engenharia Eletrotécnica, Instituto Superior do Porto, 2011. (Mestrado)

RODRIGUES, A. D. **Estudo da produção de polihidroxibutirato por *Cupriavidus necator* em fermentação no estado sólido.** Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005. 99p. (Mestrado)

ROLIM, A. M. **A reciclagem de resíduos plásticos pós-consumo em oito empresas do Rio Grande do Sul.** Porto Alegre: Escola de Administração, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000. 142p. Dissertação (Mestrado).

ROSA, T. O.; LUZ, H. S. **Conceitos básicos de algoritmos genéticos: Teoria e Prática.** In: XI Encontro de Estudantes de Informática do Tocantins, Palmas, 2009.

ROSENBROCK, H. H. An automatic method for finding the greatest or least value of a function. *The Computer Journal*, v. 03, p. 175-184, 1960.

ROSS, T.; RATKOWSKY, D. A.; MELLEFONT, L. A.; McMEEKIN, T. A. **Modelling the effect of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth rate of *Escherichia coli***. *International Journal of Food Microbiology*, v. 82, p. 33-43, 2003.

SALTER, M.; ROSS, T.; McMEEKIN, T. A. **Applicability of a model for non-pathogenic *Escherichia coli* for predicting the growth of pathogenic *Escherichia coli***. *Applied Microbiology*, v. 85, p. 357-384, 1998.

SATOH, H. **Biochemical mechanisms of the anaerobic substrate uptake by enhanced biological phosphorous removal activated sludges**. Master Thesis, *Departement of Urban and Environmental Engineering, University of Tokyo*, 1991.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial Vol II: Engenharia Bioquímica**. São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., v. 02, p. 277-331, 2001.

SCHWAAB, M.; QUEIPO, C. Q.; SILVA, F. M.; BARRETO JR., A. G.; NELE, M.; PINTO, J. C. **A new approach for sequential experimental design for model discrimination**. *Chemical Engineering Science*, v. 61, p. 5791–5806, 2006.

SCHWAAB, M. **Desenvolvimento e implementação de novas técnicas de estimação de parâmetros e planejamento sequencial de experimentos**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007. Tese (Doutorado)

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

SEGEL, I. H. **Enzyme Kinetics**. New York: John Wiley & Sons, 1975.

SHAHHOSSEINI, S. **Simulation and optimization of PHB production in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha***. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 963-969, 2004.

SILVA, J. V. P. O. **Modelização cinética da degradação anaeróbia de um efluente láctico**. Aveiro: Departamento de Ambiente e Ordenamento, Universidade de Aveiro, 2009. 66 p. Dissertação (Mestrado)

SONNLEITNER B.; HEINZLE, E.; BRAUNEGG, G.; LAFFERTY, R. M. **Formal Kinetics of Poly- β -Hydroxybutyric Acid (PHB) Production in *Alcaligenes eutrophus* h 16 and *Mycoplana rubra* R 14 With Respect to the Dissolved Oxygen Tension in Ammonium-Limited Batch Cultures**. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 7, p. 1-10, 1979.

SOTERO, A. P. **Plásticos biodegradáveis trazem melhoria ambiental**. *Jornal de Plásticos*, v.43. ago. 2000. Disponível em: <<http://www.jorplast.com.br/jpago00/ago006.html>> Acessado em 08 de agosto de 2013.

STEINBÜCHEL, A. **Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example**. *Macromolecular Bioscience*, v. 1, n. 1, p. 1-23, 2001.

STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, H.G. **Physiology and molecular genetics of poly(β -hydroxyalkanoic acids) synthesis in *Alcaligenes eutrophus***. *Molecular Microbiolog*, v. 5 n. 3, p. 535-542, 1991.

TANAKA, K.; ISHIZAKI, A.; KANAMARU, T.; KAWANO, T. **Production of Poly(D-3-Hydroxybutyrate) from CO₂, H₂, and O₂ by High Cell Density Autotroph-ic Cultivation of *Alcaligenes eutrophus***. *Bacteriology and Engineering*, v. 45, p. 268-275, 1995.

TESSIER, G. **Croissance des populations bactériennes et quantité d'aliment disponible.** *Rev Sci Paris*, p. 80-209, 1942.

TIAN, J., SINSKEY, A. J.; STUBBE, J. **Kinetic Studies of Polyhydroxybutyrate Granule Formation in *Wautersia eutropha* H16 by Transmission Electron Microscopy.** *Journal of Bacteriology*, p. 3814-3824, 2005.

TOHYAMA, M.; PATARINSKA, T.; QIANG, Z; SHIMIZU, K. **Modeling of the mixed culture and periodic control for PHB production.** *Biochemical and Bioengineering Journal*, v. 10, p. 157-173, 2002.

TRIGUEROS, D. E. G.; MÓDENES, A. N.; KROUMOV, A. D.; ESPINOZA-QUIÑONES, F. R. **Modeling of biodegradation process of BTEX compounds: kinetic parameters estimation by using Particle Swarm Global Optimizer.** *Process Biochemistry*, v. 45, n. 08, p. 1355-1361, 2010.

TRIGUEROS, D. E. G.; MÓDENES, A. N.; RAVAGNANI, M. A. S. S.; ESPINOZA-QUIÑONES, F. R. **Reuse water network synthesis by modified PSO approach.** *Chemical Engineering Journal*, v. 183, p. 198-211, 2012.

TRIPATHI, A. D.; SRIVASTAVA, S. K.; SINGH, R. P. **Statistical optimization of physical process variables for bio-plastic (PHB) production by *Alcaligenes sp.*** *Biomass and Bioenergy*, v. 55, p. 243-250, 2013.

TSAO, G. T.; HANSON, T. P. **Extended Monod equation for batch cultures with multiple exponential phases.** *Biotechnology and Bioengineering*, v.17, p.1591-1598, 1975.

TUDOR, R.; LAVRIC, V. **Optimization of total networks of water-using and treatment units by genetic algorithms.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 35, p. 2853-2866, 2011.

TUDOR, R.; LAVRIC, V. **Dual-objective optimization of integrated waster/wastewater networks.** *Computers & Chemical Engineering*, v. 35, p. 2853-2866, 2011.

VOLESKI, B.; VOTRUBA, J. **Modeling and optimization of fermentation processes.** *Book Reviews, Elsevier Science Publishers*, London, 1992.

VOTRUBA, J. **Practical aspects of mathematical modelling of fermentation processes as a method of description, simulation, identification and optimization.** *Acta Biotechnologica*, v. 2, n. 119, 1982.

WANG, J.; FANG, F.; YU, H. Q. **Substrate consumption and biomass growth of *Ralstonia eutropha* at various S_0/X_0 levels in batch cultures.** *Bioresource Technology*, v. 98, p. 2599-2604, 2007.

WEBB, J. L. **Enzyme and Metabolic Inhibitors**, Academic Press, Boston, USA, 1963.

WEUSTER-BOTZ, D. E.; WANDREY, C. **Medium optimization by genetic algorithm for continuous production of formate dehydrogenase.** *Process Biochemistry*, v. 30, p. 563–571, 1995.

WEUSTER-BOTZ, D.; KELLE, R.; FRANTEN M. E.; WANDREY C. **Substrate controlled fed-batch production of L-Lysine with *Corynebacterium glutamicum*.** *Biotechnology Progress*, v. 13, p. 387–393, 1997.

WU, Y. C.; HAO, O. J.; OU, K. C.; SCHOELZE, R. J. **Treatment of leachate from solid waste landfill site using a two-stage anaerobic filter.** *Biotechnology and Bioengineering*, v.31, p.257-266, 1988.

YANO, T.; KOGA, S. **Dynamic behavior of the chemostat subject to substrate inhibition.** *Biotechnology and Bioengineering*, v.11, p.139-153, 1969.

YANO, T.; NAKAHARA, T.; KAMIYAMA, S.; YAMADA, K. **Kinetic studies on microbial activities in concentrated solutions. I. Effect of excess sugars on oxygen uptake rate of a cellfree respiratory system.** *Agricultural and Biological Chemistry*, v.30, p.42-48, 1966.

YOON, H.; KLINZING, G.; BLANCH, H. W. **Competition for mixed substrates by microbial populations.** *Biotechnology and Bioengineering*, v.19, p.1193-1210, 1977.

ANEXOS

ANEXO A – Descrição dos experimentos

Os dados experimentais utilizados neste trabalho foram obtidos por Fiorese (2008), conforme a seguinte metodologia experimental.

A1. Microrganismo e manutenção

Para os cultivos foi utilizada a cepa da bactéria *Ralstonia eutropha* DSM545, atualmente reconhecida pelo *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* (DSMZ) como *Cupriavidus necator*. A cepa foi mantida em meio ágar nutriente contendo 5 g L⁻¹ de peptona de carne, 3 g L⁻¹ de extrato de carne e 1,5% de ágar, e subcultivada a cada 15 dias.

A2. Condições do meio de cultura

As células foram inoculadas (primeira pré-cultura) em meio sem ágar contendo 5 g L⁻¹ de peptona e 3 g L⁻¹ de extrato de carne. O meio mineral, seguindo os protocolos de Ramsay *et al.*, (1990) e Aragão (1996), foi utilizado para a segunda pré-cultura, o qual constituiu-se pelas soluções 1, 2 e 3. A solução 1 foi composta de 5 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0,19 g L⁻¹ de ácido nitrilotriacético, 0,06 g L⁻¹ de citrato ferroso de amônia, 0,5 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,01 g L⁻¹ CaCl₂.2H₂O, 1 mL L⁻¹ de solução de elementos traço [(g L⁻¹): 0,30 H₃BO₃, 0,20 CoCl₂.6H₂O, 0,10 ZnSO₄.7H₂O, 0,03 MnCl₂.4H₂O, 0,03 Na₂MoO₄.2H₂O, 0,02 NiCl₂.6H₂O, 0,01 CuSO₄.5H₂O]. A solução 2 foi uma solução fosfatada contendo 8,95 g L⁻¹ de Na₂HPO₄.12H₂O, 1,5 g L⁻¹ KH₂PO₄. A solução 3 constituiu-se pela fonte de carbono, sendo esta glicose/frutose (1:1 p/p) na concentração de 30 g L⁻¹ no meio final. O pH do meio foi ajustado em 7 com NaOH 0,1 M ou HCl 1 M. As soluções 1 e 2 foram autoclavadas separadamente a 121°C durante 15 min, e misturados asepticamente para compor o meio final, juntamente com a fonte de carbono (solução 3). Os experimentos foram conduzidos assumindo-se como substratos limitantes as fontes de nitrogênio e carbono.

A3. Condições da cultura

A primeira pré-cultura foi preparada em frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 150 mL de meio sem ágar inoculado com três alçadas (loopful) da cepa crescida em meio ágar. A segunda pré-cultura foi preparada em frasco Erlenmeyer de 1000 mL contendo 300 mL de meio mineral esterilizado e quantidade de inóculo proveniente da pré-cultura anterior

igual a 10% do volume final do meio (v/v). Ambas, primeira e segunda pré-culturas, foram agitadas em *shaker* a 150 rpm e 30°C por 24 h. O inóculo da segunda pré-cultura foi transferido para o próximo estágio na quantidade de 10% do volume final do meio (v/v).

A4. Culturas em biorreator descontínuo

As culturas foram realizadas em um biorreator de 5 L (BIOFLO 110, New Brunswick Scientific CO. New Jersey, USA) com um volume útil de 4 L. O biorreator contendo a solução 1 do meio mineral limitado em nitrogênio, cuja concentração final foi de 1,15 g L⁻¹, foi esterilizado a 121°C por 15 min em autoclave e seguido de resfriamento. O inóculo, proveniente da segunda pré-cultura foi adicionado na quantidade de 10% do volume final do biorreator. Para avaliar o efeito da temperatura, os experimentos foram realizados em temperaturas de fermentação fixas em 30; 32,5; 35; 37,5 e 40°C. O pH foi mantido em 7 com 0,1M NH₄OH (limitado em fosfato) e com 0,1M NaOH (limitado em nitrogênio) e 1M HCl (limitado em nitrogênio e fosfato). Em todos os experimentos a concentração de oxigênio dissolvido foi mantida acima de 20% usando um eletrodo de oxigênio (Mettler Toledo, in Pro 6800 Series). A velocidade de agitação foi fixada em valores entre 400 – 900 rpm e a taxa de aeração em valores no intervalo de 0,125 – 0,9 vvm, a depender de cada experimento. Amostras de cerca de 30 mL foram retiradas no intervalo de tempo de 1,5 h para determinação das concentrações de substrato, biomassa, nitrogênio e PHB.

A5. Métodos analíticos

A densidade óptica da suspensão celular foi medida a 600 nm em um espectrofotômetro (GENESYS 10 Vis, Spectronic Unicam, USA) sendo realizadas diluições adequadas para a manutenção da linearidade da absorção. A concentração da biomassa foi estimada pela correlação entre OD_{600nm} em função da concentração celular.

O sobrenadante obtido por centrifugação da suspensão celular em 14000 rpm por 5 min foi usado para as análises de substrato utilizado como fonte de carbono e nitrogênio amoniacal residual, que após adequadas diluições foram medidas em espectrofotômetro (GENESYS 10 Vis, Spectronic Unicam, USA).

A glicose residual foi estimada pelo método DNS (*dinitrosacylic acid*) (Miller, 1959). A concentração de glicose foi calculada pelo gráfico padrão que correlaciona OD_{540nm} em função da concentração de glicose, na faixa entre 0-3 g L⁻¹. O método colorimétrico (Urea-ES - Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Belo Horizonte, Brasil) foi utilizado para determinação

do nitrogênio amoniacal. A curva padrão de densidade óptica em OD_{600nm} foi usada para obter a correlação com a concentração de nitrogênio amoniacal.

Os protocolos de Braunegg *et al.* (1978), Comeau *et al.* (1988) e Satoh (1991) foram utilizados para a determinação do PHB. Uma quantidade de precipitado celular obtido por centrifugação a 14000 rpm e 3 min foi dissolvido em 2 mL de clorofórmio e 2 mL de metanol acidificado, usando $0,4 \text{ g L}^{-1}$ de ácido benzóico como padrão interno (Riis e Mai, 1988). A solução foi mantida em incubadora a 100°C por 2h. O PHB foi extraído por despolimerização com agitação por 60 s para separação das fases. Após resfriamento até a temperatura ambiente e adição de 1 mL de água destilada, a fase contendo clorofórmio e polímero foi analisada por cromatografia gasosa.

A concentração de PHB foi determinada em cromatógrafo gasoso (GC-90, Supercowax-10) equipado com um detector de ionização de chama e uma coluna de sílica fundida ($0,53 \text{ mm} \times 0,53 \text{ mm} \times 30 \text{ m}$). As temperaturas do forno, de detecção e de injeção foram respectivamente, 90, 190 e 230°C , e o volume injetado foi de $1 \mu\text{L}$. Nitrogênio foi utilizado como gás de arraste a uma taxa de 30 mL min^{-1} . A temperatura inicial da coluna foi fixada em 60°C por 3 min, seguido com uma rampa de $7^{\circ}\text{C min}^{-1}$ por 7,15 min até a temperatura final de 110°C . Os cromatogramas foram obtidos pelo *software Clarity Lite* (DataApex®).

A6. Determinação de K_{La} e Q_{O_2}

A determinação do K_{La} e da Q_{O_2} foi realizada pelo método dinâmico (TAGUCHI & HUMPHREY, 1966), por meio de um eletrodo polarográfico (Metler Toledo, Germany), por interrupção da aeração para anulação da transferência de oxigênio em determinado instante. A partir dos dados coletados, o procedimento matemático segundo Schmidell *et al.*, (2001) foi utilizado para a estimação dos parâmetros K_{La} e Q_{O_2} .

ANEXO B – Dados cinéticos da fermentação em sistema descontínuo

Os dados cinéticos do cultivo de *C. necator* em sistema descontínuo obtidos por Fiorese (2008), são apresentados nas Tabelas B.1 a B.5 para as temperaturas de 30; 32,5; 35; 37,5 e 40°C, respectivamente.

Tabela B.1 - Dados cinéticos para a temperatura de 30°C

Tempo (h)	Carbono (g L ⁻¹)	Nitrogênio (g L ⁻¹)	Xr (g L ⁻¹)	XT (g L ⁻¹)	Produto (g L ⁻¹)	Proteína (g L ⁻¹)
0,0	30,000	1,150	0,540	0,54	0,000	0,397
1,5	28,678	1,068	0,740	0,74	0,000	0,546
3,0	27,872	0,909	0,960	0,96	0,000	0,715
4,5	27,419	0,797	1,169	1,24	0,070	0,832
6,0	26,742	0,568	1,523	1,60	0,077	1,065
7,5	25,420	0,359	1,933	2,04	0,106	1,405
9,0	24,291	0,017	2,406	2,60	0,193	1,861
10,5	22,776	0,000	2,652	3,24	0,588	2,031
12,1	22,840	0,000	2,705	3,58	0,875	2,137
13,6	22,162	0,000	2,784	3,97	1,187	2,286
15,1	20,615	0,000	2,831	4,60	1,769	2,424
16,5	19,615	0,000	2,899	4,98	2,081	2,529
17,9	19,550	0,000	2,944	5,62	2,676	2,604
19,3	19,292	0,000	2,950	6,08	3,129	2,699

Tabela B.2 - Dados cinéticos para a temperatura de 32,5°C

Tempo (h)	Carbono (g L ⁻¹)	Nitrogênio (g L ⁻¹)	Xr (g L ⁻¹)	XT (g L ⁻¹)	Produto (g L ⁻¹)
0,0	30,000	1,150	0,570	0,68	0,112
2,4	29,031	0,840	0,801	1,00	0,199
4,8	26,916	0,671	1,166	1,50	0,334
6,3	25,119	0,470	1,743	2,18	0,437
8,3	21,773	0,221	2,989	3,74	0,751
10,3	20,145	0,028	2,753	4,56	1,807
12,3	18,033	0,022	2,535	5,22	2,685
14,3	15,610	0,021	2,499	6,10	3,601
16,3	15,575	0,022	2,494	6,70	4,206
18,3	15,252	0,019	2,707	7,72	5,013

Tabela B.3 - Dados cinéticos para a temperatura de 35°C

Tempo (h)	Carbono (g L ⁻¹)	Nitrogênio (g L ⁻¹)	Xr (g L ⁻¹)	XT (g L ⁻¹)	Produto (g L ⁻¹)	Proteína (g L ⁻¹)
0,0	30,000	1,150	0,280	0,28	0,000	1,001
1,5	29,177	1,014	0,620	0,62	0,000	1,013
3,0	29,240	0,856	0,827	0,90	0,073	1,314
4,5	28,987	0,702	1,189	1,32	0,131	1,483
6,1	26,011	0,499	1,796	1,98	0,184	1,894
7,5	25,061	0,000	2,263	2,56	0,230	2,196
9,0	25,315	0,000	2,787	3,42	0,633	2,341
10,7	24,618	0,000	3,206	4,16	0,954	2,703
12,3	23,098	0,000	3,357	4,84	1,483	2,715
13,8	23,035	0,000	3,517	5,40	1,883	2,727
15,3	20,249	0,000	3,632	5,92	2,288	2,691
17,8	18,476	0,000	3,853	6,50	2,907	2,823

Tabela B.4 - Dados cinéticos para a temperatura de 37,5°C

Tempo (h)	Carbono (g L ⁻¹)	Nitrogênio (g L ⁻¹)	Xr (g L ⁻¹)	XT (g L ⁻¹)	Produto (g L ⁻¹)
0,0	30,000	1,150	0,400	0,450	0,053
2,3	27,630	0,840	0,545	0,600	0,055
4,3	27,438	0,671	0,819	0,933	0,115
6,3	25,685	0,470	1,366	1,573	0,208
8,8	23,521	0,221	2,415	2,763	0,348
10,6	22,670	0,030	3,450	4,400	0,920
12,6	21,756	0,024	4,245	5,600	1,355
13,6	18,394	0,020	4,604	6,250	1,646

Tabela B.5 - Dados cinéticos para a temperatura de 40°C

Tempo (h)	Carbono (g L ⁻¹)	Nitrogênio (g L ⁻¹)	Xr (g L ⁻¹)	XT (g L ⁻¹)	Produto (g L ⁻¹)	Proteína (g L ⁻¹)
0,0	30,000	1,150	0,580	0,58	0,000	0,337
1,5	29,396	1,117	0,780	0,78	0,000	0,392
3,0	27,017	0,948	1,112	1,14	0,028	0,512
5,0	26,581	0,632	1,579	1,64	0,061	0,850
6,0	24,705	0,370	1,545	1,64	0,095	0,828
7,0	23,296	0,260	1,508	1,62	0,112	0,774
8,0	21,855	0,218	1,485	1,60	0,115	0,763
9,0	21,185	0,104	1,471	1,58	0,109	0,730
10,0	20,146	0,000	1,444	1,54	0,096	0,676

ANEXO C – Avaliação dos dados cinéticos do cultivo de *C. necator* em cultivo descontínuo

A cinética de crescimento de *Cupriavidus necator* em sistema descontínuo foi estudada em biorreator de 5 L, contendo 4 L do meio de cultura com 30 g L⁻¹ de glicose/frutose como fonte de carbono e 1,15 g L⁻¹ de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. As Figura C.1 a Figura C.5 mostram as cinéticas de cultivo para as temperaturas de 30; 32,5; 35; 37,5 e 40°C, respectivamente. Com exceção do experimento realizado a 40°C, as demais cinéticas mostram que na fase inicial de crescimento celular, houve um rápido consumo de nitrogênio para geração de energia ATP com simultâneo consumo de fonte de carbono, praticamente sem produção de poli(3-hidroxiacetato). Assim, admite-se que toda a energia seja exclusivamente destinada ao crescimento celular, a partir da síntese de proteínas e ácidos nucleicos alcançados pela fonte de nitrogênio em excesso. Somente quando a concentração de fonte de nitrogênio atinge um valor muito baixo, em torno de 0,20 g L⁻¹, foi possível observar uma significativa quantidade de PHB sendo acumulada no interior das células, indicando que *Cupriavidus necator* utiliza-se de mecanismos para assegurar-lhe a sobrevivência na ausência de um nutriente essencial aos processos fermentativos.

Portanto, o processo experimental foi analisado em duas fases. Na primeira fase, ambos os substratos sulfato de amônio e glicose/frutose estão disponíveis para o crescimento da biomassa. A partir do momento em que a concentração de nitrogênio torna-se baixa, a energia disponibilizada pela fonte de carbono torna-se insuficiente para o crescimento celular, o que impõe às células tomarem outra rota metabólica, a de produção de PHB.

A principal característica da segunda fase é a total falta da fonte de nitrogênio e, portanto, quase toda a energia proveniente da fonte de carbono fica destinada à síntese de PHB, sendo uma pequena parcela destinada à manutenção celular.

Para 30°C (ver Figura C.1) verifica-se um período de crescimento celular constante em que a concentração máxima de biomassa alcançou 2,41 g L⁻¹ em 9 h. Durante esse período 1,13 g L⁻¹ de nitrogênio foi consumido de um valor inicial

de $1,15 \text{ g L}^{-1}$, ao mesmo tempo em que $5,71 \text{ g L}^{-1}$ de fonte de carbono foram metabolizadas. A síntese de PHB iniciou-se em cerca de 9 h e alcançou a produção máxima de $3,13 \text{ g L}^{-1}$ em 19,3 h. Com esses valores estima-se um rendimento de PHB de $0,63 \text{ g g}^{-1}$ a partir da fonte de carbono e produtividade de $0,304 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; um acúmulo de biomassa de $0,42 \text{ g g}^{-1}$ por fonte de carbono e de $2,76 \text{ g g}^{-1}$ por fonte de nitrogênio.

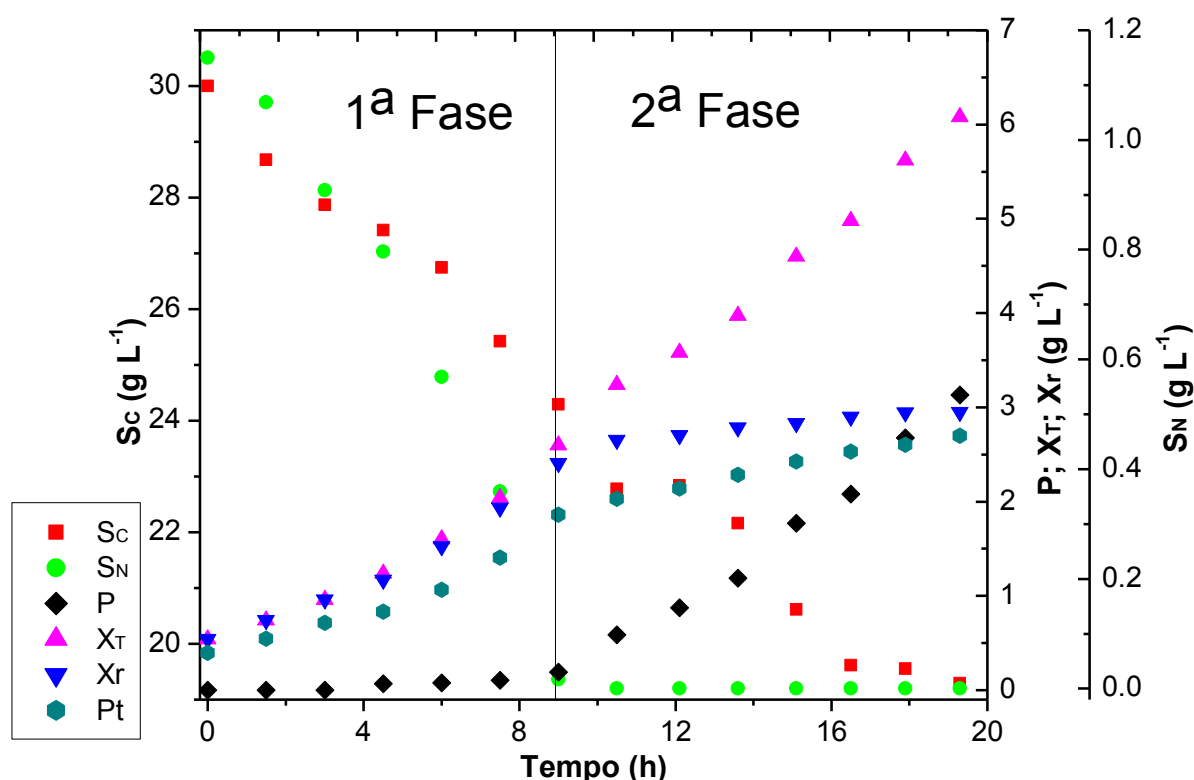


Figura C.1 – Cinética do cultivo de *C. necator* em 30°C

Para 32,5°C (ver Figura C.2) verifica-se um período de crescimento celular constante em que a concentração máxima de biomassa alcançou 3 g L^{-1} em 8,3 h. Durante esse período $0,93 \text{ g L}^{-1}$ de nitrogênio foi consumido de um valor inicial de $1,15 \text{ g L}^{-1}$, ao mesmo tempo em que $8,23 \text{ g L}^{-1}$ de fonte de carbono foram metabolizadas. A síntese de PHB iniciou-se em cerca de 8,3 h e alcançou a produção máxima de $5,01 \text{ g L}^{-1}$ em 18,3 h. Com esses valores estima-se um rendimento de PHB de $0,77 \text{ g g}^{-1}$ a partir da fonte de carbono e produtividade de $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; um acúmulo de biomassa de $0,46 \text{ g g}^{-1}$ por fonte de carbono e de $3,23 \text{ g g}^{-1}$ por fonte de nitrogênio.

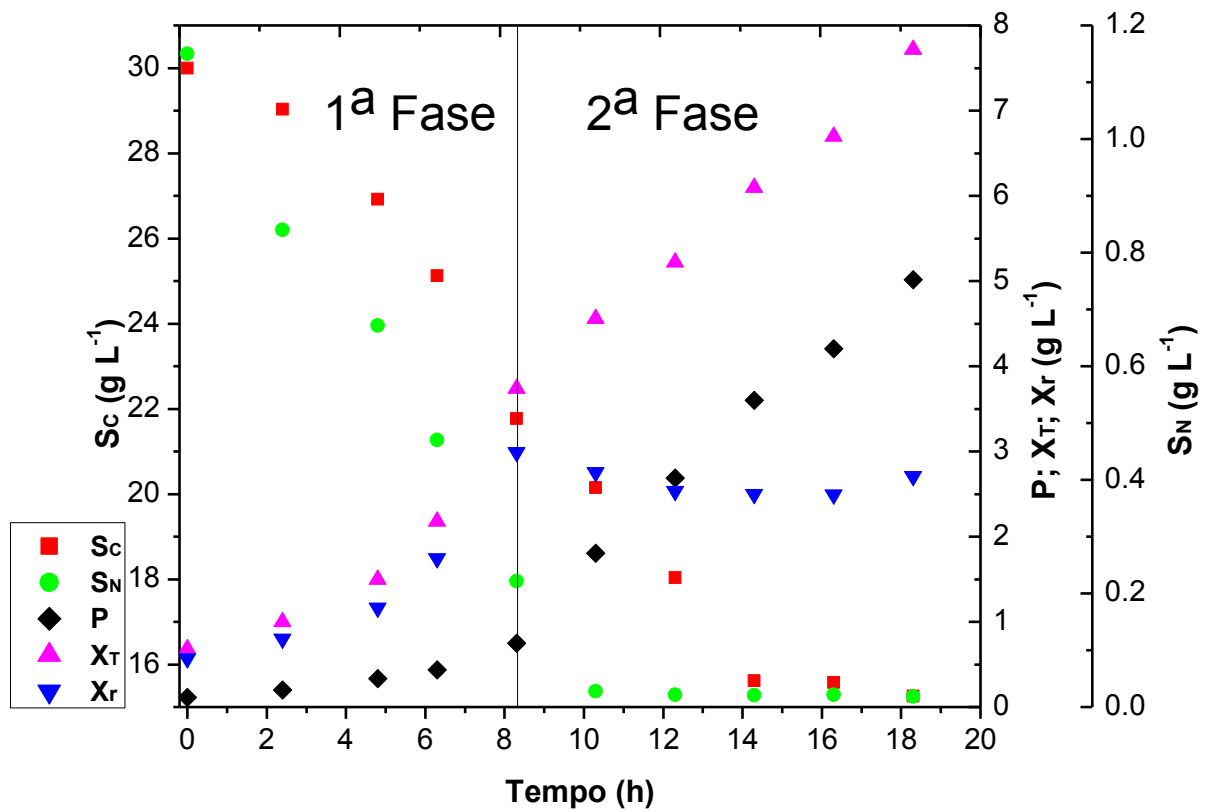


Figura C.2 – Cinética do cultivo de *C. necator* em 32,5°C

Para 35°C (ver Figura C.3) verifica-se um período de crescimento celular constante em que a concentração máxima de biomassa alcançou 1,80 g L⁻¹ em 6,1 h. Durante esse período 0,651 g L⁻¹ de nitrogênio foi consumido de um valor inicial de 1,15 g L⁻¹, ao mesmo tempo em que 3,99 g L⁻¹ de fonte de carbono foram metabolizadas. A síntese de PHB iniciou-se em cerca de 6 h e alcançou a produção máxima de 2,91 g L⁻¹ em 17,8 h. Com esses valores estima-se um rendimento de PHB de 0,39 g g⁻¹ a partir da fonte de carbono e produtividade de 0,248 g L⁻¹ h⁻¹; um acúmulo de biomassa de 0,45 g g⁻¹ por fonte de carbono e de 2,76 g g⁻¹ por fonte de nitrogênio.

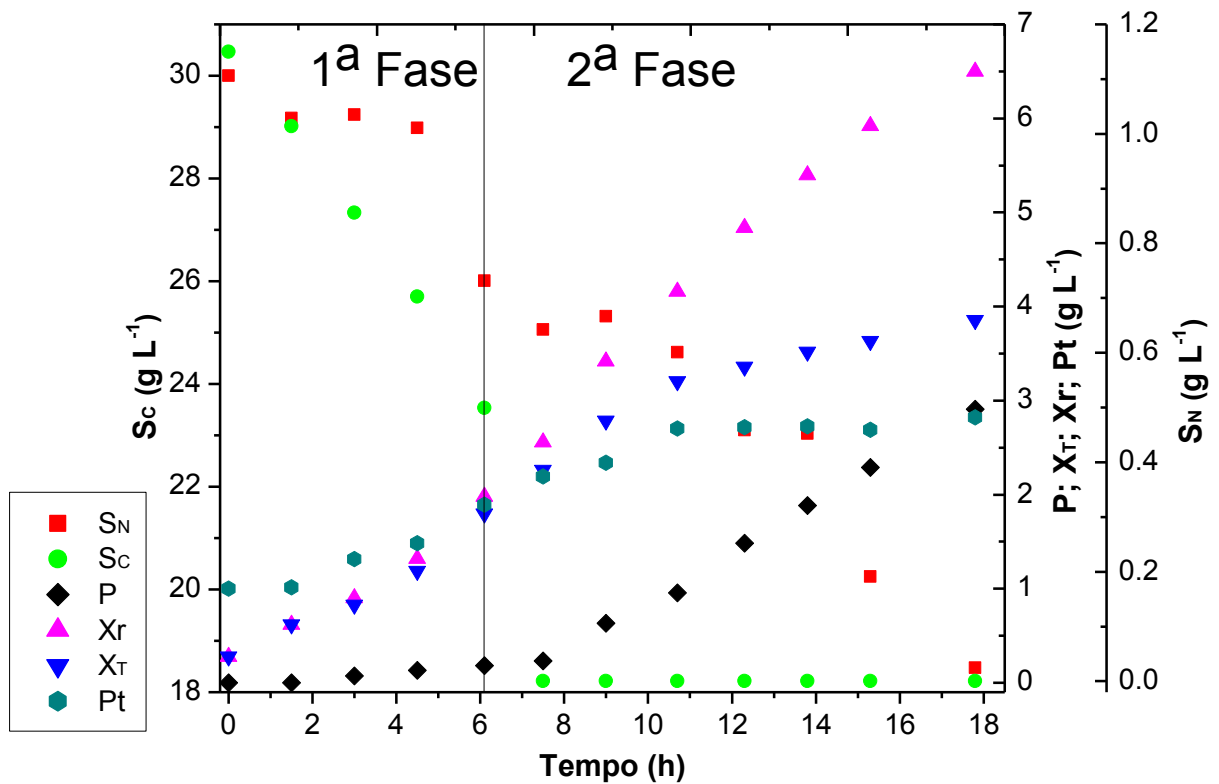


Figura C.3 – Cinética do cultivo de *C. necator* em 35°C

Para 37,5°C (ver Figura C.4) verifica-se um período de crescimento celular constante em que a concentração máxima de biomassa alcançou $2,41 g L^{-1}$ em 8,8 h. Durante esse período $0,93 g L^{-1}$ de nitrogênio foi consumido de um valor inicial de $1,15 g L^{-1}$, ao mesmo tempo em que $6,48 g L^{-1}$ de fonte de carbono foram metabolizadas. A síntese de PHB iniciou-se em cerca de 8,8 h e alcançou a produção máxima de $1,65 g L^{-1}$ em 13,6 h. Com esses valores estima-se um rendimento de PHB de $0,32 g g^{-1}$ a partir da fonte de carbono e produtividade de $0,343 g L^{-1} h^{-1}$; um acúmulo de biomassa de $0,37 g g^{-1}$ por fonte de carbono e de $2,59 g g^{-1}$ por fonte de nitrogênio.

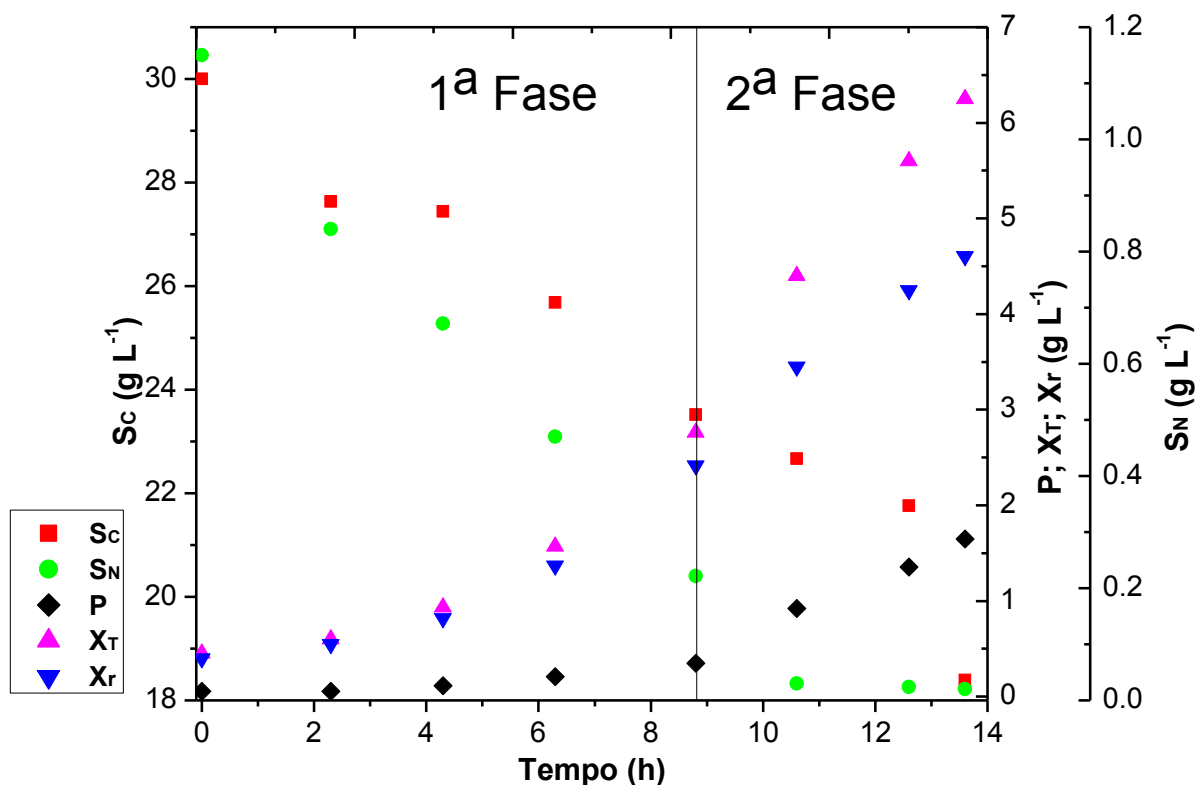


Figura C.4 – Cinética do cultivo de *C. necator* em 37,5°C

Para 40°C (ver Figura C.5) verifica-se um período de crescimento celular constante em que a concentração máxima de biomassa alcançou 1,58 g L⁻¹ em 5 h. Após, ocorreu uma inibição do crescimento celular, que pode ter sido ocasionado pela alta temperatura. Além da inibição, houve também um decréscimo na concentração de biomassa, indicando possível morte celular também devido à temperatura.

A partir da análise dos dados experimentais observou-se grande influência da temperatura na fase de crescimento celular, bem como na fase de produção de PHB.

Mesmo antes da exaustão completa ou em torno do valor crítico de 0,20 g L⁻¹ de nitrogênio, notou-se o acúmulo de uma pequena quantidade de PHB, variando entre 1 e 2 g L⁻¹ a depender da temperatura de operação.

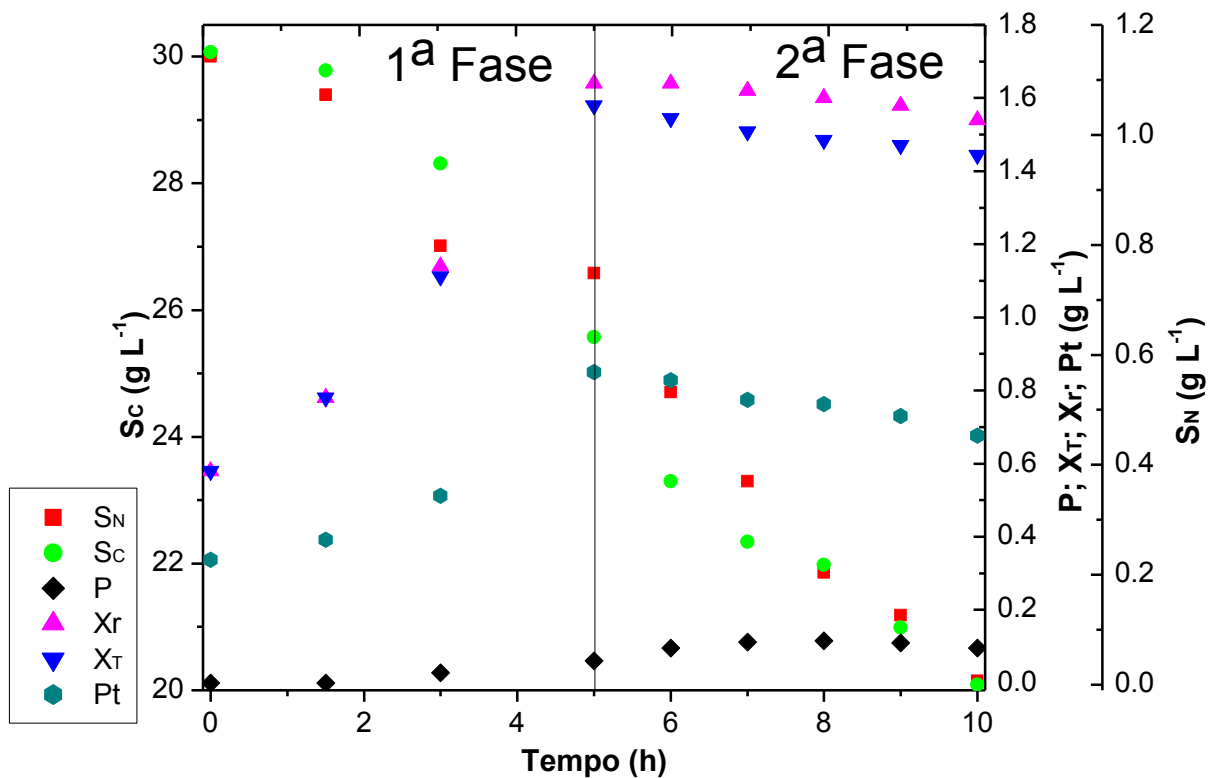


Figura C.5 – Cinética do cultivo de *C. necator* em 40°C

O comportamento da cinética de crescimento celular residual na temperatura de 40°C (ver Figura C.5) mostrou uma queda acentuada na 2ª fase, conferindo insignificante produção de PHB. Portanto, a fermentação em 40°C não será utilizada na etapa de avaliação dos modelos.

Para as demais temperaturas, o comportamento da cinética de crescimento celular residual após a 1ª fase deve mostrar um aumento até atingir um patamar constante. Esse comportamento foi observado em 30°C, e mostrou-se de acordo com o perfil de síntese de proteínas (ver Figura C.1).

Já para as temperaturas de 35 e 37,5°C, mesmo com o cessar da fase de crescimento celular, os dados experimentais mostram que a biomassa continua aumentando. Esse aumento justifica-se pelo acúmulo de componentes lipídicos na parede celular, visto que o perfil de síntese de proteínas mantém-se constante (ver Figura C.3).

Por outro lado, embora a fermentação a 32,5°C tenha apontado um decréscimo na biomassa residual durante a fase de produção de PHB, essa temperatura de cultivo forneceu os melhores resultados de produtividade em

biomassa e em PHB, dados pela 1ª e 2ª fase, respectivamente, e consequentemente implicou os mais altos coeficientes estequiométricos, conforme valores apresentados na Tabela C.1.

Tabela C.1 - Valores estimados pelos dados experimentais do cultivo de *C.necator* 30 g L⁻¹ de glicose/frutose e 1,15 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄

Temp °C	1° Fase						2° Fase		
	X ^{máx} g L ⁻¹	(NH ₄) ₂ SO ₄ (a) g L ⁻¹	Glicose (a) g L ⁻¹	Y _{X/SC} g g ⁻¹	Y _{X/SN} g g ⁻¹	Prod. g h ⁻¹	P ^{máx} g L ⁻¹	Y _{P/SC} g g ⁻¹	Prod. g h ⁻¹
30	2,4	1,13	5,71	0,420	2,76	0,268	3,13	0,63	0,304
32,5	3,0	0,93	8,23	0,460	3,23	0,361	5,01	0,77	0,500
35	1,8	0,65	3,99	0,450	2,76	0,295	2,91	0,39	0,248
37,5	2,4	0,93	6,48	0,370	2,59	0,274	1,65	0,32	0,343
40	1,6	0,52	3,42	0,462	3,05	0,316	0,09	0,01	0,019

(a) Consumo

É importante destacar que os resultados para o cultivo a 37,5°C foram calculados em menor tempo de síntese de PHB, o que a princípio implica maior produtividade (ver Tabela C.1).