

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

THIAGO RAVANINI DO NASCIMENTO

**Modelagem e validação de método computacional da etapa acidogênica do
processamento de soro de leite em reator anaeróbio de leito fixo estruturado**

São Carlos

2021

THIAGO RAVANINI DO NASCIMENTO

Modelagem e validação de método computacional da etapa acidogênica do processamento de soro de leite em reator anaeróbico de leito fixo estruturado

Versão original

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Rogers Ribeiro

São Carlos

2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

N244m Nascimento, Thiago Ravanini
Modelagem e validação de método computacional da etapa acidogênica do processamento de soro de leite em reator anaeróbico de leito fixo estruturado / Thiago Ravanini Nascimento; orientador Rogers Ribeiro. São Carlos, 2021.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Ciências da Engenharia Ambiental -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2021.

1. Modelagem. 2. Fermentação. 3. Fluidodinâmica computacional. 4. ADM1. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Engenheiro **THIAGO RAVANINI DO NASCIMENTO**.

Título da dissertação: "Modelagem e validação de método computacional da etapa acidogênica do processamento de soro de leite em reator anaeróbio de leito fixo estruturado".

Data da defesa: 07/10/2021.

Comissão Julgadora

Resultado

Prof. Dr. **Rogers Ribeiro**

Aprovado

(Orientador)

(Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/FZEA-USP)

Prof. Dr. **Adriano Luiz Tonetti**

Aprovado

(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Prof. Dr. **Rafael Brito de Moura**

Aprovado

(Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL)

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental:

Prof. Associado **Frederico Fabio Mauad**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rogers Ribeiro, que muito me ensinou, contribuiu para meu crescimento científico, intelectual e pessoal.

Ao grande amigo Willame Araujo Cavalcante pela paciência de me ensinar boa parte daquilo que sei hoje. Pelos momentos de descontração e amizade além do comum. Além de uma ampla variedade de palavras e expressões novas para o meu dicionário.

Ao Mateus Brito, Daiane Mirante e Mateus Araújo que me proporcionaram grande crescimento pessoal, profissional, uma quantidade incontável de risadas, sorriso, momentos de apreensão e de diálogo, os quais não pretendo nunca esquecer.

Ao Guilherme de Oliveira, GHDO, que muito acrescentou no meu trabalho e me colocou para pensar incontáveis vezes.

À Liliane Trindade, Maria Eduarda Dias, Paula Takeda, Rafaela Carvalho e Carolina Tavares que me ajudaram pelo menos uma centena de vezes com minhas dúvidas durante meu percurso de mestrado.

À Natalia Alvarez e Karine Machry que me acolheram maravilhosamente bem na UFSCar.

Ao Cássio Minghini, que além de brincalhão, sempre me encantou com suas conversas e histórias.

Ao Prof. Dr. Zaiat cujos aprendizados, formas de pensar e de encarar os fatos me ajudaram a enxergar o funcionamento das coisas de outra maneira.

À Profa. Dra. Giovana “Gica”, cujo alto astral contagiava a todos e ampliava nossos horizontes.

Ao Prof. Dr. Jean Gallo, que junto ao Alef dos Santos e Letícia Satiko tornavam meus momentos de descontração mais divertidos e hilários.

À CAPES por ter me ajudado financeiramente nos meus primeiros meses na cidade de São Carlos.

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido no processo nº 2019/19152-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

NASCIMENTO, T.R.. **Modelagem e validação de método computacional da etapa acidogênica do processamento de soro de leite em reator anaeróbio de leito fixo estruturado**. 2019. 25 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

Águas residuárias e subprodutos da indústria agroalimentar brasileira são mal geridos, no que diz respeito à possibilidade de recuperação energética e produção de compostos de valor agregado a partir da fração orgânica presente. Como exemplo, o soro de leite, subproduto da indústria de laticínios, pode ser aproveitado de várias formas, dentre elas, a produção biológica de hidrogênio e ácidos orgânicos por vias fermentativas, como as de alongamento de cadeia. Paralelamente, avanços computacionais permitem a representação de bioprocessos, buscando prever eficiência, detectar falhas de projeto, propor condições operacionais e variar configurações de biorreatores. O presente trabalho busca validar um método computacional que contemple um modelo biológico descrito por equações matemáticas que representem as etapas fermentativas de bateladas realizadas sobre a fermentação de soro de leite reconstituído. Para isso, utilizar-se-á simulações de Monte Carlo associadas a Cadeia de Markov (MCMC) para minimização de parâmetros cinéticos livres que irão compor o modelo biológico, contendo a rota da β -oxidação reversa, representativa do alongamento de cadeia, calibrando-se o modelo com dados da fermentação obtidos em batelada. Paralelamente foi concebido um modelo 3-D do reator anaeróbio de leito fixo estruturado (AnSTBR) em software comercial COMSOL Multiphysics®, no qual foram realizados estudos de fluidodinâmica computacional simulando a operação de um AnSTBR com os parâmetros obtidos nas bateladas, calibrando-se o modelo com dados experimentais. Por fim, propõe-se acoplar o ADM1 modificado ao modelo 3-D projetado, buscando representar computacionalmente a etapa fermentativa ocorrida no AnSTBR operado continuamente. Os modelos desenvolvidos para representar os experimentos em batelada apresentaram bons ajustes aos dados experimentais, principalmente os modelos com a proposta de reações de alongamento de cadeia, com ressalvas às simulações de biomassa. Os modelos de melhor ajuste foram implementados no *software* COMSOL Multiphysics®, porém mostraram resultados diferentes do esperado devido ao mal funcionamento das equações de pH. O modelo 3-D que representou o processo contínuo foi validado em relação a sua hidrodinâmica, porém por divergências de ativação de rotas metabólicas não se obteve bons ajustes aos dados experimentais, impossibilitando a validação do acoplamento das equações bioquímicas.

Palavras-chave: Modelagem. Fermentação. CFD e ADM1.

ABSTRACT

NASCIMENTO, T.R.. **Computational methods for modelling and validating cheese whey fermentation process in anaerobic structured bed reactor**. 2019. 25 f. Exame de Qualificação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Brazilian agroindustry has an expressive, but not exploited, source of energy in its wastewaters and byproducts. For instance, cheese whey provided from the dairy industry may be exploited in many ways, e.g. biological hydrogen and organic acids production by fermentative pathways. Besides, computational advances on modelling bioprocesses allow predicting efficiency, project critical points, simulating different events after changing operational parameters and/or bulk configurations. The current project aimed to depict the fermentation process of cheese whey conducted in batch reactors, and further inside anaerobic structured bed reactor (AnSTBR) by coupling the following computational methods, i.e. modified Anaerobic Digestion Model no. 1 (ADM1) and computational fluid dynamics (CFD). For modified ADM1 containing reverse β oxidation pathway, Monte Carlo Markov Chain simulations were performed for free parameters determination, and its further calibration by formerly batch kinetic data. Chain elongation model proposal presented good fit to experimental data, with some remarks concerning biomass simulations. Whilst, 3-D AnSTBR CFD model carried operational parameters and bulk configuration, calibrating the model with previous hydrodynamics data. The continuous computational representation of AnSTBR comprised both anaerobic digestion reactions and fluid dynamics simulations simultaneously. Although pH functions did not perform well, preventing the model to reach its best results, besides that, other metabolic pathways were established during AnSTBR experimental procedure reducing model prediction of concerned metabolites.

Key words: Modelling, Fermentation, CFD and ADM1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Maiores produtores de leite no mundo (A); maiores produtores de leite sobre o consumo de produtos lácteos frescos e processados (B).....	26
Figura 2. Representação da cadeia de produção de produtos lácteos a partir do recebimento do leite. Ênfase nos processos de coagulação e posterior aproveitamento das águas residuárias por biorrefinaria laticínios para obtenção de produtos de maior valor agregado ..	29
Figura 3. Representação simplificada das etapas de hidrólise e de fermentação dos processos biológicos anaeróbios de tratamento de resíduos, com hidrogenogênese e metanogênese	31
Figura 4. Proposta de representação de rotas metabólicas previstas no alongamento de cadeia a partir de lactato e etanol como doadores de elétrons. Englobando reações prévias de oxidação descritas como hidrólise e fermentação primária aos principais metabólitos observados no processo de digestão anaeróbia	36
Figura 5. Proposta de desenvolvimento de modelo matemático	40
Figura 6. Proposta de desenvolvimento de modelos matemáticos seguindo as Boas práticas de modelagem.....	44
Figura 7 - Fluxograma das fases envolvidas na condução do presente trabalho. Fase 1. Modificação do ADM1 com base em referencial bibliográfico sobre atualizações do modelo e teoria sobre alongamento de cadeia. Fase 2. Desenvolvimento do modelo de fluidodinâmica computacional. Fase 3. Acoplamento dos modelos bioquímicos ao de fluido dinâmica computacional	49
Figura 8. Modelo experimental das rotinas laboratoriais propostas para obtenção dos dados experimentais. À esquerda, reator anaeróbio de leite estruturado, à direita bateladas experimentais conduzidas em frasco Duran.....	52
Figura 9. Fluxograma de modelos desenvolvidos neste trabalho na plataforma Matlab® a partir dos dados experimentais providos por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019)	69
Figura 10. Modelo conceitual para todos os modelos desenvolvidos com apenas uma biomassa, no qual se envolve acidogênese de lactose e fermentação de lactato pela mesma biomassa.....	70
Figura 11. Comparativo de resultados experimentais (□) com suas respectivas barras de erro, dados simulados no modelo desenvolvido por Branco, Oliveira e Zaiat (2019) (—) e do modelo Controle (—).....	75

Figura 12. Comparativo de resultados experimentais (\square), com suas respectivas barras de erro, e do Modelo X_LTM1 (\blacksquare) do presente trabalho considerando fenômenos de transferência de massa entre fases líquida e gasosa com equação proposta por Batstone (2002)	78
Figura 13. Comparativo de resultados experimentais (\square), com suas respectivas barras de erro, e do modelo de simulação do presente trabalho considerando fenômenos de transferência de massa entre fases líquida e gasosa com equação proposta por Rosèn e Jeppsson (2006), modelo X_LTM2 (\blacksquare)	79
Figura 14. Dispersão de linhas das simulações para determinação de parâmetros do modelo Cont-MCMC pelo método Monte Carlo Cadeias de Markov de 5.000 até 50.000 iterações para as bateladas experimentais conduzidas por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019)	83
Figura 15. Histogramas da distribuição dos valores de acordo com o número de iterações do modelo Cont-MCMC realizado para determinação de parâmetros cinéticos pelas simulações de Monte Carlo Cadeias de Markov das operações em bateladas conduzidas por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019)	84
Figura 16. Resultado das correlações entre as distribuições das médias dos valores determinados para as variáveis livres do modelo Cont-MCMC-5k	86
Figura 17. Comparativo de resultados experimentais (\square), com suas respectivas barras de erro, e o modelo Cont-MCMC 5.000 iterações (\blacksquare).....	89
Figura 18. Resultados das dispersões em linha dos valores aceitos para compor as Cadeias de Markov com 5.000 iterações das simulações do modelo X_Inib.....	92
Figura 19. Distribuição das frequências dos valores que compõem as Cadeias de Markov do modelo considerando inibição por carboidratos, X_Inib, para determinação de parâmetros cinéticos pelo método de Monte Carlo Cadeias de Markov com 5.000 iterações .	93
Figura 20. Resultado das correlações entre as distribuições das médias dos valores determinados para as variáveis livres do modelo X_Inib.....	94
Figura 21. Comparativo de resultados experimentais (\square), com suas respectivas barras de erro, e do modelo X_Inib considerando inibição competitiva (\blacksquare)	96
Figura 22. Resultados das dispersões em linha dos valores aceitos para compor as Cadeias de Markov com 5.000 iterações das simulações do modelo X_2-Ferm	98
Figura 23. Histogramas do modelo X_2-Ferm considerando dois eventos fermentativos para determinação de parâmetros cinéticos pelo método Monte Carlo Cadeias de Markov com 10.000 iterações	99

Figura 24. Comparativo de resultados experimentais (\square), com suas respectivas barras de erro, e do modelo dividido em dois eventos X ₂ -Ferm (\blacksquare) após a determinação dos parâmetros livres por MCMC	100
Figura 25. Modelo conceitual para acidogênese de lactose pela biomassa X _{SU} e fermentação secundária de lactato, alongamento de cadeia de acetato à <i>n</i> -butirato, pela biomassa X _{CE}	103
Figura 26. Comparativo de resultados de consumo de carboidratos experimentais (\square) com suas respectivas barras de erro, hidrólise de carboidratos (\blacksquare) e formação e consumo de carboidratos simples (\blacksquare) do modelo de duas biomassas	109
Figura 27. Média dos quadrados dos resíduos do modelo considerando limitações na transferência de massa para valores iniciais de fermentadores primários.	110
Figura 28. Resultados das dispersões em linha dos valores aceitos para compor as Cadeias de Markov com 5.000 iterações das simulações do modelo 2X_ADM-CE de valor inicial de fermentadores primários - X _{SU,0} 0,15 gDQO L ⁻¹	113
Figura 29. Histogramas das distribuições dos valores aceitos para compor a cadeia de Markov dos parâmetros livres determinados por MCMC com 5.000 iterações para o modelo 2X_ADM-CE, cuja condição inicial para X _{SU,0} é de 0,15 gDQO L ⁻¹	114
Figura 30. Resultado das correlações entre as distribuições das médias dos valores determinados para as variáveis livres do modelo 2X_ADM-CE para valor inicial de fermentadores primários de 0,15 gDQO L ⁻¹ , pelo método estatístico de MCMC	116
Figura 31. Comparativo de resultados entre dados experimentais (\square) com suas respectivas barras de erro e do modelo de duas biomassas considerando a transferência de massa entre fases, 2X_ADM-CE (\blacksquare)	117
Figura 32. Média dos quadrados dos resíduos do modelo desconsiderando limitações na transferência de massa – 2X_ADM-CE/H2 - para valores iniciais de fermentadores primários	120
Figura 33. Distribuição dos 5.000 valores aceitos para compor as Cadeias de Markov das simulações do modelo 2X_ADM-CE/H2 (\blacksquare) de valor inicial de fermentadores primários - X _{SU,0} 0,15 gDQO L ⁻¹ , comparadas ao modelo 2X_ADM-CE (\blacksquare) nas mesmas condições iniciais	123
Figura 34. Histogramas do modelo 2X_ADM-CE/H2 (\blacksquare) com respectiva distribuição normal dos dados para o valor inicial de fermentadores primários (X _{SU,0}) 0,15 gDQO L ⁻¹ , comparado ao modelo 2X_ADM-CE (\blacksquare) nas mesmas condições iniciais para determinação dos parâmetros livres	124

- Figura 35. Resultado das correlações entre as distribuições das médias dos valores determinados para as variáveis livres do modelo de duas biomassas desconsiderando a transferência de massa entre fases para determinação de parâmetros pelo método MCMC.. 126
- Figura 36. Comparativo de resultados entre dados experimentais (\square) obtidos por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019) com suas respectivas barras de erro e do modelo de duas biomassas desconsiderando a transferência de massa entre fases (---) 127
- Figura 37. Gráfico de barras comparativo das médias dos quadrados dos resíduos dos modelos considerando apenas uma biomassa fermentadora para carboidratos e lactato 129
- Figura 38. Comparativo entre os modelos desenvolvidos neste trabalho que apresentaram melhor ajuste aos dados experimentais (\square) de Blanco, Oliveira e Zaiat (2019). Com --- X_Inib, --- Cont-MCMC 5k iterações e --- 2X_ADM-CE/H2 131
- Figura 39. Ambiente de construção de modelos no COMSOL Multiphysics® para criação de espécies químicas que participaram das simulações do modelo X_Inib e designação de suas taxas de consumo/síntese 139
- Figura 40. Comparativo de resultados entre dados experimentais (\square) com suas respectivas barras de erro e os modelos adaptados para COMSOL Multiphysics®: Cont-MCMC-5k (---), X_Inib desenvolvido em Matlab® (---) 140
- Figura 41. Comparativo de resultados entre dados experimentais (\square) com suas respectivas barras de erro e do modelo 2X_ADM-CE/H2 adaptado para o COMSOL Multiphysics® (---) e modelo 2X_ADM-CE/H2 desenvolvido em Matlab® (---) 143
- Figura 42. Representação gráfica do reator acidogênico de leito fixo estruturado e de seu modelo 3-D para modelar a etapa acidogênica em regime contínuo da fermentação de soro de leite 145
- Figura 43. Variação do afluente de carboidratos (---) utilizada no modelo em regime contínuo representado no *software* COMSOL Multiphysics® e a vazão de entrada ($\bullet\bullet\bullet$) empregada para manter o tempo de detenção hidráulico do sistema em 33 h..... 147
- Figura 44. Resultados da simulação da curva de concentração de traçador NaCl (---) conduzidas no *software* COMSOL Multiphysics® e os resultados experimentais (\bullet) obtidos por Peixoto (2012) 148
- Figura 45. Resultados dos modelos 3-D de AnSTBR operado continuamente baseados nos modelos Cont-MCMC-5k (---) e 2X-ADM-CE/H2 (---) 150
- Figura 46. Perfil temporal dos dias 0, 1 e 1,8 e da distribuição espacial de **i.** hidrólise da lactose e **ii.** consumo de açúcares no modelo baseado em 2X-ADM-CE/H2 3-D de reator

AnSTBR desenvolvido na plataforma COMSOL Multiphysics® operando sob TDH de 33 h	
.....	151

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais ácidos carboxílicos de cadeia curta e de cadeia média esperados nos processos de fermentação primária e secundária da plataforma carboxílica	34
Tabela 2. Demanda química de oxigênio dos metabólitos estudados no presente trabalho, bem como as contrastantes de dissociação dos ácidos e da água, constante k_{AB} para conversão de equações algébricas em equações diferenciais ordinárias e a constante de Henry com efeito da temperatura para os gases de interesse. Valores determinados sob pressão de 1,013 bar, constante universal dos gases perfeitos (R) de $0,083145 \text{ bar M}^{-1} \text{ K}^{-1}$, temperatura base e de operação de 298,15 K e temperatura de 315,98 K, respectivamente. Continua	54
Tabela 3. Parâmetros e coeficientes empregados por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019), continua	56
Tabela 4. Parâmetros físicos e de operação empregados nos modelos de acordo com Blanco, Oliveira e Zaiat (2019)	65
Tabela 5. Valores iniciais empregados nos modelos desenvolvidos com base na literatura.....	65
Tabela 6. Fatores de conversão entre números de mol de carbono contidos em grama de demanda química de oxigênio para os principais componentes do modelo.....	66
Tabela 7. Parâmetros químicos de constantes de ionização e das constantes de conversão para equações diferenciais dos metabólitos empregados nos modelos modificados, continua	66
Tabela 8. Matriz de Peterson simplificando os processos e componentes envolvidos no processo fermentativo observado por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019).....	72
Tabela 9. Matriz de Gujer com balanços de carbono e demanda química de oxigênio para os processos explorados no modelo desenvolvido por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019)..	73
Tabela 10. Limites estabelecidos para a função f_{mincon} e algoritmo de Monte Carlo Cadeias de Markov para a determinação de parâmetros livres dos modelos	81
Tabela 11. Resumo dos parâmetros determinados pelo método de Monte Carlo Cadeias de Markov, para o modelo Cont-MCMC de 5.000 até 50.000 iterações por simulação	81
Tabela 12. Resultado do teste de análise de correlação para os parâmetros determinados pelo método de Monte Carlo Cadeias de Markov em com diferentes números de iterações para o modelo Cont-MCMC.....	87
Tabela 13. Resultado da RMSE das simulações do modelo Cont-MCMC com número de iterações variando de 5.000 a 50.000 das variáveis determinadas por MCMC.....	88

Tabela 14. Parâmetros determinados pelo método de Monte Carlo Cadeias de Markov, para o modelo com inibição	91
Tabela 15. Resultado do teste de análise de correlação para os modelos controle modificados para simulação MCMC.	95
Tabela 16. Parâmetros determinados pelo método de Monte Carlo Cadeias de Markov com 5.000 iterações, para o modelo dividido em dois eventos.....	97
Tabela 17. Matriz de Peterson simplificando os processos e componentes envolvidos no processo fermentativo considerando duas biomassas independentes do atual modelo estudado	104
Tabela 18. Matriz de Gujer com balanços de carbono e demanda química de oxigênio para os processos explorados no modelo considerando duas biomassas independentes	105
Tabela 19. Exemplificação da variação de relação entre concentrações iniciais de biomassa fermentadora primária e secundária	107
Tabela 20. Parâmetros livres a serem determinados pelo método MCMC no modelo considerando duas biomassas independentes.....	108
Tabela 21. Valores determinados pelo método de MCMC dos parâmetros empregados no modelo 2X_ADM-CE para as diferentes condições iniciais de biomassas fermentadoras primárias e secundárias. Continua	111
Tabela 22. Resultado do teste de análise de correlação para modelo de duas biomassas considerando limitações na transferência de massa entre fases para simulação MCMC.	115
Tabela 23. Valores determinados pelo método de MCMC dos parâmetros empregados no modelo 2X_ADM-CE para as diferentes condições iniciais de biomassas fermentadoras primárias e secundárias. Nota: $X_{CE,0} = 0.2 - X_{SU,0}$ (gCOD L ⁻¹). Unidades dos parâmetros: $k_{HID, CH}$ (h ⁻¹), k_{MSU} (h ⁻¹), Y_{SU} (gCOD g ⁻¹ DQO), k_{mCE} (h ⁻¹), Y_{CE} (gCOD g ⁻¹ DQO), continua	121
Tabela 24. Resultado do teste de análise de correlação para modelo de duas biomassas desconsiderando a transferência de massa entre fases para simulação MCMC	126
Tabela 25. Resumo dos parâmetros obtidos no presente estudo pelo método de Monte Carlo Cadeias de Markov dos modelos eleitos como melhores ajustes às bateladas experimentais conduzidas por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019).....	130
Tabela 26. Principais reações ocorridas na fermentação de soro de leite.....	133

LISTA DE SIGLAS

AnSTBR	do inglês, <i>Anaerobic Structured Bed Reactor</i> , Reator anaeróbio de leito estruturado;
ADM1	do inglês, <i>Anaerobic digestion model n.1</i> ;
CFD	do inglês, <i>Computational Fluid Dynamics</i> , fluido dinâmica computacional;
CNTP	Condições naturais de temperatura e pressão;
CSTR	do inglês: <i>Continuous stirred tank reactor</i> , reator contínuo de mistura completa;
CW	do inglês <i>cheese whey</i> , soro de leite;
DRAM	do inglês, <i>Delayed Rejection method to the Adaptive Metropolis method</i> ;
GMP	do inglês, <i>Good Modeling Practice</i> , Boas Práticas de Modelagem;
GUI	do inglês, <i>Graphical User Interface</i> , Interface gráfica de Usuário;
HRT	do inglês, <i>Hydraulic Retention Time</i> , Tempo de Retenção Hidráulica;
IWA	do inglês, <i>International Wastewater Association</i> , Associação Internacional de Águas Residuárias;
LAB	do inglês, <i>lactic acid bacteria</i> , bactérias lácticas;
MCMC	do inglês, <i>Markov Chain Monte Carlo</i> , Monte Carlo Cadeias de Markov;
PRF	do inglês, <i>Plug Flow Reactor</i> , reator de fluxo pistonado;
RMSE	do inglês, <i>root mean square of errors</i> , raiz dos quadrados da média dos erros;
UASB	do inglês, <i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket</i> , reator anaeróbio de fluxo ascendente de manta de lodo;
SCW	do inglês, <i>secondary cheese whey</i> , soro de leite secundário;
SWW	do inglês, <i>cheese whey wastewater</i> , águas residuárias da produção de produtos lácteos;

LISTA DE PARÂMETROS

Biológicos

- Y_{su} - coeficiente de rendimento celular a partir de açúcar
- f_{ac-su} - coeficiente estequiométrico de conversão de açúcar em acetato
- f_{H_2-su} - coeficiente estequiométrico de conversão de açúcar em hidrogênio
- f_{lac-su} - coeficiente estequiométrico de conversão de açúcar em lactato
- f_{ac-lac} - coeficiente estequiométrico de conversão de lactato em acetato
- f_{H_2-lac} - coeficiente estequiométrico de conversão de lactato em hidrogênio
- $f_{but-lac}$ - coeficiente estequiométrico de conversão de lactato em *n*-butirato
- k_{mSU} - Velocidade máxima de consumo de carboidratos
- $K_{S_{SU}}$ - Constante de meia saturação do consumo de carboidratos
- $k_{m_{Lac}}$ - Velocidade máxima de consumo de lactato
- $K_{S_{Lac}}$ - Constante de meia saturação do consumo de lactato
- $k_{m_{CE}}$ - Velocidade máxima de consumo de alongamento de cadeia
- $K_{S_{CE}}$ - Constante de meia saturação para alongamento de cadeia

Físicos e químicos

- R - constante universal dos gases
- V_{LIQ} - volume de líquido no reator
- V_{GAS} - volume de gás no headspace do reator
- pH_{UL} - Limite superior de inibição por pH
- pH_{LL} - Limite inferior de inibição por pH
- K_w - constante de dissociação da água
- $T_{operação}$ - Temperatura de operação
- T_{base} - temperatura CNTP
- P_{gasH_2} - pressões parciais de hidrogênio
- P_{gasCO_2} - pressões parciais de dióxido de carbono
- P_{gasH_2O} - pressões parciais de vapor d'água
- $K_{H_{H_2}}$ - constante de Henry para hidrogênio
- $K_{H_{CO_2}}$ - constante de Henry para dióxido de carbono
- k_{La} - coeficiente volumétrico global de transferência gás-líquido do soluto em referência à fase líquida
- k_p - coeficiente de fricção devido ao fluxo de gás restrito pelo orifício de saída

- q_{gas} - vazão de gás
- ε_p - porosidade do leito
- C_{CH} - fator de conversão molC de lactose para gDQO
- C_{SU} - fator de conversão molC de açúcares simples para gDQO
- C_{BU} - fator de conversão molC de *n*-butirato para gDQO
- C_{AC} - fator de conversão molC de acetato para gDQO
- C_{BAC} - fator de conversão molC de organismos fermentadores para gDQO
- C_{H_2} - fator de conversão molC de hidrogênio para gDQO
- C_{LAC} - fator de conversão molC de lactato para gDQO

LISTA DE VARIÁVEIS

S_{ch}	-	concentração de lactose
S_{su}	-	concentração de açúcares simples
S_{ac}	-	concentração de acetato
S_{lac}	-	concentração de lactato
S_{H_2}	-	concentração de gás hidrogênio retido no meio líquido
S_{but}	-	concentração de butirato
X_{su}	-	concentração de organismos fermentadores de açúcares
X_{CE}	-	concentração de organismos alongadores de cadeia
S_{H^+}	-	concentração de prótons
S_{acm}	-	concentração de íons de acetato
S_{lacm}	-	concentração de íons de lactato
S_{bum}	-	concentração de íons de <i>n</i> -butirato
S_{cat}	-	concentração de cátions de bases fortes
S_{an}	-	concentração de ânions de ácidos fortes
S_{IN}	-	concentração de nitrogênio inorgânico
S_{NH_3}	-	concentração de amônia
S_{CO_2}	-	concentração de dióxido de carbono
S_{HCO_2}	-	concentração de ácido carbônico
S_{gasH_2}	-	concentração de gás hidrogênio
S_{gasCO_2}	-	concentração de dióxido de carbono gasoso
S_I	-	concentração de componentes inertes
X_I	-	concentração de particulados inertes

LISTA DE EQUAÇÕES DE TAXA

$\rho_{\text{HID,CH}}$	- taxa de reação de hidrólise da lactose
ρ_{su}	- taxa de reação de consumo de açúcares
ρ_{lac}	- taxa de reação de consumo de lactato
ρ_{CE}	- taxa de reação de consumo de lactato para alongamento de cadeia
$\rho_{\text{dec,Xsu}}$	- taxa de decaimento celular de organismos fermentadores de açúcares
$\rho_{\text{dec,XCE}}$	- taxa de decaimento celular de organismos alongadores de cadeia
$\rho_{\text{A bu}}$	- taxa de dissociação do ácido <i>n</i> -butírico
$\rho_{\text{A ac}}$	- taxa de dissociação do ácido acético
$\rho_{\text{A lac}}$	- taxa de dissociação do ácido láctico
$\rho_{\text{A IN}}$	- taxa de dissociação do ácido amônio
$\rho_{\text{A CO}_2}$	- taxa de dissociação do ácido carbônico
$\rho_{\text{T H}_2}$	- taxa de transferência de hidrogênio entre fases
$\rho_{\text{T CO}_2}$	- taxa de transferência de dióxido de carbono entre fases

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	HIPÓTESES E OBJETIVOS DE TRABALHO	25
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
3.1	Cenário do soro de leite no brasil e no mundo	26
3.2	Fermentação de águas residuárias em bioreatores acidogênicos	30
3.3	A plataforma carboxílica	33
3.4	O alongamento de cadeia e a fermentação de soro de leite	35
3.4.1	Substrato e doadores de elétrons.....	35
3.4.2	Cultura mista ou microbioma aberto	37
3.4.3	Efeito do pH.....	39
3.5	Modelagem matemática.....	40
3.5.1	Modelagem de sistemas biológicos	41
3.5.2	Fluidodinâmica computacional.....	43
3.5.3	Estimativa de parâmetros e validação estatística de modelos de simulação.....	46
4	METODOLOGIA	48
4.1	Dados experimentais.....	50
4.2	Desenvolvimento e modificação dos modelos computacionais	52
4.2.1	Modificação do ADM1	52
4.2.2	Minimização e determinação de parâmetros	60
4.2.3	Método de simulação de Monte Carlo associado às Cadeias de Markov	61
4.2.4	Modelo de fluidodinâmica computacional	62
4.2.5	Parâmetros utilizados nos modelos.....	64
4.2.6	Comparação dos dados simulados e experimentais	67
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1	Modelos considerando apenas uma biomassa	69
5.1.1	Modificação do ADM1 em MATLAB®, modelo controle, X_Cont	74
5.1.2	Modificação do ADM1 em MATLAB®, modelo controle com transferência de massa entre fases, X_LTM1 e X_LTM2	77
5.1.3	Modificação do ADM1 em MATLAB® para determinação de parâmetros por simulações de Monte Carlo Cadeias de Markov – modelo Cont-MCMC	80

5.1.4	Modificação do ADM1 na plataforma MATLAB® para inclusão de inibição e determinação de parâmetros por simulações de Monte Carlo associado às Cadeias de Markov – modelo X_INIB	91
5.1.5	Modificação do ADM1 na plataforma MATLAB® para determinação de parâmetros por simulações de Monte Carlo associado às Cadeias de Markov considerando dois eventos e inibição, X_2-Ferm.....	96
5.2	Modelos considerando biomassa alongadora de cadeia	102
5.2.1	Modificação do ADM1 na plataforma MATLAB® para duas biomassas independentes, desconsiderando os efeitos de transferência de massa entre fases, 2X_ADM-CE/H2	106
5.2.2	Modelo considerando efeitos de transferência de massa entre fases - 2X_ADM-CE	109
5.2.3	Modelo desconsiderando efeitos de transferência de massa entre fases - 2X_ADM-CE/H2	120
5.3	Comparativo entre os modelos de melhor ajuste.....	128
5.4	Adaptação dos modelos baseados em ADM1, X_Inib e 2X_ADM-CE/H2 no <i>software</i> COMSOL Multiphysics.....	138
5.4.1	COMSOL Multiphysics®, simulação do modelo Cont-MCMC-5k e X_Inib em geometria 0-D.....	138
5.4.2	COMSOL Multiphysics®, simulação do modelo 2X_ADM-CE/H2 em geometria 0-D	142
5.5	Desenvolvimento do modelo em regime contínuo em COMSOL Multiphysics® para método de fluidodinâmica computacional acoplada à cinética bioquímica	144
6	CONCLUSÃO	155
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	156
	REFERÊNCIAS	157
	ANEXO 1	169
	ANEXO 2.....	175
	ANEXO 3.....	176

1 INTRODUÇÃO

A busca por melhorias nas condições ambientais do Brasil enfrenta grandes desafios na destinação adequada de resíduos do maior setor econômico do país, o agroindustrial. A indústria de laticínios, por exemplo, teve até o ano de 2012 cerca de 40% do soro de leite descartado de maneira inadequada, principalmente por pequenos e médios produtores que não tinham condições de utilizar este subproduto no preparo de outros gêneros alimentícios ou providenciar tratamento apropriado para redução de impactos ambientais (NUNES *et al.*, 2018).

O aproveitamento de soro de leite pode ocorrer em três setores: **i.** alimentação animal, irrigação e produção de outros alimentos lácteos (ex. bebidas lácteas fermentadas), os quais deveriam ser priorizados a fim de prezar-se pela segurança alimentar; **ii.** tratamento químico ou físico-químico para a recuperação da porção proteica e/ou lactose; e **iii.** tratamento biológico das águas residuárias, no qual busca-se a conversão biológica em outros subprodutos, como ácidos orgânicos e biogás, i.e., hidrogênio (H₂) e metano (CHATZIPASCHALI; STAMATIS, 2012; BATISTA; CAMPOS; SILVESTRE, 2018).

Nos anos 70, durante a crise energética, considerava-se o H₂ como combustível do futuro, por possuir formas mais limpas de produção e sua queima resultar na não liberação de gases de efeito estufa e seus temerosos efeitos sobre o aquecimento global (BENEMANN, 1996). O soro de leite, por apresentar altas concentrações de matéria orgânica, possibilitam por meio dos processos de tratamento biológico obtenção de elevada produção de H₂, não restringindo a geração de outros subprodutos, como etanol e ácidos carboxílicos de cadeia curta (DAVILA-VAZQUEZ *et al.*, 2009; PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012; PERNA *et al.*, 2013; CASTELLÓ *et al.*, 2018; ASUNIS *et al.*, 2019; BLANCO; OLIVEIRA; ZAIAT, 2019).

O papel dos ácidos carboxílicos sintetizados durante os processos biológicos anaeróbios foi muito estudado e suas principais rotas de formação já são bem estabelecidas na literatura (RITTMANN; MCCARTY, 2001; KHANAL, 2008). Além disso, uma compreensão mais profunda acerca de microrganismos, síntese de ácidos carboxílicos, conceitos cinéticos e termodinâmicos de rotas metabólicas e a influência de condições operacionais, permitem a exploração de outras alternativas de aproveitamento destes subprodutos.

A plataforma carboxílica é um sistema que elenca as possibilidades de aproveitamento de vários subprodutos, considerando os fatores citados anteriormente (ANGENENT *et al.*, 2004; AGLER *et al.*, 2011). Tal estratégia apresenta vantagens na recuperação de maiores parcelas de carbono presentes nas águas residuárias, proporcionando maior controle no direcionamento da obtenção de biogás, ácidos orgânicos e biocombustíveis de maior valor

agregado. Isto permite às biorrefinarias não somente redução de impactos ambientais, mas diversificação de receita e ampliação de *portfolio* (SARMA *et al.*, 2015; CHANDRA *et al.*, 2018). O que pode ser de interesse aos laticínios, uma vez que em 2014 o lactato, principal ácido dissociado encontrado na fermentação de soro de leite, foi sugerido como participante do processo de alongamento de cadeia (SPIRITO *et al.*, 2014). E em 2016, teve sua conversão à ácidos graxos de cadeia média comprovada pela primeira vez em reatores contínuos (KUCEK; NGUYEN; ANGENENT, 2016). No entanto, ao se tratar se sistemas biológicos, muitas vezes compostos por microbiomas abertos, o controle sobre condições operacionais precisa ser bastante rígido a fim de evitar-se alteração das rotas metabólicas de interesse, uma vez que estes sistemas são bastante sensíveis a alterações de parâmetros operacionais como pH, temperatura, vazão e disponibilidade de substrato (AGLER *et al.*, 2011, 2012).

Sistemas reais como os de tratamento de resíduos com ênfase na geração de biogás e outros subprodutos tem se tornado cada vez mais presente nos âmbitos acadêmicos e na concepção de projetos, graças à modelagem computacional (GIRALDO-GOMEZ, 1991; BATSTONE *et al.*, 2002). Por meio de modelos matemáticos que descrevem as rotas metabólicas, fenômenos físicos e químicos, pode-se aprender muito acerca das dinâmicas dos processos. Com esse intuito, foi desenvolvido em 2002 pela Associação Internacional de Águas (IWA – do inglês, *International Water Association*) o primeiro modelo de digestão anaeróbia (ADM1 – do inglês *Anaerobic Digestion Model N°1*). O ADM1 tem sido desde então, o modelo mais aceito pelos pesquisadores e diversos incrementos como a inserção de modelos de inibição (NORMAK *et al.*, 2015), precipitação de minerais que podem calcificar e levar a entupimento de reatores, além de consumo de nutrientes que atuem como fatores essenciais de crescimento microbiano (FLORES-ALSINA *et al.*, 2016).

Por fim, para complementar o modelo ADM1, sua implementação em modelos de fluidodinâmica computacional (CFD, do inglês *computational fluid dynamics*) pode vir a trazer mais verossimilhança ao se compararem os modelos aos biorreatores operados em laboratórios ou mesmo aos em escala plena. No entanto, essa aplicação ainda exige grande esforço de processamento computacional. Ademais, a determinação de parâmetros livres pode ser realizada por modelos matemático-estatísticos, como o modelo de Monte Carlo associado às Cadeias de Markov (MCMC). Este método permite ao modelador maior controle na determinação destes parâmetros e na validação de seus modelos. Uma vez que modelos já bem estabelecidos e validados, eles podem ser ponto de partida para ampliação de projetos e/ou combinação de processos, para variadas águas residuárias ou subprodutos já caracterizados,

como o soro de leite (MONTECCHIO; YUAN; MALPEI, 2018; BLANCO; OLIVEIRA; ZAIAT, 2019; B-ARROYO *et al.*, 2020; GEHRING *et al.*, 2020).

De modo a verificar a aplicação dos métodos computacionais nos processos anaeróbios, este trabalho propõe modelos matemáticos que representem as etapas fermentativas do processamento de soro de leite reconstituído em reatores batelada para, em seguida integrá-lo a um modelo de fluidodinâmica computacional que represente um reator anaeróbio de leito fixo estruturado operado em regime contínuo.

2 HIPÓTESES E OBJETIVOS DE TRABALHO

A principal hipótese deste trabalho refere-se a: “a fluidodinâmica computacional acoplada às simulações físico-químicas e bioquímicas conduzidas no Modelo de Digestão Anaeróbia nº1 modificado (ADM1), representa o processamento acidogênico de soro de leite em um reator anaeróbio de leito estruturado”. Sendo assim, traça-se como sub-hipóteses as seguintes colocações: **i.** a otimização dos parâmetros livres no modelo baseado em ADM1 e sua validação estatística confere maior verossimilhança na validação cruzada com dados experimentais do reator operado em batelada; e **ii.** o modelo de fluidodinâmica computacional representa o escoamento no reator anaeróbio de leito estruturado operado continuamente e suas reações bioquímicas.

Desta forma, como objetivos deste trabalho, pode-se elencar:

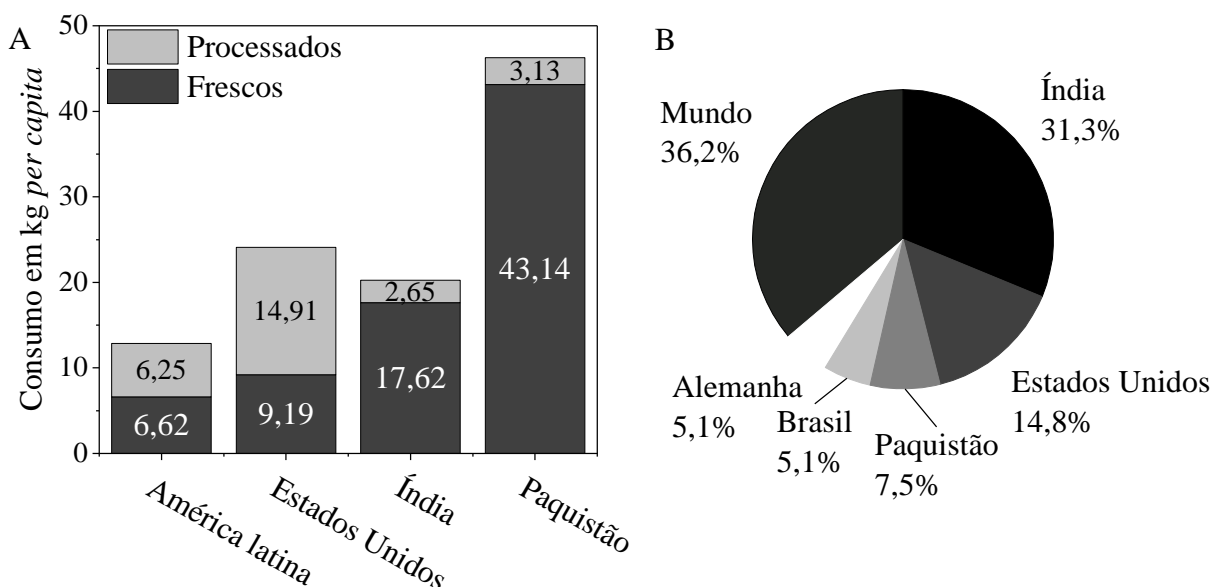
- Desenvolver modelos baseados em ADM1 (modelos ADM1 modificado) com rotas representativas das etapas de fermentação de soro de leite reconstituído e calibrar o modelo;
- Determinar estatisticamente os parâmetros livres de crescimento de biomassa microbiana, otimizando o modelo ADM1;
- Propor um modelo computacional do reator anaeróbio de leito estruturado e validá-lo a partir de simulações de fluidodinâmica computacional com a operação do reator anaeróbio de leito estruturado nas condições especificadas por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019);
- Validar o método computacional (ADM1 modificado acoplado ao modelo de fluidodinâmica computacional), que busca representar os mecanismos fermentativos em reator anaeróbio de leito estruturado alimentado com soro de leite.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cenário do soro de leite no brasil e no mundo

O leite bovino é um alimento de alto valor energético, rico em carboidratos (lactose, em torno de 45% em base seca), equilibrado entre gorduras e proteínas (cerca de 28% ambas, em base seca), e também rico em micronutrientes como cálcio e potássio. Atualmente, a produção mundial de leite superou a marca de 643 milhões de toneladas por ano, número crescente no decorrer dos anos (EMBRAPA, 2018). Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), o Brasil figura como quarto maior produtor mundial de leite (33 milhões de toneladas, 5%), atrás da Índia (201 milhões de toneladas, 31,26%), Estados Unidos da América (95 milhões de toneladas, 14,77%) e Paquistão (48, 7,47%) (Figura 1) (OECE/FAO, 2019). A demanda por produtos lácteos como iogurtes, sorvetes, manteiga, e principalmente, queijos acompanha a crescente produção de leite no decorrer dos anos. Em algumas culturas, o consumo de leite é bastante presente, já em outras, os derivados são mais frequentemente encontrados na mesa do consumidor (Figura 1).

Figura 1. Maiores produtores de leite no mundo (A); maiores produtores de leite sobre o consumo de produtos lácteos frescos e processados (B)



Fonte: adaptado de EMBRAPA (2018) e OECE/FAO (2019), respectivamente.

A produção de lácteos consiste basicamente na concentração das porções proteica e/ou gordurosa do leite. Como cerca de 88% em massa do leite é constituída de água, processos

físicos, químicos ou enzimáticos são empregados para que haja concentração dos nutrientes e outros ingredientes. Considerando-se a produção de queijos, o uso de enzimas funciona como agentes coagulantes das proteínas, as quais ao formarem aglomerados proteicos, o coalho. O restante dos componentes não retidos no coalho, como lactose e gorduras são removidos após a separação da parte sólida e líquida, denominada soro de leite (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013).

O soro de leite primário (CW – do inglês *cheese whey*) apresenta variação em suas características físico-químicas, pois dependem de fatores como a qualidade e fonte da matéria-prima (de qual mamífero foi extraído), tecnologia e eficiência do processo de fabricação. Estima-se que cerca de 20,7 milhões de toneladas de queijo sejam consumidas por ano no mundo (SHAHBANDEH, 2020) e, em média são utilizados de 10 a 15 litros de leite para produzir 1kg de queijo, implicando em um volume estimado de CW produzido anualmente em torno de 258,8 milhões de metros cúbicos (ROCHA; GUERRA, 2020).

O CW é composto majoritariamente de lactose, proteínas, gorduras hidrossolúveis e sais minerais decorrentes do processo de coagulação das porções proteicas (caseínas). Normalmente, apresenta-se sob duas formas, o ácido (pH em torno de 5) e o doce (pH entre 6 e 7). Por ainda apresentar alto valor nutricional este subproduto pode ser amplamente aproveitado pela indústria para a produção de queijos de coagulação ácida, como *cottage* e ricota, panificação, confeitaria, produção de embutidos (Figura 2). Por meio de processos mais avançados de separação e purificação as indústrias farmacêutica e de cosméticos também podem se beneficiar deste subproduto (PRAZERES; CARVALHO; RIVAS, 2012; AHMAD *et al.*, 2019; ROCHA; GUERRA, 2020).

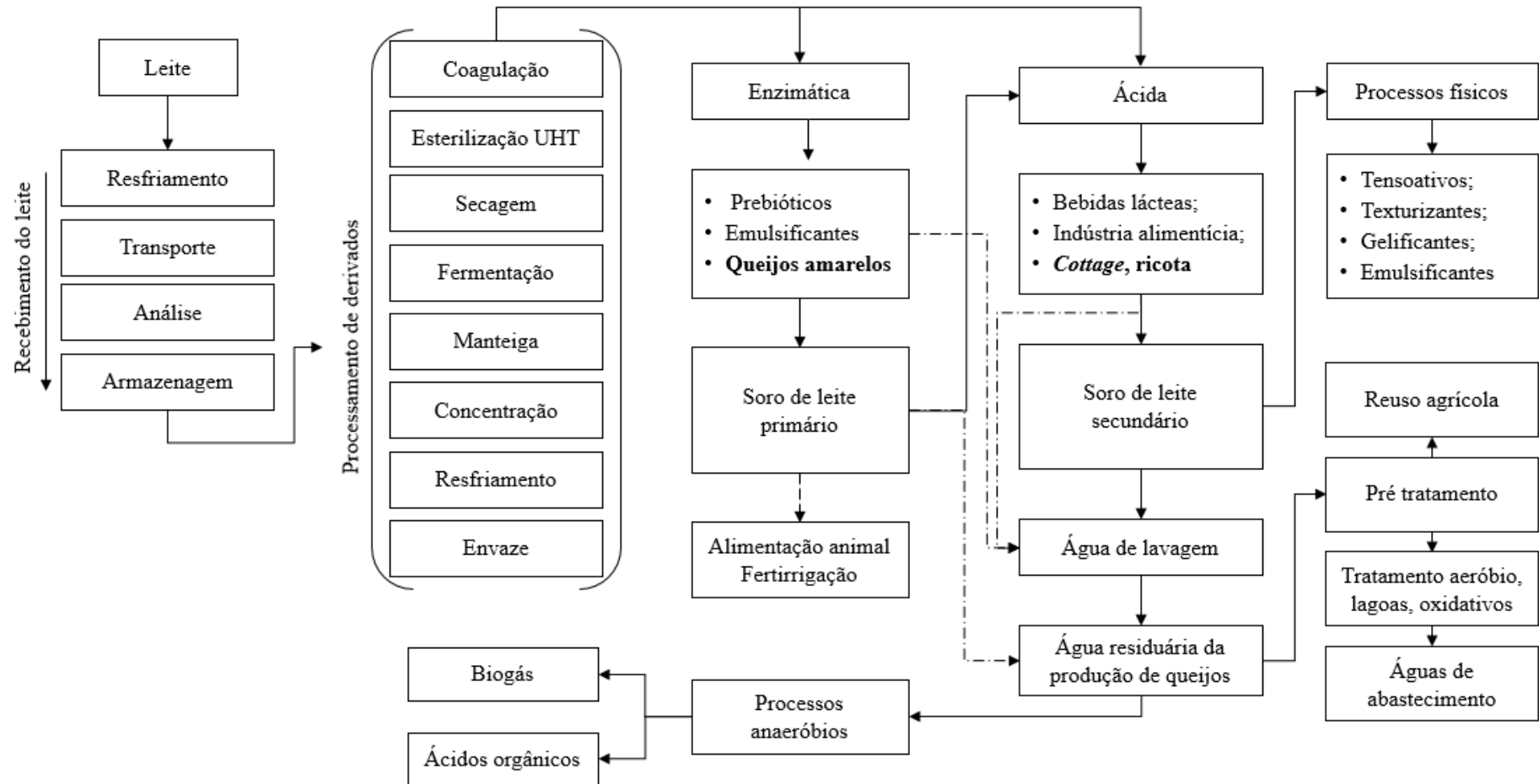
Quando há o aproveitamento do CW, uma segunda linha de água residuária é formada, o soro de leite secundário (SCW – do inglês *secondary cheese whey*). Este apresenta normalmente pH inferior ao CW, e menor riqueza nutricional, restando apenas menores parcelas de proteínas e gorduras, sendo a lactose o nutriente mais abundante neste subproduto. Até esse ponto, o SCW ainda pode ser aproveitado pela indústria, tanto alimentícia para produção de bebidas lácteas, quanto para alimentação animal (Figura 2). Por fim, restam as águas residuárias da produção de derivados lácteos (CWW – do inglês *cheese whey wastewater*). As características desse resíduo são bastante variáveis pois dependem de cada indústria separar ou não as águas de enxague dos produtos finais de suas linhas de produção (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013). É importante ressaltar que todas as três devem cumprir com exigências ambientais no que tange à correta deposição, pois devido à presença

de aminoácidos nitrogenados e fosfatos, a eutrofização de cursos de água pode ocorrer (Figura 2).

O tratamento biológico destes efluentes é comumente sugerido, evidenciando-se os processos anaeróbios por não dependerem de aeradores, por se tratarem de sistemas fechados não sem emanar odores nos arredores, produzirem menores quantidades de sólidos, necessitarem de menos micronutrientes e apresentarem maior resistência a variação de nutrientes nas águas residuárias. Outro fator positivo a ser considerado é a possível exploração energética do biogás sintetizado no processo anaeróbio como uma forma de geração de energia elétrica, tornando o processo anaeróbio menos oneroso (RITTMANN; MCCARTY, 2001; ANTONOPOULOU *et al.*, 2008; VENETSANEAS *et al.*, 2009; CHATZIPASCHALI; STAMATIS, 2012) (Figura 2).

Os processos anaeróbios também permitem a exploração de produtos líquidos como, solventes (metanol, etanol, acetona dentre outros), ácidos orgânicos de cadeia curta (acetato, butirato, lactato, propionato e valerato) e ácidos orgânicos de cadeia média (capoato, heptanoato e caprilato) (AGLER *et al.*, 2012). Estes ácidos sintetizados durante as etapas fermentativas podem ser separados e purificados, e por apresentam alto valor agregado, e têm sido largamente estudadas as condições de operação para aumento da eficiência dos processos fermentativos para um dia tornarem-se uma forma viável de valorização das CSWW (KUCEK; NGUYEN; ANGENENT, 2016; SATPATHY *et al.*, 2016a; CHANDRA *et al.*, 2018) (Figura 2).

Figura 2. Representação da cadeia de produção de produtos lácteos a partir do recebimento do leite. Ênfase nos processos de coagulação e posterior aproveitamento das águas residuárias por biorrefinaria laticínios para obtenção de produtos de maior valor agregado



Fonte: adaptado de Fernando e colaboradores, (2006); Carvalho, Prazeres e Rivas, (2013); Chandra e colaboradores, (2018); Rocha e Guerra, (2020).

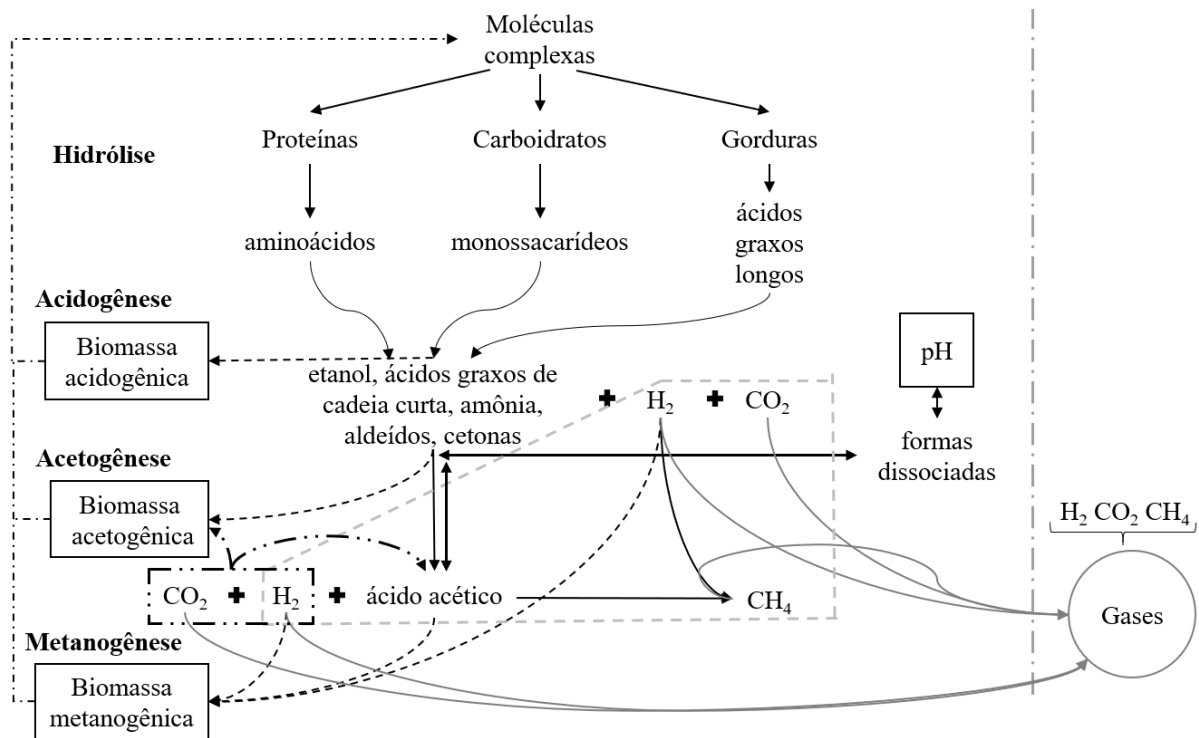
3.2 Fermentação de águas residuárias em bioreatores acidogênicos

A fermentação é apenas uma das fases do tratamento anaeróbio de efluentes, o qual busca dar ênfase nas etapas seguintes, a de acetogênese e metanogênese. O processo de digestão anaeróbia começa pela etapa de hidrólise de moléculas complexas presentes nas águas residuárias. Nesta etapa, enzimas atuam na degradação de macromoléculas em seus respectivos monômeros: carboidratos em açúcares simples, proteínas em aminoácidos e gorduras em ácidos graxos de cadeia longa (Figura 3). Esta etapa é relativamente lenta e de baixo crescimento celular, além disso, muitos autores a consideram como uma reação química de primeira ordem, com constante de taxa de consumo variando entre 0,3 a 1 d⁻¹, dependendo do pH e temperatura do meio (GIRALDO-GOMEZ, 1991; BATSTONE *et al.*, 2002).

Durante a etapa fermentativa em sistemas anaeróbios, microrganismos são capazes de obter energia utilizando compostos orgânicos como doadores e aceptores de elétrons durante seu metabolismo (RITTMANN; MCCARTY, 2001). Portanto, com a hidrólise de moléculas complexas, os nutrientes simples são fermentados a espécies químicas mais reduzidas. Assim como durante a hidrólise, pH e temperatura são condicionantes dessas reações bioquímicas. No entanto, por microrganismos estarem envolvidos neste processo, outros fatores devem ser considerados, como concentração e pressões parciais de H₂, geometria e dinâmica dos fluidos no interior de reatores (ELBESHBISHY *et al.*, 2017) (Figura 3).

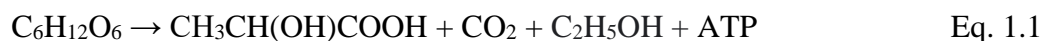
A etapa fermentativa comumente recebe o nome de etapa acidogênica devido à formação majoritária destas espécies ácidas no meio (Figura 3). Além dos fatores citados anteriormente, a composição das diferentes espécies de microrganismos no meio – microbioma – também apresenta papel relevante no direcionamento da formação de produtos (ANGENENT *et al.*, 2016). Por exemplo, CW apresenta uma concentração inicial de microrganismos, como bactérias lácticas, as quais são capazes de desempenhar duas principais rotas de fermentação a homolática e a heterolática. Na primeira, os açúcares simples são convertidos apenas em ácido láctico, já a heterolática, que além de produzir ácido láctico, pode contribuir com a produção de etanol ou ácido acético (SIKORA *et al.*, 2013).

Figura 3. Representação simplificada das etapas de hidrólise e de fermentação dos processos biológicos anaeróbios de tratamento de resíduos, com hidrogenogênese e metanogênese



Fonte: adaptado de BATSTONE *et al.*, (2002) e BATSTONE *et al.*, (2015).

As rotas de fermentação lácticas são observáveis em diversos efluentes além do soro de leite, uma vez que as bactérias lácticas (LAB) estão presentes em resíduos da matriz agroindustrial. Por não ser a rota de maior rendimento energético, a fermentação heterolática tem sido descrita como principal forma das LAB lidarem com baixas concentrações de substrato no meio. A partir de cada mol de glicose, apenas um mol de ácido láctico é formado, e se a rota metabólica se estende até a formação de etanol, o rendimento energético cai de dois ATPs para um ATP por mol de glicose consumida (Eq. 1.1) (CASTILLO MARTINEZ *et al.*, 2013). No entanto, se a rota metabólica for direcionada à via que proporciona a formação de um mol de ácido láctico e um mol de ácido acético, trata-se de uma estratégia metabólica eficiente, pois possibilita a regeneração de moléculas NADH e obtenção de maior rendimento energético (FUESS *et al.*, 2018; MENEZES; SILVA, 2019) (Eq. 1.2). Evidencia-se também que a formação de consórcios de LAB heteroláticas e outras bactérias permitem maiores rendimentos na produção de H₂, junto a síntese de ácido butírico (CHOJNACKA *et al.*, 2011; SIKORA *et al.*, 2013).



Enquanto as rotas heteroláticas possibilitam a sobrevivência de LAB sob baixo crescimento celular e capacidade de utilização de diversos substratos (ZAUNMÜLLER *et al.*, 2006), a rota homolática é descrita como a principal via de crescimento populacional das LAB. Trata-se da síntese de dois mols de ácido láctico para cada mol de glicose consumido (Eq. 2). Como a produção de ácido láctico é demasiada rápida, espera-se o rápido abaixamento do pH do meio, sendo que a rota se sustenta até em torno de pH 4. E tem sua velocidade de formação maximizada entre pH 5 e 7 (FU; MATHEWS, 1999; CONTRERAS-DÁVILA *et al.*, 2020).



Apesar da alta eficiência de tratamentos anaeróbios na remoção de nutrientes das águas residuárias de soro de leite, com remoção de matéria orgânica em reatores de simples estágio na faixa de 85 a 98% (medidas feitas em base de demanda química de oxigênio – DQO) (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013). A rápida acidificação do soro de leite induz instabilidade ao processo, podendo levar à inibição da metanogênese, diminuindo não somente a rentabilidade do tratamento, mas também sua eficiência em remoção de matéria orgânica. Pois nesta fase, o microbioma especializado na produção de metano atua de forma mais lenta, e em faixas restritivas de pH e pressões de H₂ (ANTONOPOULOU *et al.*, 2008; CHATZIPASCHALI; STAMATIS, 2012).

Diante da instabilidade dos processos de simples estágio no tratamento biológico anaeróbio de soro de leite, estudou-se a viabilidade de conduzir o processo de acidogênese separado do metanogênico. Uma vez que o microbioma envolvido em cada processo desempenha características distintas e variáveis de acordo com as condições ambientais. Conduzir os processos em reatores diferentes implicou na redução no tempo em que a água residuária circularia pelo reator até haver acidificação parcial dos nutrientes no primeiro reator, redução de tamanho de ambos reatores, maiores rendimentos tanto de H₂ produzido na fase acidogênica quanto de metano sintetizado no segundo reator (VENETSANEAS *et al.*, 2009; COTA-NAVARRO *et al.*, 2011; CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013; DIAMANTIS *et al.*, 2014).

Ambas as fases da digestão anaeróbia estão sujeitas aos fenômenos de transporte que permitem a interação entre substratos e microrganismos. As configurações de operação do

regime de escoamento de biorreatores fazem toda diferença nos cálculos de projeção e na performance desses reatores. Davila-Vazquez e colaboradores (2008) conduziram extenso estudo em reatores completamente agitados comparando os rendimentos com diferentes substratos (lactose, glicose e soro de leite) em variados pH. Os autores obtiveram 3,1 mols H₂ mol lactose⁻¹ sob uma alimentação contínua de 15 g L⁻¹ deste substrato em pH 6. Em bateladas experimentais, Azbar e colaboradores (2009) obtiveram rendimento de 2,3, 2,5 e 2,5 mols H₂ mol lactose⁻¹ em diferentes pH, respectivamente 5,5, 6,5 e 7,5. Em reator de escoamento tipo pistonado, Blanco e colaboradores (2019) separaram os processos em dois estágios e conduziram a acidogênese em um reator de leito estruturado, verificando um pico de máximo rendimento de H₂ de 2,4 mols H₂ mol lactose⁻¹, e posteriormente uma produção média de 1,4 ± 0,7 mols H₂ mol lactose⁻¹.

Atualmente, o valor de ácidos orgânicos têm se mostrado os mais atrativos dos subprodutos dos processos anaeróbios, e tendem a se valorizar ainda mais, porém, apesar de serem de fácil obtenção via síntese metabólica, os processos de separação ainda são onerosos (FERNANDO *et al.*, 2006; NAPOLI *et al.*, 2011; DE GROOF *et al.*, 2019). O conceito de plataforma carboxílica busca reunir as possíveis formas de exploração biotecnológica de subprodutos e resíduos da indústria, por meio do uso de culturas microbiológicas mistas. Elencando produtos por ordem de rendimento energético e viabilidade das reações fermentativas, ela indica estratégias mais rentáveis de aproveitamento de efluentes (AGLER *et al.*, 2011).

3.3 A plataforma carboxílica

Enquanto a concepção da digestão anaeróbia é voltada para a remoção de nutrientes e recuperação de carbono na forma de metano, a plataforma carboxílica vislumbra majoritariamente a síntese de ácidos carboxílicos (Tabela 1). Utilizando principalmente carboidratos como principais substratos, os primeiros processos previstos na fermentação primária envolvem a formação de ácidos graxos de cadeia curta (de 2 a 4 carbonos, acético, propiônico, láctico e butírico), H₂ e gás carbônico. Em seguida, há a possibilidade de combinação entre os produtos da fermentação primária, dando origem a etapa de fermentação secundária, a qual depende de vários fatores, mas primordialmente do microbioma que se estabelece no sistema (AGLER *et al.*, 2011).

Tabela 1. Principais ácidos carboxílicos de cadeia curta e de cadeia média esperados nos processos de fermentação primária e secundária da plataforma carboxílica

Nome comum	Símbolo	Fórmula química	pKa	Massa molar (g mol ⁻¹)	Equivalente DQO (g g ⁻¹ DQO)
Acético	HAc	C ₂ H ₄ O ₂	4,76	60,1	1,07
Propiônico	HProp	C ₃ H ₆ O ₂	4,87	74,1	1,51
Lático	HLac	C ₃ H ₆ O ₃	3,86	90,08	1,32
<i>n</i> -Butírico	HBut	C ₄ H ₈ O ₂	4,82	88,1	1,81
<i>n</i> - Valérico	HVal	C ₅ H ₁₀ O ₂	4,84	102,2	2,04
<i>n</i> -Caproico	HCap	C ₆ H ₁₂ O ₂	4,88	116,2	2,20

Fonte: adaptado de Cavalcante (2016).

Na fermentação secundária, não ocorrem apenas reações de redução como as previstas na síntese de metano, ou a redução de lactato à propionato como forma de reestabelecer o equilíbrio de ácidos no sistema (elevação de pH). As principais vias exploradas são as de β -oxidação reversa, que sucedem ao alongamento de cadeia. Estas reações de natureza biológica consistem sempre na adição de dois carbonos do doador de elétrons para a cadeia do ácido carboxílico principal, desde que as exigências termodinâmicas sejam cumpridas. Desta forma, os ácidos carboxílicos de números de carbono pares, progridem com o alongamento sempre em números pares, e os de números ímpares de mesmo modo, formando ácidos graxos de cadeia média e longa (SPIRITO *et al.*, 2014).

Outra característica do alongamento de cadeia é a de formação de ciclos de alongamento. Estes são formados pela ocorrência das reações de β -oxidação reversa e oxidação do doador de elétrons simultaneamente. Devido à natureza tão específica destas reações, poucos são os microrganismos identificados como capazes de realizar tais rotas metabólicas. Inicialmente as *Clostridium kluyveri*, *Megasphaera sp.* e *Eubacterium sp.* eram consideradas as principais espécies envolvidas nos processos. Atualmente, descobriu-se que a presença de LAB desempenha papel sinérgico junto às bactérias alongadoras de cadeia, principalmente a partir da utilização de ácido láctico atuando como doador de elétrons (AGLER *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2020).

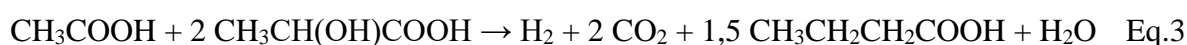
3.4 O alongamento de cadeia e a fermentação de soro de leite

3.4.1 Substrato e doadores de elétrons

Como explicitado anteriormente, o CW é um subproduto da indústria alimentícia que permite ser explorado para fins de segurança alimentar, portanto, poucos são os estudos que tratam diretamente do alongamento de cadeia a partir do soro de leite. Coelho e colaboradores (2020) observaram a rápida formação de ácido láctico e etanol nas primeiras horas de bateladas de soro de leite fermentadas a partir de inóculo de cervejaria. Segundo os autores, tanto etanol quanto ácido láctico foram rapidamente consumidos como fontes de elétrons para o processo de alongamento de cadeia de ácido acético para ácido butírico. No entanto, não avaliaram a produção de H₂ durante o processo.

A sugestão de que ácido láctico e ácido acético poderiam ser convertidos em butirato remonta de um estudo sobre microbiota intestinal humana, no qual Duncan, Louis e Flint (2004) comprovaram a atividade butirogênica de microrganismos a partir de suplementação com lactato em diferentes substratos com base em amido. Os microrganismos estudados, *Eubacterium hallii* e *Anaerostipes caccae* representam cerca de 2 a 3 por cento da microbiota total, e bactérias do gênero *Megasphaera sp.* e *Clostridium sp.* também foram observadas como geradoras de H₂ e butirato no estudo. Com base nos achados, foi sugerida uma rota de produção de H₂ via oxidação de NADH (NADH → NAD⁺ + H₂) e oxidação de ferredoxina, na qual lactato e acetato seriam oxidados a acetil-CoA levando à formação de *n*-butirato (STAMS; PLUGGE, 2009).

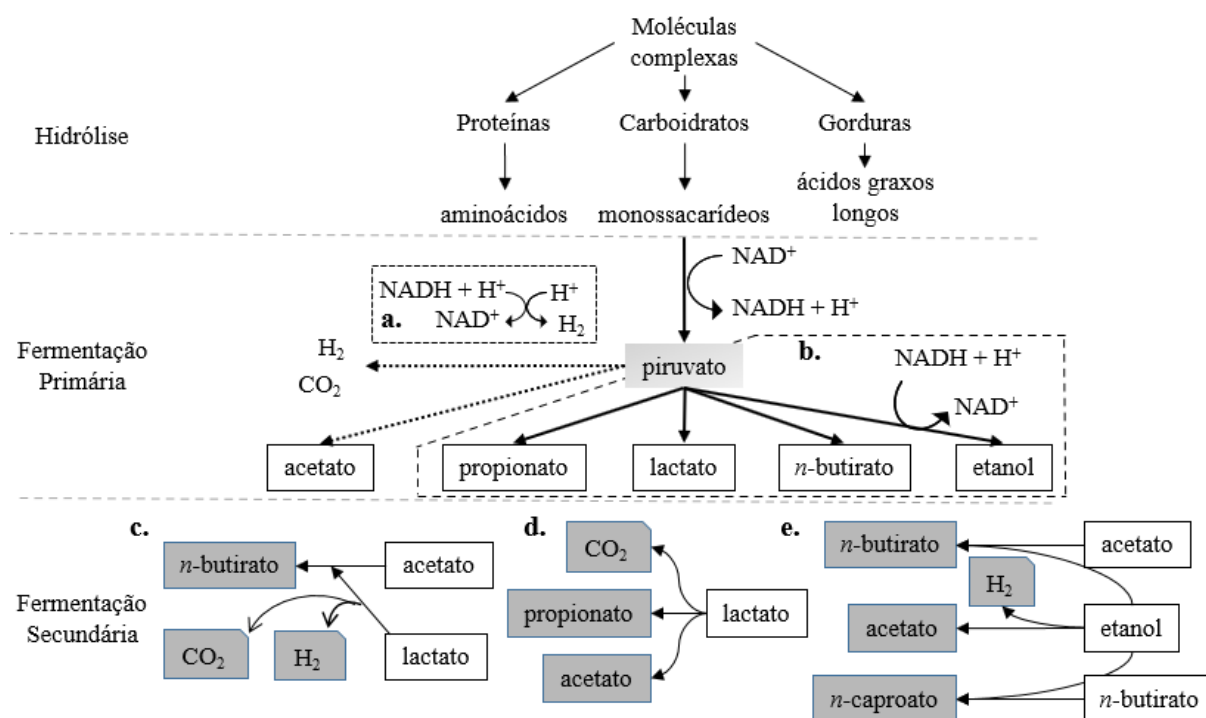
Posteriormente, Matsumoto e Nishimura (2007) demonstraram a produção de H₂ pela cepa *Clostridium diolis* na fermentação de resíduos da produção de *sho-chu*, um destilado da fermentação de grãos e/ou tubérculos. Os autores puderam verificar que a dinâmica de ácidos orgânicos em seus ensaios envolvia a diminuição das concentrações de ácido acético e ácido láctico e concomitante aumento da concentração de ácido butírico no meio junto ao aumento da concentração de H₂ (Figura 5c.). Sugeriram que a equação química balanceada que descreveria a estequiometria da reação de síntese de butirato e H₂ seria da seguinte forma (Eq. 3):



Segundo Prabhu, Altman e Eitemana, (2012), o crescimento celular meio a altas concentrações de ácido láctico, propicia o desvio de rota metabólica, que induz a formação de

propionato no sistema a partir da redução de ácido láctico. Esta rota foi determinada como rota do acrilato. Uma vez que esta rota é estabelecida torna-se irreversível a utilização de piruvato proveniente de ácido láctico para as reações de β oxidação do alongamento de cadeia (KUCEK; NGUYEN; ANGENENT, 2016) (Figura 5d.). Recentemente, ainda não se provou que essa alteração de rota seja reversível, porém, o uso de suplementação de H_2 no meio após formação de ácido propiônico foi capaz de recuperar até 16% de carbono na forma de ácido caproico a partir de ácido acético e propanol como intermediários (WU *et al.*, 2019).

Figura 4. Proposta de representação de rotas metabólicas previstas no alongamento de cadeia a partir de lactato e etanol como doadores de elétrons. Englobando reações prévias de oxidação descritas como hidrólise e fermentação primária aos principais metabólitos observados no processo de digestão anaeróbia



Legenda: **a.** oxidação de NADH, **b.** oxidação de NADH pela redução de piruvato, rendimentos dependentes da pressão parcial de H_2 . Processos descritos na ácido e acetogênese (Figura 3), **c.** oxidação de lactato a n-butirato com acetato como intermediário eceptor de elétrons, **d.** redução de lactato a propionato ou oxidação à acetato para conservação de energia, **e.** oxidação de etanol para alongamento de cadeia, primeiro em direção a síntese de n-butirato com acetato como eceptor de elétrons, em seguida, um segundo ciclo de alongamento de cadeia com n-butirato como eceptor de elétrons.

Fonte: adaptado de (AGLER *et al.*, 2011).

Estudos sobre as reações propostas pelo sistema de plataforma carboxílica ficaram mais complexos e extensos com o crescente interesse pela capacidade de recuperação de energia de águas residuárias na forma de ácidos carboxílicos. O desenvolvimento de modelos teóricos sobre reações específicas como a de β oxidação reversa, condições ambientais para sua ocorrência e termodinâmica envolvida nas reações se tornaram mais recorrentes (RODRÍGUEZ; LEMA; KLEEREBEZEM, 2008; KLEEREBEZEM; VAN LOOSDRECHT, 2010). Em 2014, Spirito e colaboradores (2014) explicitaram a função do lactato como doador de elétrons no processo de alongamento de cadeia (Figura 5e.). Evidenciou-se que, da mesma forma que o etanol, os microrganismos obtêm energia no alongamento de cadeia a partir da redução de moléculas de crotonil-CoA à butiril-CoA, desde que estas possuam os complexos enzimáticos necessários.

Verificada a função do lactato no processo, o soro de leite acidificado (composto majoritariamente por lactose e ácido láctico) foi apresentado como potencial água residuária para síntese de ácidos orgânicos. Duber e colaboradores (2018) propuseram a operação de um reator anaeróbio de manta de lodo com fluxo ascendente operado durante um ano, sendo que durante este período diferentes tempos de retenção hidráulicos foram estudados. Os autores constataram a formação de ácido *n*-caproico tanto a partir de lactato quanto de etanol. Notaram também que comumente o lactato era uma fonte preferencial de elétrons, pois em vários momentos observou-se a depleção deste metabólito frente ao etanol, junto ao aumento da síntese de ácido *n*-caproico.

Em estudo posterior, após verificada a predileção do ácido láctico como doador de elétrons, Chwialkowska e colaboradores (2019) compararam a suplementação de etanol e lactato para o processo de alongamento de cadeia visando a produção de ácido *n*-caproico a partir de soro de leite acidificado. Verificou-se que a suplementação com lactato promoveu rendimentos em ácidos graxos 20% superior que com etanol. A produção de ácido butírico neste estudo não foi constatada como fruto da fermentação de lactose ou do alongamento de cadeia, e novamente não apresentaram dados relativos à produção de gases.

3.4.2 Cultura mista ou microbioma aberto

O uso de culturas puras é relacionado a maior capacidade de controlar rotas metabólicas para a síntese de ácidos orgânicos de interesse. No entanto, para se manter uma cultura pura durante o processo envolve grande controle, que se traduz em gastos, como o de químicos para alteração de pH e de calor para esterilização de águas residuárias. Ao se conduzir

biorreatores com cultura mista, a predominância de espécies no meio pode se dar de forma natural ou ambiental, pela manipulação das condições de operação. Estudos demonstram que as microbiomas são capazes de manter níveis estáveis de ácidos orgânicos por longos períodos de operação devido ao sintrofismo entre eles. Tornam-se resilientes e se adaptam quando características operacionais ou ambientais são alteradas, como pH (DE SMIT *et al.*, 2019; CANDRY *et al.*, 2020), doador de elétrons (GROOTSCHOLTEN *et al.*, 2013; CHWIALKOWSKA *et al.*, 2019), tempo de detenção hidráulico (KUCEK; NGUYEN; ANGENENT, 2016; JANKOWSKA *et al.*, 2018).

Entretanto, a presença de alguns organismos nem sempre é pertinente, como por exemplo a de microrganismos metanogênicos, pois podem promover inibição competitiva por substrato. Principalmente as metanogênicas acetoclásticas que comprometem o alongamento de cadeia pela competição por acetato, levando a menores rendimentos no alongamento de cadeia (MAGDALENA; BALLESTEROS; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, 2020). Outros estudos recentes demonstraram redução da eficiência de processos devido a competição de microrganismos fermentadores. Liu e colaboradores (2020) observaram que a microrganismos produtores de butirato se sobressaíram aos alongadores de cadeia na fermentação de silagem de milho. Quando o interesse de se conduzir a fermentação secundária está em obter ácidos orgânicos de cadeias médias, o desequilíbrio na produção de intermediários, como o ácido láctico e ácido butírico pode levar a alteração de rotas metabólicas. Em grandes quantidades, estes ácidos acabam inibindo a produção de ácido de cadeia média, não só por alterações do pH do meio, mas também por prevalência de microrganismos que sejam mais competitivos pelo menos substrato

Outro fator determinante para que os microrganismos responsáveis pelo alongamento de cadeia prevaleçam durante o processo é a oferta de substrato. Apesar de microbiomas abertos serem considerados mais resistentes à variação de oferta de substrato, Hoelzle e colaboradores (2020) constataram, por análises de metaproteômica, que enquanto a oferta de glicose em biorreator completamente agitado era limitada, rotas de formação de ácido butírico se sobressaíam às de síntese de lactose, sugerindo que a síntese de ácido butírico era significativamente favorecida ao se operar o reator com oferta limitando de glicose. Os autores também observaram que durante a fase de produção de lactato, *Bifidobacterium spp.* se mostravam bastante ativos, sendo a cultura que mais favorecia a síntese de ácido láctico. Constataram também a alteração de expressão metabólica das culturas de *Megasphaera spp.* durante a alteração da oferta de substrato de limitada para não limitante, ou seja, alterando a síntese de ácido butírico para ácido láctico. Enquanto isso, a atividade de *Clostridium spp.*

permaneceu a mesma em ambas as fases. Porém, em altos níveis de oferta de substrato, estes microrganismos deram ênfase ao crescimento celular, e só passaram a desempenhar atividade de reciclagem de carbono quando o substrato era limitante.

3.4.3 Efeito do pH

A discussão acerca da determinação do pH ótimo para a produção de ácidos carboxílicos pelo processo de alongamento de cadeia é extensa. Pesquisadores indicam que para a obtenção de ácidos de cadeia média, como ácido *n*-caproico, o pH ideal deve ser de 7.0 (CAVALCANTE *et al.*, 2017; O-THONG *et al.*, 2020). No entanto, outros fatores devem ser considerados para se determinar um pH ideal para síntese de ácidos graxos de cadeia média.

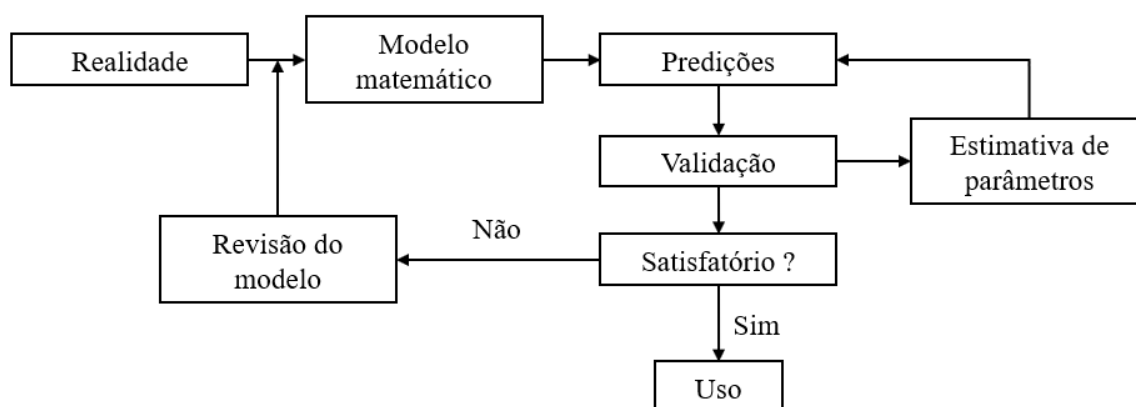
A necessidade ou não de suplementação de doadores de elétrons, implica radicalmente na escolha de manutenção do pH do meio. Caso o alongamento de cadeia seja precedido pela acidogênese (fermentação primária) que gere os doadores de elétrons, como ácido láctico, espera-se que haja redução inicial do pH, devido a constante de dissociação deste ácido. O mesmo não pode ser dito caso metabólito resultante seja o etanol. Para alongamento de cadeia cuja fonte de elétrons provém de ácido láctico, espera-se a manutenção do pH do meio em torno de 5,5 (AGLER *et al.*, 2011; KUCEK; NGUYEN; ANGENENT, 2016; CANDRY *et al.*, 2020). Essa queda de pH já torna o meio proibitivo para a atuação de metanogênicas, garantindo que o fluxo de elétrons seja melhor direcionado para síntese de ácidos graxos (AGLER *et al.*, 2011).

Manter o pH ácido do meio (<5,5) não impede que haja alongamento de cadeia se estabeleçam. No entanto, se não for realizado um controle de pH do meio, o sistema tende a ter seu pH aproximado da neutralidade, uma vez que o alongamento de cadeia é um processo alcalinizante. Desta forma, problemas de inibição (competição) gerados pelos microrganismos metanogênicos precisam ser satisfeitos de outras formas, tal como o uso de inibidores químicos seletivos (clorofórmio ou BES) (ANGENENT *et al.*, 2004; CAVALCANTE *et al.*, 2017). Outro fator que deve ser levado em conta na escolha do pH de operação é a existência ou não de uma linha de separação dos ácidos carboxílicos sintetizados. Para estes processos, a neutralidade ou a leve alcalinidade do meio favorece o processo de extração líquido/líquido. Pois ocorrerá a migração das formas de ácidos dissociadas para o meio alcalino (AGLER *et al.*, 2011; GEHRING *et al.*, 2020).

3.5 Modelagem matemática

Os processos fermentativos apresentados até aqui envolvem controle de variáveis ambientais, reações que ocorrem ao mesmo tempo e uma forma de organizar estes processos de modo que o regime de escoamento seja respeitado. Estes eventos podem ser descritos por modelos matemáticos, os quais, dentro de suas limitações, organizam equações matemáticas baseadas em simplificações de equações constitutivas, considerações sobre os princípios de conservação e erros de medida e capacidade de cálculo (MENDES; VALDMAN; SOUZA JÚNIOR, 2011). As resoluções de sistemas de equações fornecem respostas preditivas sobre o modelo, o qual ao ser confrontado aos dados experimentais, seja por aproximação dos dados simulados aos experimentais ou pelo uso de algum protocolo estatístico permitindo que o modelo seja validado ou não para uso direto (Figura 5).

Figura 5. Proposta de desenvolvimento de modelo matemático



Fonte: adaptado de Mendes, Valdman e Souza Júnior (2011).

Muitas vezes, a validação de um modelo matemático depende de parâmetros que não puderam ser determinados experimentalmente, os parâmetros livres. Estes parâmetros podem ser fixos ou variar dentro de um intervalo. Usualmente, emprega-se modelos de minimização de funções de custo para a determinação de parâmetros. No entanto, os usos dessas funções não apresentam nenhum respaldo estatístico, podendo-se conferir a uma variável livre qualquer valor, desde que as predições se aproximem dos dados experimentais para validação. Portanto, uma forma de conferir maior confiabilidade ao modelador acerca da determinação de parâmetros é lançar mão de algoritmos de inferência estatística (JESPERSEN, 2010).

3.5.1 Modelagem de sistemas biológicos

O primeiro modelo de simulação de sistemas anaeróbios data de 1977, no qual Hill e colaboradores desenvolveram um modelo com duas populações microbianas, fermentadores e metanogênicos em um reator de mistura completa. Estes microrganismos deveriam transformar resíduos de produção de frangos, sendo assim o modelo apresentava um cauteloso balanço das espécies nitrogenadas, sendo este um fator inibitório do processo devido participação dessas espécies no equilíbrio de pH. Os autores buscaram calibrar o modelo a partir de doze bateladas experimentais na temperatura de 25°C, obtendo êxito em apenas oito delas. Verificaram também como o modelo se comportaria caso a temperatura fosse diminuída de 15°C, e obtiveram êxito em apenas três das doze simulações. Hill e colaboradores (1977) julgaram suficiente a calibração do modelo na temperatura de vinte e cinco graus, e em seguida buscaram a validação do modelo contra um reator em escala plena. A validação foi realizada com sucesso, e obtiveram resultados com apenas 10% de erro sob as variáveis de controle: ácidos voláteis, biomassa, compostos nitrogenados.

Os modelos seguintes fizeram simplificações acerca da biomassa, ao se considerar apenas metanogênicas e formadoras de ácidos. Para esta consideração, foi introduzido no modelo uma função baseada na concentração de H_2 no meio, por meio de relações entre razão de $NADH : NAD^+$ e potencial redox. O estudo consistiu em verificar o comportamento da formação de ácidos a partir de glicose em dois regimes, estacionário e dinâmico, e a atividade dos grupos de bactérias. Observou-se que as formadoras de ácidos são as maiores responsáveis pelas variações no equilíbrio de potencial redox do meio, enquanto as metanogênicas hidrogenotróficas foram apontadas como principais organismos que buscam reestabelecer o equilíbrio de potencial redox do meio. No entanto, não foram realizadas calibrações ou validação (MOSEY, 1983).

Uma década depois, Costello e colaboradores (1991) introduziram rota de formação de ácido láctico, mecanismos de inibição por pressões parciais de H_2 e pH mais complexos, no entanto, propuseram um modelo com populações microbianas segregadas. Apontaram o modelo como sendo mais preditivo para simular efluentes com alta carga proteica, e que mais estudos sobre fermentação em baixos pH precisam ser realizados (COSTELLO; GREENFIELD; LEE, 1991). Para a validação do modelo desenvolvido, pautaram-se em três estudos realizados previamente, sendo dois em reatores de leito fluidizado e outro em reator de manta de lodo em fluxo ascendente. A calibração do modelo mostrou que a inclusão do ácido láctico foi essencial para melhor ajuste do modelo, apesar de não haver dados experimentais

deste metabólito. Ademais, o modelo superestimou a formação de ácido acético nas três simulações, o que pode ter implicado nos valores superestimados a produção de metano e a fluxo de saída de gases dos reatores. Apesar disso, o modelo apresentou resultados satisfatórios, ainda mais por ter sido comparado a três reatores de configurações e parâmetros de operação distintos.

O estado-de-arte empregado na simulação de processos de digestão anaeróbia está em torno do ADM1, sendo que desde sua publicação mais de 750 citações referenciavam diretamente o modelo (BATSTONE, 2013). A princípio, o ADM1 foi concebido para modelar reatores de mistura perfeita, nele são consideradas cinéticas bioquímica, enzimática, físico-química e fatores de inibição de reações (concentração de gases diluídos, ácidos e bases livres, inibições não-competitiva e por excesso de substrato) (BATSTONE *et al.*, 2002).

Com o ganho de popularidade do ADM1, pesquisadores buscaram adequar o modelo aos experimentos conduzidos incluindo a síntese e degradação de lactato, importante metabólito intermediário. Peiris e colaboradores (2006) verificaram em simulação de produção de H₂, que o lactato desenvolve papel chave no equilíbrio de pH do meio, graças a sua baixa constante de dissociação, comparado aos outros metabólitos da digestão anaeróbia. Satpathy e colaboradores (2016) adequaram o modelo ADM1 para tratar lactato como única fonte de carbono. A partir da determinação de parâmetros cinéticos livres, pela técnica de mínimos quadrados, calibraram o modelo contra dados experimentais obtidos em bateladas, tanto para a produção de ácidos quanto de H₂ e metano, sugerindo que para a degradação de carboidratos é imprescindível a inclusão desta rota no modelo. Porém, ao tentarem validar o modelo contra um reator contínuo, o modelo não se comportou adequadamente, superestimando a produção de gás carbônico e se quer houve produção de metano.

Além do interesse na digestão anaeróbia com foco na produção de gases H₂ e metano, os modelos de digestão anaeróbia têm sido modificados sob o interesse da produção de ácidos de cadeia alongada. Gehring, Cavalcante e colaboradores (2020) realizaram modificações no modelo para atender as exigências do alongamento de cadeia, e o denominaram ADM-CE. Na tentativa de representar o alongamento de cadeia de acetato utilizando etanol como principal doador de elétrons para o processo, além de simular tanto o processo com linha de extração de caproato quanto sem. Os autores apontaram grandes dificuldades durante a simulação por terem utilizado parâmetros de experimentos realizados com culturas puras citados em literatura, e mesmo dentro de um intervalo de confiança de 10% os resultados apresentaram grande desvio dos dados experimentais. Ademais, os autores apontaram a necessidade de maiores estudos

acerca de pH favorável ao processo de alongamento de cadeia, os quais destoam entre os estudos.

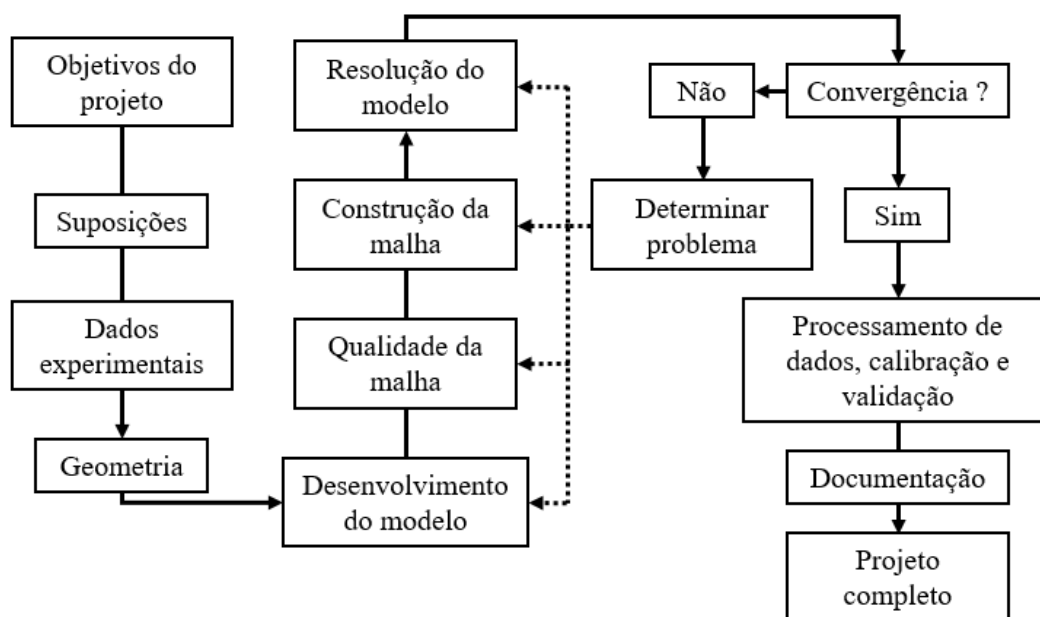
As principais propostas de validação de modelagens envolvendo os eventos da digestão anaeróbia pautam-se na comparação de dados obtidos nas simulações aos dados experimentais. Danielsson (2014) modelou com base no ADM1, a codigestão de esterco equino com diferentes águas residuárias, buscando a melhor relação de mistura de ambos para otimização da produção de biogás. Hmissi, Harmand e Shayeb (2016) utilizaram a plataforma COMSOL Multiphysics® na resolução das equações propostas no ADM1 em um reator anaeróbio de manda de lodo com fluxo ascendente (UASB, do inglês, *Upflow Anaerobic Sludge Blanket*,). Em seguida, propuseram a validação de um modelo ADM1 distribuído no espaço 3 D com o próprio modelo unidimensional, buscando uma melhor representação de reatores.

A inclusão do ADM1 em modelos de fluidodinâmica computacional tem sido cogitada para resolver carências de desempenho do modelo ao se trabalhar com parâmetros distribuídos (BATSTONE *et al.*, 2015). Na tentativa de representar o tratamento de esterco bovino para a produção de metano em reator de fluxo pistonado (PRF, do inglês, *Plug Flow Reactor*), Donoso-Bravo e colaboradores (2018) adequaram o ADM1 em três modelos. Trataram o PFR como infinitos CSTR associados em série (escoamento ideal), e outros dois modelos o de regime de duas regiões (do inglês, *two region scheme*) e o de regime de retenção de particulados (do inglês, *particulate retention scheme*) para simular formas de escoamento não ideais, com graduações de baixa a alta mistura ou retenção de partículas. Os dados calibrados e validados contra dados experimentais da produção de metano, matéria particulada solúvel e particulada. O modelo ideal provou-se estatisticamente mais preditivo que os de escoamento não ideal, porém apontou-se o modelo de retenção de partículas para o tratamento de águas residuárias com altas concentrações de sólidos.

3.5.2 Fluidodinâmica computacional

A realização de CFD ganhou notoriedade nas pesquisas na área das ciências ambientais nos últimos anos (BATSTONE *et al.*, 2015). Buscando reduzir erros e propor diretrizes para validação e calibração de modelos, a Associação Internacional de Águas Residuárias (IWA, do inglês, *International Wastewater Association*), propôs um protocolo de boas práticas de modelagem (GMP, do inglês, *Good Modeling Practice*) para o uso de CFD no tratamento de águas residuárias (Figura 6) (SADINO-RIQUELME *et al.*, 2018).

Figura 6. Proposta de desenvolvimento de modelos matemáticos seguindo as Boas práticas de modelagem



Fonte: adaptado de (WICKLEIN *et al.*, 2016).

A modelagem fluidodinâmica de sistemas biológicos deve, antes de tudo, partir da definição dos objetivos que se busca alcançar com o modelo, ou seja, o que se busca representar com clareza. Em seguida, passa-se à reunião de dados de projeto e de operação de reatores, exige-se a descrição de parâmetros específicos, tais como geometria do reator, reações em seu interior, características das substâncias de interesse, porosidade e permeabilidade do meio, reologia dos fluidos envolvidos no escoamento, variação da temperatura, determinação de vazões de entrada e saída, e demais condições de contorno. Em seguida, os métodos de resolução devem ser especificados, bem como sua dependência com o tempo (regimes estacionário ou transiente) (Figura 6) (WICKLEIN *et al.*, 2016).

Tanto as definições de qualidade de malha quanto seus formatos de construção podem variar ao longo do modelo (Figura 6), dando-se ênfase em pontos específicos onde espera-se que eventos de interesse ocorram, como regiões de troca de calor e de propulsão geradas por impelidores, reações químicas ou biológicas. Pois são nos elementos das malhas onde ocorrem a resolução das equações do modelo, portanto a escolha de malhas grosseiras até refinadas podem implicar em aumento de gasto computacional, seja em tempo de resolução do modelo ou na necessidade de potencial de processamento (CRUZ *et al.*, 2016; KARPINSKA; BRIDGEMAN, 2016; SADINO-RIQUELME *et al.*, 2018).

A etapa de resolução normalmente é realizada por métodos numéricos já bem estabelecidos, e podem ser escolhidos de acordo com os sistemas de equações dos modelos, seja para resolução de equações diferenciais ordinárias até aritméticas. Por fim, passa-se a etapa de pós processamento e validação do modelo, caso este não precise ser revisado devido a falha na convergência indicada pelo método de resolução (Figura 6) (LAURENT *et al.*, 2014; WICKLEIN *et al.*, 2016).

O uso de soluções traçador como método de estudo hidrodinâmico de reatores apresenta menor custo e praticidade, e tem sido comumente empregado na validação de modelos CFD (WU; CHEN, 2008; WANG *et al.*, 2010; SADINO-RIQUELME *et al.*, 2018). Este método consiste na injeção de soluções que causam perturbação do meio, não sejam reativas, e possam ser captadas e medidas nas saídas do reator (LEVENSPIEL, 2000). Ao contrário de reatores anaeróbios, nos quais à formação de lodo em suas extremidades, tornando o meio opaco, e de difícil observação do leito, algumas plataformas de simuladores CFD com interface gráfica para usuários (GUI, do inglês, *Graphical User Interface*), permitem a observação de uma simulação de injeção de traçador e sua trajetória no leito de reatores, mas não dispensam a necessidade de validação do método contra dados experimentais (WICKLEIN *et al.*, 2016).

Empregando-se corretamente parâmetros operacionais utilizados em reatores, e criando modelos que representem parcialmente o sistema real, as possibilidades de modelagem vão desde a simulação de processos com variação de viscosidade do meio (WU; CHEN, 2008), sistemas agitados com produção de gases (WU, 2010; DELAFOSSE *et al.*, 2014), o comportamento do fluido no interior de reatores anaeróbios de leito empacotado (LOGTENBERG; NIJEMEISLAND; DIXON, 1999); o contato entre fluido e o material que imobiliza biomassa no leito de biorreatores anaeróbios (DIXON; NIJEMEISLAND, 2001); e o comportamento de escoamento multifásico (LOPES; QUINTA-FERREIRA, 2007).

O acoplamento de modelos computacionais busca integrar o comportamento cinético da digestão anaeróbia aos fenômenos hidrodinâmicos desenvolvidos no interior de reatores. Segundo Wu (2012), pode-se buscar a otimização de: operação de agitadores, diferentes HRTs, e do controle de temperatura, para obtenção de maiores rendimentos na produção de metano. Azargoshab e colaboradores (2015) propuseram um aumento de complexidade ao acoplamento dos modelos ao tratar dinâmica entre três fases (sólida, líquida e gasosa) sob perspectiva Euleriana, além de agregar ao modelo equações de balanço populacional, tanto para a formação de gás quanto para descrever o comportamento do sintrofismo entre microrganismos acidogênicos e metanogênicos. Ao considerarem o reator como completamente agitado, observaram a distribuição de ácidos graxos voláteis, e de bolhas de diferentes diâmetros ao

longo da altura, validando o modelo apenas com a concentração de propionato no efluente do reator.

Rezavand e colaboradores (2019) propuseram como modelo de acoplamento o uso da hidrodinâmica de partículas uniformes, no qual considera que cada partícula apresenta todas as informações pertinentes para a resolução das reações bioquímicas e de fluidodinâmica, ou seja, estudando-se as interações partícula-partícula. Desta forma, tornou-se necessário o desenvolvimento de um modelo difusivo para determinar os fenômenos de transferência de massa entre partículas. Para validar o modelo, realizaram ensaios de caracterização dos fenômenos difusivos e dados experimentais de trabalhos publicados anteriormente. Por fim propuseram o aumento de escala para o reator estudado. O modelo fluidodinâmico 2 D considerando o formato de casca de ovo foi obtido com êxito e demonstrou a movimentação das partículas no interior do reator, dando ênfase nos pontos de produção e distribuição de metano, e na variação do pH.

3.5.3 Estimativa de parâmetros e validação estatística de modelos de simulação

Em extensa revisão bibliográfica sobre a concepção, identificação e validação de modelos voltados para a digestão anaeróbia, Donoso-Bravo e colaboradores (2011) discutiram sobre a importância de se realizar a determinação de parâmetros com embasamento estatístico. Segundo os autores, os métodos de inferência Bayesiana podem ser complicados e trazer grandes gastos computacionais na estruturação de distribuição de estatísticas *a posteriori* geradas pelo método para serem comparadas aos valores estabelecidos *a priori*. No entanto, adventos como as Cadeias de Markov permitiram que esses dados fossem gerados pseudoaleatoriamente e armazenados de maneira que pudessem ser testados estatisticamente em seguida. Couto e colaboradores (2019), lançaram mão da inferência Bayesiana pelas simulações de Monte Carlo acopladas às Cadeias de Markov (MCMC) para determinação de populações microbianas em seu modelo baseado no ADM1 para o tratamento de vinhaça de cana de açúcar. Sugerindo que as simulações por MCMC podem ser empregadas em modelos de digestão anaeróbia, apesar de só poderem validar o estudo quando estudos de metagenômica forem realizados na biomassa do reator operado.

Como muitos outros métodos de determinação de parâmetros, o MCMC faz bom uso de um minimizador de funções de custo como sugestão inicial para começarem as simulações das Cadeias de Markov. Alguns fatores devem ser considerados na escolha dos algoritmos que realizem minimizações, os modelos biológicos por serem não lineares podem possuir diversos

pontos de mínima. Portanto, minimizadores de funções globais devem ser empregados (DONOSO-BRAVO *et al.*, 2011). Diversos trabalhos empregaram a função *fmincon* disponível em Matlab® para esta finalidade (REYES *et al.*, 2011; SATPATHY *et al.*, 2016b; DONOSO-BRAVO *et al.*, 2018). Couto e colaboradores (2019) fazem uso do método de Box-Draper para minimização das funções de custo. A escolha deste método está pautada na capacidade de serem minimizadas juntamente os erros e os vieses das funções do modelo. Dessa forma, a minimização dos parâmetros fica concentrada dentro de regiões de interesse (BOX *et al.*, 2007).

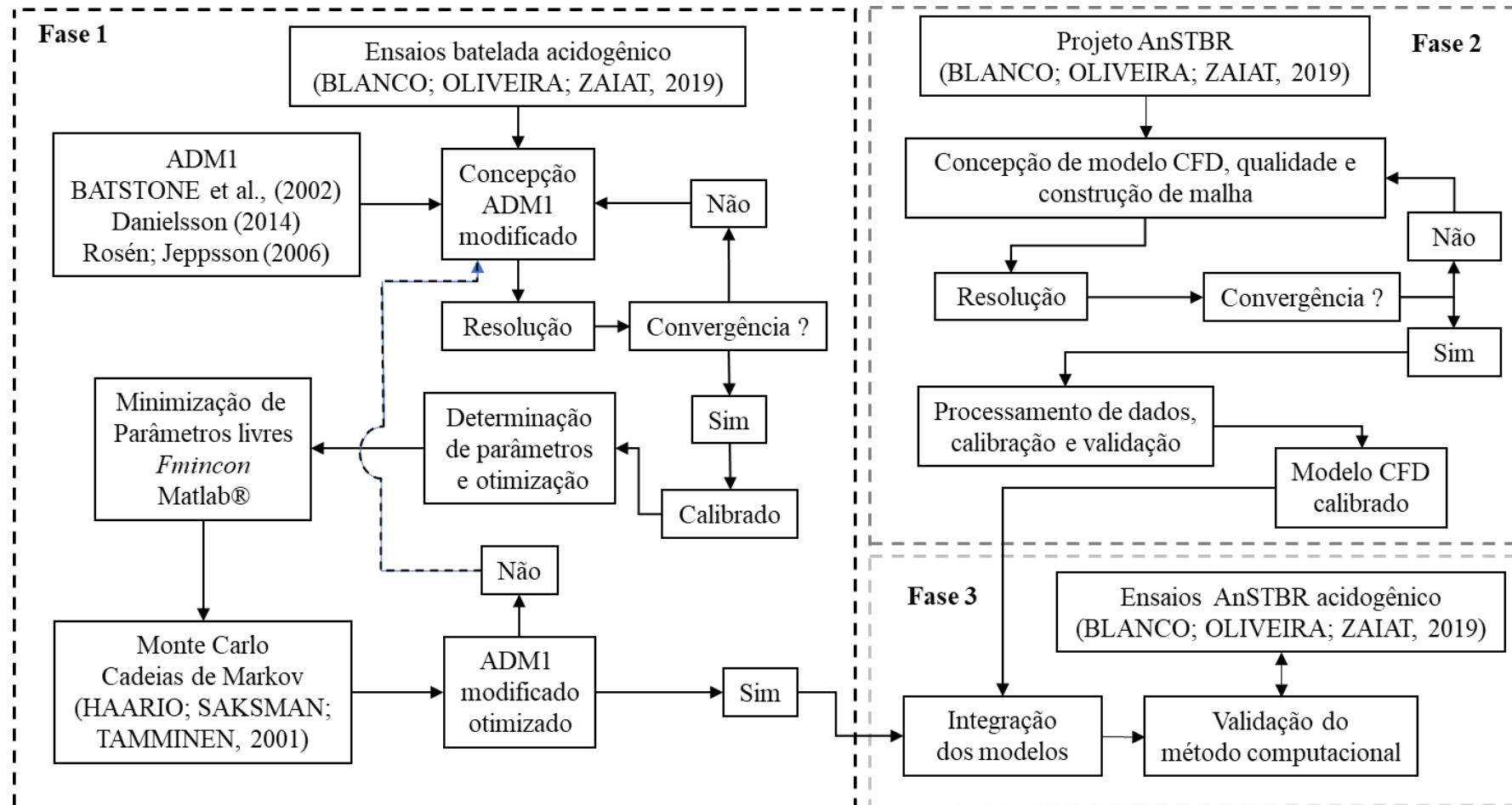
Nas simulações de MCMC são criadas sucessivas séries com números finitos de iterações, nas quais valores são gerados pseudoaleatoriamente, e cujos eventos não são dependentes entre si no tempo (Cadeia de Markov) (HASTINGS, 1970). Os valores testados são escolhidos pelo modelador dentro de intervalos pré-definidos. A substituição de valores de parâmetros mais representativos na Cadeia de Markov ocorrerá quando estes, forem testados estatisticamente contra os dados *à priori*, pelo método de inferência Bayesiana (Monte Carlo) (BROOKS *et al.*, 2011).

No entanto, a validade do método MCMC só é acessada quando ocorre a convergência das Cadeias de Markov. Os métodos para esse teste são variados, o de Geweke, por exemplo, consiste em testar intervalos distintos das Cadeias para verificar se estas estão se comportando de maneira uniforme e estacionária, portanto, convergindo pelo teste de densidades espectrais (GEWEKE, 1991). Este resultado é comparado por um teste de inferência Z_n , e busca indicar se as médias dos intervalos são significativamente iguais dentro de um intervalo de confiança. No qual um resultado de 100%, indica comportamento muito estável, portanto as cadeias têm valores convergentes, até 0%, indicando divergência das cadeias (SAHLIN, 2011).

4 METODOLOGIA

Este trabalho foi conduzido em três principais fases. A Fase 1 foi destinada à concepção do modelo modificado a partir do ADM1 (BATSTONE *et al.*, 2002) e sugestões de trabalhos posteriores (ROSÉN; JEPPSSON, 2006; DANIELSSON, 2014; BLANCO; OLIVEIRA; ZAIAT, 2019). Na Fase 2, procedeu-se com o desenvolvimento de um modelo 3-D de CFD para o reator AnSTBR, utilizado na etapa acidogênica de fermentação (BLANCO; OLIVEIRA; ZAIAT, 2019), e sua validação. Por fim, a Fase 3 uniu as simulações do ADM1 modificado ao modelo 3-D de CFD, buscando representar a fermentação de soro de leite em AnSTBR acidogênico operado continuamente (Figura 3). No decorrer destas fases, buscou-se representar as rotas de alongamento de cadeia a partir do lactato propostas por Spirito e colaboradores (2015) e observadas por Kucek, Nguyen e Angenent (2016) experimentalmente. O objetivo deste modelo seria representar principalmente a produção de H₂ e ácido butírico obtida nos experimentos realizados por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019). Os parâmetros não determinados em laboratório e/ou introduzidos nos modelos para as representações pretendidas, tiveram seus valores determinados pelo conjunto da função *fmincon* disponível em Matlab® e o algoritmo de Monte Carlo Cadeias de Markov (Figura 7).

Figura 7 - Fluxograma das fases envolvidas na condução do presente trabalho. Fase 1. Modificação do ADM1 com base em referencial bibliográfico sobre atualizações do modelo e teoria sobre alongamento de cadeia. Fase 2. Desenvolvimento do modelo de fluidodinâmica computacional. Fase 3. Acoplamento dos modelos bioquímicos ao de fluido dinâmica computacional



Fonte: o autor.

4.1 Dados experimentais

Os dados experimentais utilizados neste trabalho foram extraídos dos estudos realizados por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019). O substrato utilizado pelos autores foi soro de leite em pó reconstituído com as seguintes concentrações (massa/massa): 76,5 % de carboidratos, 13,3 % proteínas, 1,0 % lipídeos, 1,1 % sódio e 7,6 % outros minerais. Durante a alimentação do reator foi necessário a suplementação com 0,5 g de bicarbonato de sódio por grama de DQO. Os métodos analíticos empregados foram realizados de acordo com APHA, AWWA e WEF (2017).

Os dados experimentais utilizados neste trabalho foram extraídos dos estudos realizados por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019). O substrato utilizado pelos autores foi soro de leite em pó reconstituído com as seguintes concentrações (massa/massa): 76,5 % de carboidratos, 13,3 % proteínas, 1,0 % lipídeos, 1,1 % sódio e 7,6 % outros minerais. Durante a alimentação do reator foi necessário a suplementação com 0,5 g de bicarbonato de sódio por grama de DQO. Os métodos analíticos empregados foram realizados de acordo com APHA, AWWA e WEF (2017).

AnSTBR: reator desenvolvido para operar em fluxo ascendente, com volume útil de 1,85 L, no qual foram inseridos cilindros de polietileno de baixa densidade com dimensões de 23 mm de diâmetro por 25 mm de altura. Estes cilindros apresentam densidade de $0,96 \text{ g mL}^{-1}$ e área superficial específica de $7,94 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, conferindo ao leito onde foram instalados, em hastes de aço inoxidável, uma porosidade de 85% (Figura 8).

A biomassa foi inoculada a partir de processo de fermentação natural, no qual a água residuária sintética foi preparada em recipiente aberto e mantida por três dias em repouso. Essa solução foi transferida para o AnSTBR e recirculada por 5 dias. Posteriormente, operou-se o reator sob temperatura constante de 25°C com TDH de 2 h e carga orgânica volumétrica de $24 \text{ gDQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ por 32 dias. Ao término deste processo, biomassa foi coletada do sistema em regime contínuo para ser inoculada nos reatores batelada.

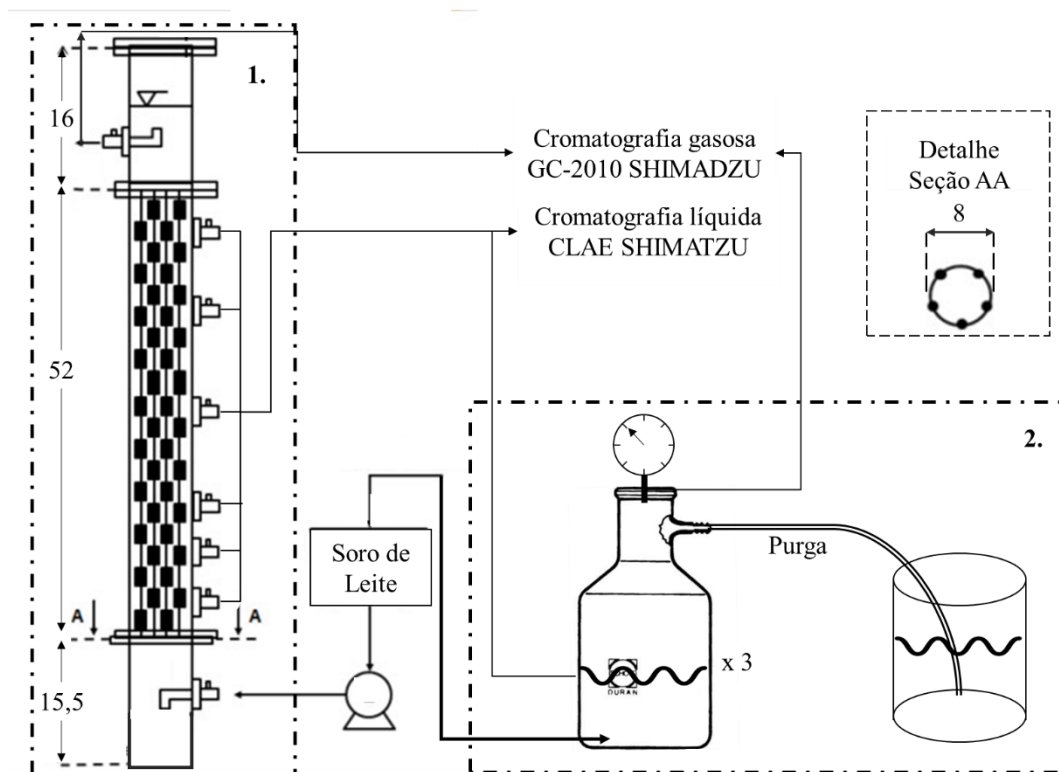
Ensaio realizado em batelada: a condução da etapa em batelada foi realizada em frascos Duran® com dimensões de 182 mm de diâmetro por 330 mm de altura, volume de 5 L, sendo que o volume de meio reacional era de 2 L. Os frascos foram inoculados com $0,20 \text{ g SSV L}^{-1}$ em a água residuária sintética de concentração 30 g DQO.L^{-1} , vedados com septo de borracha e mantidos sob agitação a 150 RPM e mantidos sob temperatura constante de 25°C . Para atingir condição de anaerobiose, foram submetidos à purga com gás nitrogênio por 15 minutos. Como saída para o H_2 produzido, uma mangueira fora acoplada ao septo de

vedação tendo sua outra extremidade inserida em um béquer com água (Figura 8). Para a realização das análises de amostra de gás, purgas completas da fase gasosa foram realizadas periodicamente, e as da fase líquida, foram realizadas coletas de menos de 10% do volume para não interferir nos balanços de massa.

A composição da fase gasosa dos experimentos foi realizada com gás de arraste argônio em cromatógrafo gasoso GC-2010 SHIMADZU, equipado com detector de condutividade térmica (TCD), com coluna CARBOXEN 1010 plot (30 m x 0,53 mm). Sendo que as temperaturas do injetor e do detector foram de 220°C e 230°C, respectivamente, e na coluna a temperatura foi 130 °C com aquecimento de 46°C minuto⁻¹ até 135°C. O volume de biogás formado em cada reator foi monitorado continuamente, utilizando gasômetros Ritter modelo MGC-1 V30 (BLANCO; OLIVEIRA; ZAIAT, 2019).

Os metabólitos solúveis foram analisados no sistema SHIMATZU, composto por: bomba LC-10 ADvp, válvula solenoide FCV-10ALpv, forno CTO-10Avp, controlador SCL-10ADvp, detector UV com arranjo de diodos SPD-M10Avp (205 nm), detector de índice refrativo diferencial-RID-10^a (fotodiodo de 4 partições). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (comprimento de 0,3 m, diâmetro interno de 7,8 mm), cuja fase móvel fora H₂SO₄ com vazão de 0,5 mL min⁻¹, com temperatura de trabalho do forno de 43°C e máxima de 70°C (APHA, AWWA e WEF, 2017).

Figura 8. Modelo experimental das rotinas laboratoriais propostas para obtenção dos dados experimentais. À esquerda, reator anaeróbio de leito estruturado, à direita bateladas experimentais conduzidas em frasco Duran



Fonte: Adaptado de Blanco, Oliveira e Zaiat (2019).

4.2 Desenvolvimento e modificação dos modelos computacionais

A modificação do ADM1 e rotinas para estimativa de parâmetros, calibração e validação de modelos de simulação foram realizadas no software Matlab® 2015A e estão disponíveis no Anexo 1. Demais parâmetros cinéticos e propostas de alterações do ADM1 foram baseados nos estudos de Danielsson (2014), Rosén e Jeppsson (2006) e Blanco, Oliveira e Zaiat (2019). A modelagem de CFD, bem como desenvolvimento do modelo virtual 3-D do AnSTBR foram conduzidas em software comercial COMSOL Multiphysics® v.5.2.

4.2.1 Modificação do ADM1

Com base nos resultados das bateladas experimentais, Blanco, Oliveira e Zaiat (2019), sugeriram a resolução do balanço de matéria orgânica para determinação dos coeficientes estequiométricos (Eq. 4 e 5).

$$1 - Y_{su} - (1 - Y_{su}) f_{lac-su} - (1 - Y_{su}) f_{ac-su} - (1 - Y_{su}) f_{H2-su} = 0 \quad \text{Eq. 4}$$

$$1 + f_{ac-lac} - f_{but-lac} - f_{H2-lac} = 0 \quad \text{Eq. 5}$$

Em que: Y_{su} é o coeficiente de rendimento celular a partir de açúcar, $f_{lac,su}$ representa o coeficiente estequiométrico de conversão de açúcar em lactato, $f_{ac,su}$ representa o coeficiente estequiométrico de conversão de açúcar em acetato, $f_{H2,su}$ representa o coeficiente estequiométrico de conversão de açúcar em H_2 , $f_{ac,lac}$ representa o coeficiente estequiométrico de conversão de lactato em acetato, $f_{but,lac}$ representa o coeficiente estequiométrico de conversão de lactato em *n*-butirato, $f_{H2,lac}$ representa o coeficiente estequiométrico de conversão de lactato em H_2 .

Em seguida, adequou-se o ADM1 para representação do estudo realizado por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019), utilizando notações e parâmetros da literatura (DANIELSSON, 2014; ROSEN, JEPSSON, 2006). Este modelo, agora denominado Controle, descreveu, seguindo o modelo cinético de Monod, a degradação de açúcar (S_{su}) em três metabólitos, acetato (S_{ac}), lactato (S_{lac}) e hidrogênio (S_{h2}), intermediados por uma única biomassa (X_{su}), que realizou tanto a fermentação primária, quanto a secundária. Esta última sendo representada pelo consumo de S_{ac} e S_{lac} e síntese de S_{h2} e butirato (S_{but}). Ambas as reações microbiológicas ocorreram sob o rendimento de 0,17 g microrganismos g substrato⁻¹ (Y_{su}), sob uma taxa de decaimento microbiano (k_d) de 0,02 h⁻¹.

Sendo assim, as principais reações de taxa (ρ) do modelo compreendem: taxa de consumo de açúcar (Eq. 6), taxa de consumo de lactose (Eq. 7) e taxa de decaimento celular (Eq. 8).

$$\rho_{su} = k m_{su} \frac{S_{su}}{(K S_{su} + S_{su})} X_{su} I_{pH} \quad \text{Eq. 6}$$

$$\rho_{lac} = k m_{lac} \frac{S_{lac}}{(K S_{lac} + S_{lac})} X_{su} I_{pH} \quad \text{Eq. 7}$$

$$\rho_{dec,X_{su}} = k_d X_{su} \quad \text{Eq. 8}$$

No qual, ρ_{su} representa taxa de consumo de açúcar, ρ_{lac} taxa de consumo de lactato, $\rho_{dec,X_{su}}$ taxa de decaimento celular e I_{pH} a inibição resultante pelo pH (Eq. 9), entre os limites de pH superior 5,5 (pH_{UL}) e inferior 4,5 (pH_{LL}) (BATSTONE et al., 2002).

$$I_{pH} \left\{ \begin{array}{l} = e^{-3 \left(\frac{pH - pH_{UL}}{pH_{UL} - pH_{LL}} \right)^2} \\ = 1, \text{ se } pH = pH_{UL} \end{array} \right\} \quad \text{Eq. 9}$$

Para determinação do pH do sistema empregou-se as seguintes equações algébricas (Eq. 10-12) (ROSÉN; JEPSSON, 2006; DANIELSSON, 2014).

$$\text{Theta} = S_{\text{cat}} + S_{\text{NH}_4^+} - S_{\text{HCO}_3^-} - S_{\text{an}} - \frac{S_{\text{acm}}}{64} - \frac{S_{\text{bum}}}{160} - \frac{S_{\text{lacm}}}{96} \quad \text{Eq. 10}$$

$$S_{\text{H}^+} = -\frac{\text{Theta}}{2} + \frac{\sqrt{(\text{Theta}^2 + 4 \cdot K_w)}}{2} \quad \text{Eq. 11}$$

$$pH = \left\{ \begin{array}{l} -\log_{10} S_{\text{H}^+} \\ 10^{-12}, \text{ se } S_{\text{H}^+} \leq 0 \end{array} \right\} \quad \text{Eq. 12}$$

Sendo S_{acm} , S_{bum} e S_{lacm} as espécies químicas dissociadas: acetato, *n*-butirato e lactato, respectivamente e K_w a constante de dissociação da água. Cujos valores de conversão para base de demanda química de oxigênio (DQO), constante de dissociação (K_a), e constante dinâmica k_{AB} , estão dispostos na Tabela 2.

De acordo com Danielsson (2014), esta relação algébrica implica em maior estabilidade durante a integração no tempo. A relação logarítmica que define o potencial hidrogeniônico depende do equivalente molar das espécies químicas dissociadas (Eq. 10). Os componentes S_{cat} e S_{an} foram introduzidos no sistema para representar a presença de ácidos e bases fortes (BATSTONE *et al.*, 2002).

Tabela 2. Demanda química de oxigênio dos metabólitos estudados no presente trabalho, bem como as constantes de dissociação dos ácidos e da água, constante k_{AB} para conversão de equações algébricas em equações diferenciais ordinárias e a constante de Henry com efeito da temperatura para os gases de interesse. Valores determinados sob pressão de 1,013 bar, constante universal dos gases perfeitos (R) de 0,083145 bar $M^{-1} K^{-1}$, temperatura base e de operação de 298,15 K e temperatura de 315,98 K, respectivamente. Continua

Componente	Massa molar	g DQO mol ⁻¹	Ka	kAB _i	kH(T)
Água	18	0	2,08E-14	-	-
H ₂	2	16	-	-	0,00074
Dióxido de carbono	44	0	-	-	0,0271

Tabela 2. Demanda química de oxigênio dos metabólitos estudados no presente trabalho, bem como as contrastantes de dissociação dos ácidos e da água, constante k_{AB} para conversão de equações algébricas em equações diferenciais ordinárias e a constante de Henry com efeito da temperatura para os gases de interesse. Valores determinados sob pressão de 1,013 bar, constante universal dos gases perfeitos (R) de 0,083145 bar M-1 K-1, temperatura base e de operação de 298,15 K e temperatura de 315,98 K, respectivamente. Conclui

Componente	Massa molar	g DQO mol ⁻¹	Ka	kAB _i	kH(T)
Biomassa	24,6	33,6	-	-	-
Glucose	180	192	-	-	-
Lactose	342	384	-	-	-
Bicarbonato	61	0	6,31	10 ¹⁰	-
Amônio	18	0	8,95	10 ¹⁰	-
Acetato	59	64	4,76	10 ¹⁰	-
Lactato	89	96	3,82	10 ¹⁰	-
n-butirato	87	160	4,82	10 ¹⁰	-

A taxa de dissociação das espécies do modelo foi representada pela equação de equilíbrio ácido-base, porém, como propõem Rosén e Jeppsson (2006), representa-se a concentração de ácidos não dissociados (S_{Hi}) pela diferença da concentração total da espécie química e da ($S_{i,total}$) espécie dissociada (S_{Hi}) (Eq. 13).

$$S_{i, total} = S_{Hi} + S_{im} \quad \text{Eq. 13}$$

Para representar a taxa de variação de espécies dissociadas por meio de equações diferenciais parciais precisou-se adicionar ao modelo uma constante de taxa definida por $k_{AB i}$ com ordem de grandeza de $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para conversão de equações algébricas em equações diferenciais ordinárias (Eq. 14-18) (ROSÉN; JEPPSSON, 2006).

$$\rho A_{bu} = k_{AB_{bu}} (S_{bum} (K_{a_{bu}} + S_{H^+}) - K_{a_{bu}} S_{bu}) \quad \text{Eq. 14}$$

$$\rho A_{ac} = k_{AB_{ac}} (S_{acm} (K_{a_{ac}} + S_{H^+}) - K_{a_{ac}} S_{ac}) \quad \text{Eq. 15}$$

$$\rho A_{lac} = k_{AB_{lac}} (S_{lacm} (K_{a_{lac}} + S_{H^+}) - K_{a_{lac}} S_{lac}) \quad \text{Eq. 16}$$

$$\rho A_{IN} = k_{AB_{IN}} (S_{NH3} (K_{a_{IN}} + S_{H^+}) - K_{a_{IN}} S_{IN}) \quad \text{Eq. 17}$$

$$\rho A_{CO_2} = k_{AB_{CO_2}} (S_{HCO_2} (K_{a_{CO_2}} + S_{H^+}) - K_{a_{CO_2}} S_{CO_2}) \quad \text{Eq. 18}$$

Em que $\rho_{A bu}$ é a taxa de dissociação do ácido *n*-butírico, $\rho_{A ac}$ é a taxa de dissociação do ácido acético, $\rho_{A lac}$ é a taxa de dissociação do ácido lático, $\rho_{A IN}$ é a taxa de dissociação de amônio, $\rho_{A CO_2}$ é a taxa de dissociação do ácido carbônico.

Portanto, para determinar a variação nos tempos de interesse das espécies químicas dissociadas, integrou-se as taxas relativas aos processos de dissociação (Eq. 19-23) empregando o solver “ode15s” já disponível pela plataforma Matlab®. Os parâmetros de tolerância relativa e absoluta foram mantidos ambos em 10^{-10} . O tempo de integração foi determinado pelo metabólito que apresentou maior número de aferições, ou seja, o maior número de pontos experimentais, sendo este o H_2 .

$$\frac{d S_{bum}}{dt} = - \rho_{A bu} \quad \text{Eq. 19}$$

$$\frac{d S_{acm}}{dt} = - \rho_{A ac} \quad \text{Eq. 20}$$

$$\frac{d S_{lacm}}{dt} = - \rho_{A lac} \quad \text{Eq. 21}$$

$$\frac{d S_{NH_3}}{dt} = - \rho_{A IN} \quad \text{Eq. 22}$$

$$\frac{d S_{HCO_2}}{dt} = - \rho_{A CO_2} \quad \text{Eq. 23}$$

Demais parâmetros envolvendo cinética microbiológica estão devidamente identificados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros e coeficientes empregados por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019), continua

Parâmetro	Valor	Descrição	Unidade
k_{mSU}	3,62	Velocidade máxima de consumo de carboidratos	h^{-1}
K_{SU}	76	Constante de meia saturação do consumo de carboidratos	$gDQO L^{-1}$
k_{mLac}	0,030	Velocidade máxima de consumo de lactato	h^{-1}
K_{SLac}	0,82	Constante de meia saturação do consumo de lactato	$gDQO L^{-1}$
Y_{SU}	0,17	Coefficiente de rendimento celular	$gDQO g^{-1}DQO$
$f_{H_2 su}$	0,02	Coefficiente de rendimento de H_2 em relação a carboidratos	$gDQO g^{-1}DQO$
$f_{ac su}$	0,26	Coefficiente de rendimento de acetato em relação a carboidratos	$gDQO g^{-1}DQO$

Tabela 3. Parâmetros e coeficientes empregados por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019). Conclui

Parâmetro	Valor	Descrição	Unidade
$f_{lac\ su}$	0,72	Coeficiente de rendimento de lactato em relação a carboidratos	gDQO g ⁻¹ DQO
$f_{H2\ lac}$	0,06	Coeficiente de rendimento de H ₂ em relação a lactato	gDQO g ⁻¹ DQO
$f_{ac\ lac}$	0,19	Coeficiente de rendimento de acetato em relação a lactato	gDQO g ⁻¹ DQO
$f_{but\ lac}$	1,12	Coeficiente de rendimento de butirato em relação a lactato	gDQO g ⁻¹ DQO
pH_{UL}	5,5	Limite superior de inibição por pH	
pH_{LL}	4,0	Limite inferior de inibição por pH	

Fonte: Blanco, Oliveira e Zaiat (2019).

Determinados os coeficientes necessários, pôde-se partir para organização das equações diferenciais envolvendo a concentração dos principais metabólitos do modelo, para isso utilizou-se o mesmo processo de integração descrito para as espécies químicas dissociadas (Eq. 24-29).

$$\frac{d S_{su}}{dt} = -\rho_{su} \quad \text{Eq. 24}$$

$$\frac{d X_{su}}{dt} = Y_{su} \rho_{su} - \rho_{dec\ X_{su}} \quad \text{Eq. 25}$$

$$\frac{d S_{lac}}{dt} = (1 - Y_{su}) f_{lac-su} \rho_{su} - \rho_{lac} \quad \text{Eq. 26}$$

$$\frac{d S_{ac}}{dt} = (1 - Y_{su}) f_{ac-su} \rho_{su} - f_{ac-lac} \rho_{lac} \quad \text{Eq. 27}$$

$$\frac{d S_{H2}}{dt} = (1 - Y_{su}) f_{H2-su} \rho_{su} - f_{H2-lac} \rho_{lac} - \rho_{T_{H2}} \quad \text{Eq. 28}$$

$$\frac{d S_{but}}{dt} = f_{but-lac} \rho_{lac} \quad \text{Eq. 29}$$

As equações físicas de transferência de fase dos gases considerados no modelo são pautadas nas leis de gases ideais. De acordo com os dados experimentais observados por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019), não houve produção de metano durante os estudos em batelada, portanto limitou-se o modelo a pressões parciais de hidrogênio ($P_{gas_{H2}}$), gás carbônico

($P_{\text{gas}_{\text{CO}_2}}$) e água ($P_{\text{gas}_{\text{H}_2\text{O}}}$), já convertidos para base DQO (Eq. 30 e 31). Para que houvesse o fenômeno de transferência de massa do meio líquido para o meio gasoso, considerou-se uma taxa de transferência líquido-gás (ρT_i), baseadas na com correção de temperatura (Tabela 2), pressão parcial do gás, concentração do mesmo na fase líquida e coeficiente volumétrico global de transferência gás-líquido do soluto em referência à fase líquida (k_{La}) (Eq. 32-37).

$$P_{\text{gas}_{\text{H}_2}} = \frac{S_{\text{gas}_{\text{H}_2}} R T_{\text{op}}}{16} \quad \text{Eq. 30}$$

$$P_{\text{gas}_{\text{CO}_2}} = S_{\text{gas}_{\text{CO}_2}} R T_{\text{op}} \quad \text{Eq. 31}$$

$$P_{\text{gas}_{\text{H}_2\text{O}}} = 0,0313 e^{\left(\frac{5290}{T_{\text{base}}} \left(\frac{1}{T_{\text{base}}} - \frac{1}{T_{\text{operação}}} \right) \right)} \quad \text{Eq. 32}$$

$$P_{\text{gas}_{\text{Total}}} = P_{\text{gas}_{\text{H}_2\text{CO}_2}} + P_{\text{gas}_{\text{CO}_2}} + P_{\text{gas}_{\text{H}_2\text{O}}} \quad \text{Eq. 33}$$

$$K_{\text{H}_{\text{H}_2}} = 7,8 \cdot 10^{-4} e^{\left(\frac{-4180}{100R} \left(\frac{1}{T_{\text{base}}} - \frac{1}{T_{\text{operação}}} \right) \right)} \quad \text{Eq. 34}$$

$$K_{\text{H}_{\text{CO}_2}} = 0,035 e^{\left(\frac{-19410}{100R} \left(\frac{1}{T_{\text{base}}} - \frac{1}{T_{\text{operação}}} \right) \right)} \quad \text{Eq. 35}$$

$$\rho T_{\text{H}_2} = k_{La} (S_{\text{H}_2} - 16 K_{\text{H}_{\text{H}_2}} P_{\text{gas}_{\text{H}_2}}) \quad \text{Eq. 36}$$

$$\rho T_{\text{CO}_2} = k_{La} (S_{\text{CO}_2} - K_{\text{H}_{\text{CO}_2}} P_{\text{gas}_{\text{CO}_2}}) \quad \text{Eq. 37}$$

Cujo k_{La} adotado fora: 200 d^{-1} .

Por fim, a realização de purgas da fase gasosa do reator a cada aferição de gás deveria ser incluída no modelo. Considerou-se que a vazão de gás de saída do reator estaria sujeita à um coeficiente de fricção devido ao fluxo de gás restrito pelo orifício de saída (k_p) em função da Somatório das pressões dos gases ($P_{\text{gas}_{\text{total}}}$) e sua relação com a pressão atmosférica (P_{atm}). Desta forma, o gás seria transferido para a fase gasosa pela equação da taxa (Eq. 38), porém corrigida pela relação entre os volumes das fases, e o gás seria retirado do reator pela parcela negativa da equação, a qual considera a concentração do gás na fase gasosa e seu fluxo para o exterior (Eq. 39 e 40).

$$q_{\text{gas}} = k_p (P_{\text{gas}_{\text{total}}} - P_{\text{atm}}) \frac{P_{\text{gas}_{\text{total}}}}{P_{\text{atm}}} \quad \text{Eq. 38}$$

$$\frac{d S_{\text{gas}_{\text{H}_2}}}{dt} = -S_{\text{gas}_{\text{H}_2}} \frac{q_{\text{gas}}}{V_{\text{gas}}} + \rho T_{\text{H}_2} \frac{V_{\text{liquido}}}{V_{\text{gas}}} \quad \text{Eq. 39}$$

$$\frac{d S_{\text{gas CO}_2}}{dt} = -S_{\text{gas CO}_2} \frac{q_{\text{gas}}}{V_{\text{gas}}} + \rho T_{\text{CO}_2} \frac{V_{\text{liquido}}}{V_{\text{gas}}} \quad \text{Eq. 40}$$

Cujo k_p adotado fora: $5 \cdot 10^4 \text{ M} \cdot \text{bar}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

A proposta de modificar o ADM1 incluindo o processo de alongamento de cadeia, convertendo lactato e acetato em butirato, consistiu em desenvolver o modelo ADM-CE, o qual inclui o mecanismo de hidrólise da lactose (S_{ch}) (Eq. 41), alteração da Eq. 4 (Eq. 42) e na adição de outra equação de taxa de decaimento celular (Eq. 43).

$$\rho_{\text{HID, CH}} = k_{\text{hid, ch}} S_{\text{ch}} \quad \text{Eq. 41}$$

$$\rho_{\text{CE}} = k_{\text{m CE}} \frac{S_{\text{lac}}}{(K S_{\text{CE}} + S_{\text{lac}})} X_{\text{CE}} I_{\text{pH}} \quad \text{Eq. 42}$$

$$\rho_{\text{dec } X_{\text{CE}}} = k_{\text{d}} X_{\text{CE}} \quad \text{Eq. 43}$$

Com base nos trabalhos realizados por Pradhan *et al.* (2016), Kucek, Nguyen e Angenent (2016), Montecchio, Yuan e Malpei (2018), e Blanco, Oliveira e Zaiat (2019) pretendeu-se representar apenas as rotas de metabolismo do principal constituinte de soro de leite, ou seja, carboidratos (76,5%), na forma de lactose. Este modelo descreveria o processo de alongamento de cadeia a partir de uma biomassa independente das fermentadoras primárias (X_{CE}), as quais, são capazes de realizar fermentação primária, porém em menor velocidade sendo inibidas pela concentração de açúcar no meio (Eq. 44) (DIEZ-GONZALEZ; RUSSELL; HUNTER, 1995), alterando a Eq. 37 (Eq. 45).

$$I_{\text{comp}} = \frac{S_{\text{lac}}}{(S_{\text{ch}} + S_{\text{su}} + S_{\text{lac}} + 10^{-6})} \quad \text{Eq. 44}$$

$$\rho_{\text{CE}} = k_{\text{m CE}} \frac{S_{\text{lac}}}{(K S_{\text{CE}} + S_{\text{lac}})} X_{\text{CE}} I_{\text{pH}} I_{\text{comp}} \quad \text{Eq. 45}$$

Com a alteração das equações microbiológicas de taxa devido a introdução de uma cultura, as seguintes equações diferenciais de metabólitos precisaram ser alteradas (Eq. 47, 49 – 52) e acrescentadas (Eq. 46 e 48), ademais nenhuma outra equação foi modificada.

$$\frac{d S_{CH}}{dt} = -\rho_{HID,CH} \quad \text{Eq. 46}$$

$$\frac{d S_{su}}{dt} = \rho_{HID,CH} - \rho_{su} \quad \text{Eq. 47}$$

$$\frac{d X_{CE}}{dt} = Y_{CE} \rho_{CE} - \rho_{dec_{X_{CE}}} \quad \text{Eq. 48}$$

$$\frac{d S_{lac}}{dt} = (1 - Y_{su}) f_{lac-su} \rho_{su} - \rho_{lac} \quad \text{Eq. 49}$$

$$\frac{d S_{ac}}{dt} = (1 - Y_{su}) f_{ac-su} \rho_{su} - f_{ac-lac} \rho_{CE} \quad \text{Eq. 50}$$

$$\frac{d S_{H2}}{dt} = (1 - Y_{su}) f_{H2-su} \rho_{su} + (1 - Y_{CE}) f_{H2-lac} \rho_{lac} - \rho_{T_{H2}} \quad \text{Eq. 51}$$

$$\frac{d S_{but}}{dt} = (1 - Y_{CE}) f_{but-lac} \rho_{lac} \quad \text{Eq. 52}$$

4.2.2 Minimização e determinação de parâmetros

A minimização dos parâmetros livres utilizados nos modelos modificados de ADM1 foram obtidos pela função *fmincon* disponível em na plataforma Matlab®. Esta função permite a inclusão de eventos durante a minimização de parâmetros como dependências lineares e não lineares entre eles, bem como a determinação de limites superiores e inferiores para cada parâmetro (MATLAB, 2021). Para utilização de *fmincon* buscou-se minimizar uma função objetivo (SS), determinada pela soma do valor absoluto das diferenças entre dados experimentais (D_{EXP}) e simulados (D_{SIM}). Cada valor de E_i foi armazenado a cada tempo de integração (Eq. 53 e 54).

$$E_i = \sum_{n=1}^i (D_{EXP} - D_{SIM})^2 \quad \text{Eq. 53}$$

$$SS = \sum_{i=1} E_i \quad \text{Eq. 54}$$

Sendo, i é o número de conjuntos de dados experimentais;

E_i é a soma do valor absoluto das diferenças entre D_{EXP} e D_{SIM} , assumindo um valor a cada tempo de integração. O código desenvolvido em Matlab® para a minimização dos erros está disponível no Anexo 2.

4.2.3 Método de simulação de Monte Carlo associado às Cadeias de Markov

Com os valores dos parâmetros livres minimizados, iniciou-se o processo de criação das Cadeias de Markov a partir do algoritmo disponibilizado por Laine (2018)¹. Uma função simula números pseudoaleatoriamente a partir dos valores minimizados. Em seguida esses números foram testados sob inferência Bayesiana contra valores estabelecidos a priori, dando início a densidade de probabilidade. Essa densidade é distribuída dentro de um intervalo previamente definido, e no final das simulações, o teste diagnóstico de Geweke indica convergência ou não das Cadeias de Markov (HAARIO; SAKSMAN; TAMMINEN, 2001).

O algoritmo do método MCMC é responsável por determinar os parâmetros livres sob a ótica Bayesiana usando dos métodos estocásticos de Monte Carlo e Cadeias de Markov. O teorema de Bayes define que, dada a ocorrência de informações (distribuições) a priori do comportamento de um sistema, a probabilidade de um evento \mathbf{y} , dependente de um parâmetro θ , acontecer é igual a uma função de probabilidade de um evento \mathbf{y} acontecer sendo que θ já está sendo considerado (Eq. 55). O método de Monte Carlo é baseado na geração de números aleatórios para a composição de distribuições que irão determinar estatisticamente um parâmetro (Eq. 56). No entanto, em sistemas complexos como o proposto neste trabalho, séries de números aleatórios podem levar muito tempo até indicar convergência de valores, ou nem convergir. Para isto, a integração às Cadeias de Markov permitem a geração de valores pseudoaleatórios para compor estas distribuições, os quais agora são dependentes do último valor gerado. Isto implica num método de aprendizado, no qual o algoritmo aprende a selecionar amostras com base em correlação (SOLONEN, 2006; SAHLIN, 2011) (Eq. 57).

$$p(\theta; \mathbf{y}) = p(\mathbf{y}|\theta)\pi_{\text{a priori}}(\theta) \quad \text{Eq. 55}$$

$$\theta_t \approx N(\mu, \sigma) \quad \text{Eq. 56}$$

$$\theta_t \approx N(\theta_{t-1}, \sigma) \quad \text{Eq. 57}$$

Nem todos os valores gerados são aceitos para compor as Cadeias de Markov. Os algoritmos para essa tomada de decisão podem se basear em variados métodos. Neste trabalho, utilizou-se o método padrão disponibilizado por Haario (2006), o método DRAM (do inglês, Delayed Rejection method to the Adaptive Metropolis method). Trata-se de uma variação do

¹ Em 2018, Marko Laine disponibilizou gratuitamente e *online* um pacote de funções codificadas para Matlab® possibilitando inferências Bayesianas de modelos matemáticos que utilizem as simulações de Monte Carlo Cadeias de Markov. O MCMC TOOLBOX FOR MATLAB está disponível em: <https://mjlaine.github.io/mcmcstat/>.

algoritmo de Metropolis-Hastings que vem sendo comumente utilizada por ser mais robusta, capaz de convergir a partir de valores iniciais mal escolhidos ou de baixa representatividade (HAARIO, 2006). Para verificação da convergência do método MCMC, Sahlin (2011) sugere que a convergência ou não destas simulações sejam resolvidas visualmente. O autor propõe que diagnósticos de convergência sejam empregados, como o de Geweke, que analisa porções das Cadeias de Markov em busca de estabilidade (estados estacionários), que serão analisados por teste Z até que não haja diferença significativa (GEWEKE, 1991).

4.2.4 Modelo de fluidodinâmica computacional

O desenvolvimento de modelo CFD para representar a hidrodinâmica do AnSTBR operado em regime contínuo será realizado segundo metodologia proposta pelo GMP (WICKLEIN *et al.*, 2016), no software comercial COMSOL Multiphysics®.

Ensaio em batelada: utilizou-se a interface física disponível do módulo de engenharia de reações químicas (Reaction Engineering – re) com dependência do tempo (estudo dinâmico). Este modelo não considerou a geometria do sistema biológico (Figura 8, seção 1.6.1), apenas discretiza uma fase gasosa e outra líquida. Inicialmente determinou-se o sistema como uma batelada de volume constante, simplificando o modelo ao se retirar balanços de energia, considerando mistura perfeita no meio líquido (Eq. 58).

$$\frac{dC_i}{dt} = R_i \quad \text{Eq. 58}$$

No qual C_i representa a concentração do composto “i”, e R_i a taxa de reação do composto “i”.

Em seguida o modelo foi estruturado da mesma forma que em Matlab®, para representar os três modelos desenvolvidos. Criou-se uma aba contendo todos os parâmetros para organização do modelo. Para as equações microbiológicas de taxa, foi criada uma aba de variáveis chamada de Monod, agrupando-se as equações de taxa de reação. Para as equações de dissociação dos metabólitos envolvidos no cálculo de pH, foi criada uma aba de variáveis chamada de “Eq. Expressions”. Para as equações de cálculo de pH, foi criada uma aba de variáveis chamada de pH. Por fim, para as equações físicas representando a transferência de massa entre as fases, foi criada uma aba de variáveis chamada de *Fase Transfer* (Eq. 27-33).

Para o desenvolvimento das equações diferenciais, o COMSOL possibilita a criação de espécies químicas no módulo “re”. Desta forma, cada componente do modelo que apresenta

variação no tempo teve sua taxa de reação escrita individualmente. Todos os parâmetros foram mantidos idênticos àqueles utilizados e determinados no Matlab®.

AnSTBR: utilizou-se da interface física do Transporte de Espécies Químicas (*Chemical Species Transport*), selecionando o módulo de Fluxo Reativo em Meio Poroso (*Reacting Flow in Porous Media*), com Transporte de Espécies Diluídas (*Transport of Diluted Species*) a interface física foi gerada com dependência do tempo (estudo dinâmico). Este modelo considerou a geometria total do reator AnSTBR (Figura 8).

Criou-se a geometria do AnSTBR a partir da própria interface disponível no COMSOL Multiphysics® em geometria 3 D. Selecionou-se água como material principal do meio, mantendo-se suas características já disponíveis no software. No módulo de Fluxo Reativo em Meio Poroso foram determinadas as condições de contorno do sistema, como entrada e saída de fluxo (*inlet, outlet*) (Eq.59, 62 e 63) e de entrada e saída de metabólitos (*inflow, outflow*) (Eq. 60 e 61), paredes (Eq. 57). Criou-se o domínio de meio poroso (*Porous Matrix Properties*) e nele foram definidos porosidade (ϵ_p) e permeabilidade (κ) da matriz porosa. Sobre o meio poroso foram estabelecidas as equações de taxa (Eq. 59), como as descritas nos modelos em Matlab® pelos três modelos desenvolvidos. A partir deste momento utilizou-se os mesmos parâmetros utilizados e determinados no Matlab® para os modelos de batelada.

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} + \nabla \cdot (-D_i \nabla c_i) + u \cdot \nabla c_i = R_i \quad \text{Eq. 59}$$

$$N_i = - \nabla c_i + u c_i \quad \text{Eq. 60}$$

$$\rho \frac{\partial u}{\partial t} + \rho (u \cdot \nabla) u = \nabla [-pI + \mu(\nabla u + (\nabla u)^T)] + F \quad \text{Eq. 61}$$

$$\rho \nabla \cdot u = 0 \quad \text{Eq. 62}$$

$$\frac{\rho}{\epsilon_p} \left(\frac{\partial u}{\partial t} + (u \cdot \nabla) \frac{u}{\epsilon_p} \right) = \dots \quad \text{Eq. 63}$$

$$\nabla \cdot \left[-pI + \frac{\mu}{\epsilon_p} (\nabla u + (\nabla u)^T) - \frac{2\mu}{3\epsilon_p} (\nabla \cdot u) \right] - \left(\mu \kappa^{-1} + \beta_F |u| + \frac{Q_{br}}{\epsilon_p^2} \right) u + F$$

$$\rho \nabla \cdot u = Q_{br} \quad \text{Eq. 64}$$

$$\epsilon_p \frac{\partial c_i}{\partial t} + \nabla \cdot (-D_i \nabla c_i) + u \nabla c_i = R_i \quad \text{Eq. 65}$$

$$L_{entrada} \nabla_t \cdot [-pI + \mu(\nabla u + (\nabla u)^T)] = - p_{entrada} n \quad \text{Eq. 66}$$

$$c_i = c_{0j} \quad \text{Eq. 67}$$

$$-n \cdot D_i \nabla c_i = 0 \quad \text{Eq. 68}$$

$$n^T [-p_i + \mu(\nabla u + (\nabla u)^T)] n = -\hat{p}_0 \quad \text{Eq. 69}$$

$$\hat{p}_0 \leq p_0, u \cdot t = 0 \quad \text{Eq. 70}$$

No qual, D_i é o coeficiente de difusão, μ representa as viscosidades em coordenadas cartesianas, p é a pressão exercida, ϵ_p é a porosidade do meio, κ é a permeabilidade do meio, L_{entrada} é o comprimento da entrada, Q_{br} é a taxa de vazão, T é a temperatura, I é intensidade de turbulência, β_F é o coeficiente de Fochheimer e F é a atuação da força da gravidade no escoamento (COMSOL, 2014).

Utilizou-se a opção de criação automática das malhas, variando-se apenas o nível de detalhamento (de muito grosseira à fina, configuradas pelo próprio COMSOL Multiphysics®). O método de estudo das malhas consistiu na verificação do ajuste dos dados obtidos na simulação aos dados experimentais (LAURENT *et al.*, 2014). Em relação à configuração do solucionador de equações (em inglês, *solver*), o software COMSOL Multiphysics® já possui seu solver configurado para resolução de elementos finitos por métodos iterativos. Por fim, basta avaliar a convergência dos resultados e os erros envolvidos em cada etapa iterativa (WICKLEIN *et al.*, 2016).

4.2.5 Parâmetros utilizados nos modelos

Os parâmetros fixos empregados em ambos os modelos desenvolvidos nos softwares comerciais COMSOL e MATLAB estão tabelados abaixo. Físicos (Tabela 4), valores iniciais (Tabela 5), fatores de conversão para balanço de carbono (Tabela 6) e parâmetros químicos utilizados no balanço de potencial hidrogeniônico (Tabela 7).

Tabela 4. Parâmetros físicos e de operação empregados nos modelos de acordo com Blanco, Oliveira e Zaiat (2019)

Parâmetro	Valor	Unidade
R	0,083145	bar L mol ⁻¹ K ⁻¹
T_{base}	298,15	K
T_{op}	308,15	K
V_{LIQ}	2,0	L
V_{GAS}	3,0	L

Legenda: R, constante universal dos gases, T_{base} temperatura CNTP, T_{op} temperatura de operação, V_{LIQ} volume de líquido no reator, e V_{GAS} volume de gás no headspace.

Tabela 5. Valores iniciais empregados nos modelos desenvolvidos com base na literatura

Parâmetro	Concentração inicial de	Valor	Unidade	Fonte
S_{SU,0}	Açúcares	22,367	gDQO L ⁻¹	(1)
S_{BU,0}	Ácido butírico	0,000	gDQO L ⁻¹	(1)
S_{AC,0}	Ácido acético	0,000	gDQO L ⁻¹	(1)
S_{H2,0}	Hidrogênio	0,000	gDQO L ⁻¹	(1)
S_{Lac,0}	Ácido láctico	0,550	gDQO L ⁻¹	(1)
S_{IC,0}	Carbono inorgânico	0,153	gDQO L ⁻¹	(1)
S_{IN,0}	Nitrogênio inorgânico	0,130	gDQO L ⁻¹	(1)
S_{I,0}	Componentes inertes	0,850	gDQO L ⁻¹	(1)
X_{I,0}	Particulados inertes	0,000	gDQO L ⁻¹	(1)
S_{cat,0}	Cations solúveis	0,040	mol L ⁻¹	(2)
S_{an,0}	Anions solúveis	0,020	mol L ⁻¹	(2)
S_{Bum,0}	Butirato	0,000	mol L ⁻¹	(2)
S_{AcM,0}	Acetato	0,000	mol L ⁻¹	(2)
S_{HCO3m,0}	Bicarbonato	0,143	mol L ⁻¹	(2)
S_{NH3,0}	Amônia	0,004	mol L ⁻¹	(2)
S_{LacM,0}	Lactato	0,322	mol L ⁻¹	(2)
S_{H2 GAS,0}	H ₂	0,000	gDQO L ⁻¹	(1)
S_{CO2 GAS,0}	Dióxido de carbono	0,000	gDQO L ⁻¹	(1)
X_{SU,0}	Fermentadores de açúcar	0,200	gDQO L ⁻¹	(1)

Legenda: Fontes: 1. Blanco, Oliveira e Zaiat (2019), e 2. Danielsson (2014).

Tabela 6. Fatores de conversão entre números de mol de carbono contidos em grama de demanda química de oxigênio para os principais componentes do modelo.

Parâmetro	Fator de conversão molC de para gDQO	Valor	Unidade
C_{CH}	Carboidratos	0,0313	mol C gDQO ⁻¹
C_{SU}	Açúcares	0,0313	mol C gDQO ⁻¹
C_{BU}	Ácido butírico	0,025	mol C gDQO ⁻¹
C_{AC}	Ácido acético	0,0313	mol C gDQO ⁻¹
C_{BAC}	Bactérias	0,0313	mol C gDQO ⁻¹
C_{H2}	H ₂	0	mol C gDQO ⁻¹
C_{LAC}	Ácido láctico	0,0325	mol C gDQO ⁻¹

Fonte: modificado de Danielsson (2014).

Tabela 7. Parâmetros químicos de constantes de ionização e das constantes de conversão para equações diferenciais dos metabólitos empregados nos modelos modificados, continua

Parâmetro	Valor	Unidade
K_w	2,08 E-10	mol L ⁻¹
$K_{A_{BU}}$	1 E -4,82	mol L ⁻¹
$K_{A_{PRO}}$	1 E -4,88	mol L ⁻¹
$K_{A_{AC}}$	1 E -4,76	mol L ⁻¹
$K_{A_{LAC}}$	1 E -3,82	mol L ⁻¹
$K_{A_{CO2}}$	4,94 E -07	mol L ⁻¹
$K_{A_{IN}}$	1,11 E -09	mol L ⁻¹
$K_{AB_{BU}}$	1 E 10	mol L ⁻¹ h ⁻¹
$K_{AB_{PRO}}$	1 E 10	mol L ⁻¹ h ⁻¹
$K_{AB_{AC}}$	1 E 10	mol L ⁻¹ h ⁻¹
$K_{AB_{CO2}}$	1 E 10	mol L ⁻¹ h ⁻¹
$K_{AB_{IN}}$	1 E 10	mol L ⁻¹ h ⁻¹
$K_{AB_{LAC}}$	1 E 10	mol L ⁻¹ h ⁻¹

O arquivo código desenvolvido em Matlab® que agrupa os valores iniciais das variáveis, o solver de EDOs e chama as funções de MCMC está disponível no Anexo 3.

4.2.6 Comparação dos dados simulados e experimentais

O comparativo entre os dados obtidos por cada modelo foi analisado pela somatória da raiz dos quadrados da média dos erros (RMSE, do inglês *root mean square of residuals*, Eq. 72).

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{\sum E_i^2}{N_i}} \quad \text{Eq. 72}$$

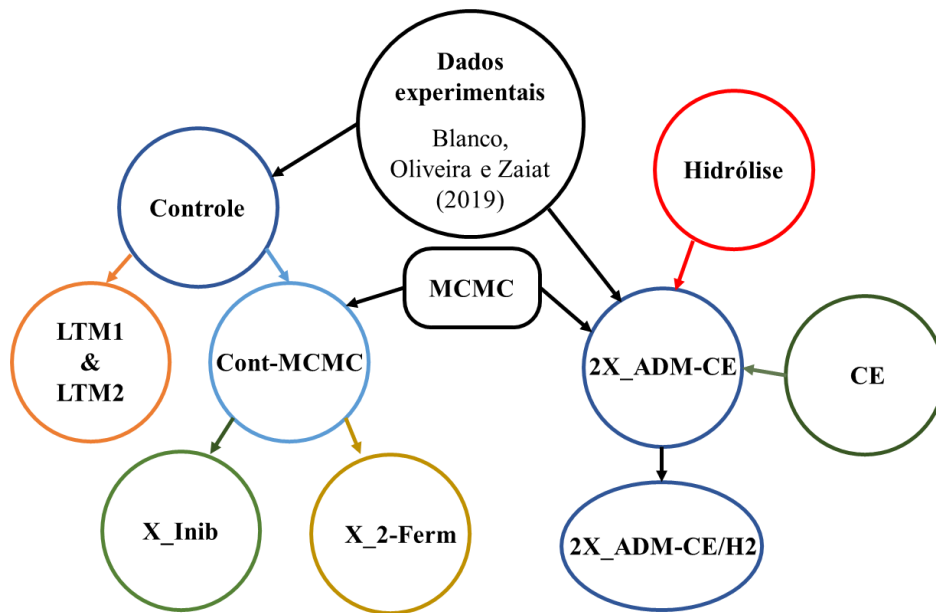
No qual N_i representa o número de amostras de cada modelo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das equações propostas na sessão 4.2 deste trabalho propôs-se os seguintes modelos para representação das bateladas experimentais (Figura 9). Primeiramente o modelo controle buscou representar o modelo proposto por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019), a partir dos mesmos valores de constantes estequiométricas e parâmetros cinéticos. Em seguida foi proposta a verificação da integração dos fenômenos de transferência de massa entre fases a partir de dois mecanismos diferentes, os modelos LTM1 e LTM2. Derivado do modelo Controle, o Modelo Cont-MCMC buscou determinar os parâmetros cinéticos utilizados por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019) a partir do método de MCMC que foi acoplado ao modelo cinético em Matlab. E sobre esse modelo foram propostos outros dois modelos: o X_Inib, considerando os efeitos de inibição competitiva da biomassa pelo açúcar do meio e o X_2-Ferm em que se propôs a determinação de parâmetros em dois eventos fermentativos distintos.

Em um segundo momento, propôs-se outro modelo considerando o Alongamento de Cadeia (CE) por organismos especializados (2X_ADM-CE), diferenciando os organismos fermentadores primários dos secundários (Figura 9). Neste modelo considerou-se também uma etapa prévia de hidrólise da lactose em seus monômeros glicose e galactose. No 2X_ADM-CE considerou-se que ambos fermentadores primários e secundários estariam sujeitos ao crescimento celular a partir do consumo de glicose, e acetato e lactato, respectivamente. Considerou-se que os organismos alongadores de cadeia sofreriam inibição competitiva pela concentração de açúcar no meio e para a determinação dos parâmetros propostos nesse modelo, acoplou-se o método de MCMC. A partir do modelo 2X_ADM-CE buscou-se verificar também a influência dos efeitos da limitação de transferência de massa entre fases no modelo 2X_ADM-CE/H2.

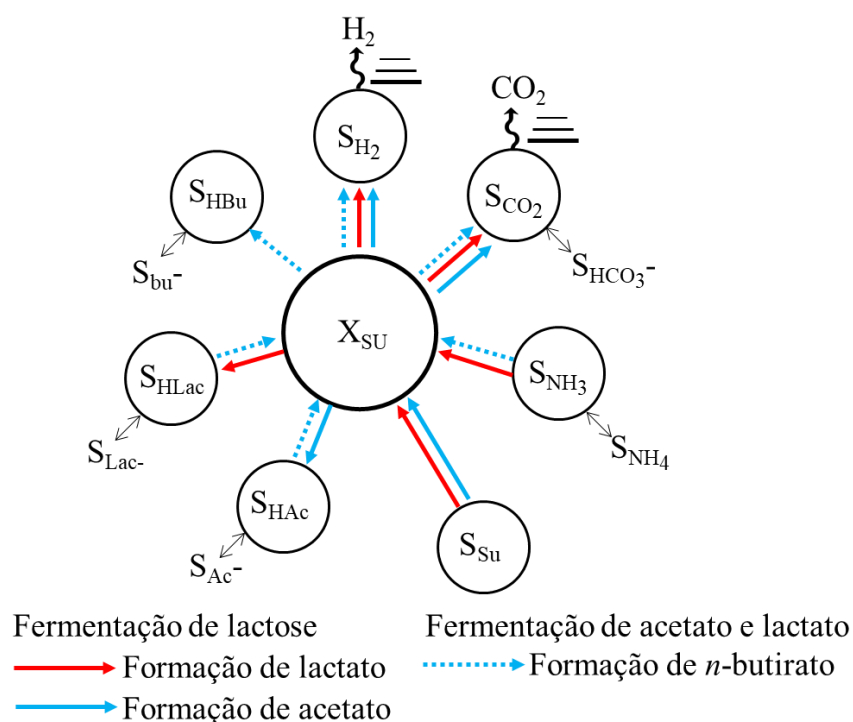
Figura 9. Fluxograma de modelos desenvolvidos neste trabalho na plataforma Matlab® a partir dos dados experimentais providos por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019)



5.1 Modelos considerando apenas uma biomassa

Primeiramente, baseando-se no trabalho de Blanco, Oliveira e Zaiat (2019), considerou-se o modelo cuja fermentação de carboidratos seria realizada pelos microrganismos fermentadores (X_{SU}), levando à formação de acetato, lactato e H_2 (Figura 10, setas contínuas), sendo que parte dessa matéria orgânica seria utilizada para crescimento celular. Posteriormente, após total consumo destes, a principal reação passaria a ser a de fermentação do lactato, na qual haveria a formação de butirato e H_2 (Figura 10, setas pontilhadas). Em ambos momentos foram consideradas a formação de gás carbônico devido a fermentação e consumo de amônia graças ao crescimento celular e a dinâmica entre espécies químicas e suas formas ionizadas dos principais metabólitos (Figura 10, setas duas pontas).

Figura 10. Modelo conceitual para todos os modelos desenvolvidos com apenas uma biomassa, no qual se envolve acidogênese de lactose e fermentação de lactato pela mesma biomassa



Fonte: modificado de Blanco, Oliveira e Zaiat (2019).

Neste modelo, foi considerado que a fonte de carboidratos, a lactose, não passaria por um processo prévio de hidrólise, sendo degradada diretamente pelos microrganismos fermentadores. Além disso, conforme sugerido pelos autores, em um primeiro momento desconsiderou-se as resistências sobre a transferência de massa do H_2 entre fases (indicado pela seta ondulada com apenas um sentido).

Para a representação dos processos esquematizados no modelo conceitual, desenvolveu-se a matriz de Peterson. Nesta os processos são dispostos em linhas, enquanto que cada coluna representa os componentes participantes dos processos, de acordo com seus coeficientes de rendimentos de produto sobre substrato e de rendimento celular (Tabela 3). Na extremidade direita da matriz estão dispostas as equações de taxas de reação referentes ao processo (Eq. 24-29). Estas deverão ser inclusas no modelo matemático que representará o procedimento realizado em laboratório (Tabela 8). Para efeito de simplificação, apenas os processos verificados nas bateladas realizadas em laboratório foram incluídos nas tabelas, uma vez que o ADM1 todo apresenta mais de 30 variáveis de processo.

A partir dos dados experimentais, os coeficientes estequiométricos dos metabólitos foram substituídos nos respectivos processos para verificação dos balanços de carbono e DQO. É importante ressaltar que ao se considerar a lactose como principal constituinte do soro de leite (cerca de 76%), e por não haver análises de composição proteica das bateladas, o balanço de compostos nitrogenados foi desconsiderado (Tabela 9). Porém, devido a importância das espécies amônia e amoníaco no balanço de pH, adotou-se um valor inicial para amônia com base na literatura (Tabela 5), e esta foi incluída apenas no modelo modificado do ADM1.

Tabela 8. Matriz de Peterson simplificando os processos e componentes envolvidos no processo fermentativo observado por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019)

Componente → i		1	2	3	4	5	6	7	8	ρ_j [kg DQO m ⁻³ d ⁻¹]
j	Processo ↓	S _{SU}	S _{BU}	S _{AC}	S _{LAC}	S _{H2}	S _{IC}	S _{IN}	X _{SU}	
1	Consumo de lactose	-1		$(1-Y_{su})f_{ac,su}$	$(1-Y_{su})f_{lac,su}$	$(1-Y_{su})f_{h2,su}$	$-\sum_{i=1}^n C_i v_{i,1}$	$-(1-Y_{su})N_{bac}$	Y_{su}	$k_{m,su} \frac{S_{su}}{K_s + S_{su}} X_{su} I_1$
2	Consumo de butirato		-1							
3	Consumo de acetato			-1						
4	Consumo de H ₂					-1				
5	Consumo de lactato		$f_{bu,lac}$	$f_{ac,lac}$	-1	$f_{h2,lac}$	$-\sum_{i=1}^n C_i v_{i,3}$			$k_{m,lac} \frac{S_{lac}}{K_{s,lac} + S_{lac}} X_{suf} I_1$
6	Decaimento X _{SU}								-1	$k_{dec,Xsu} X_{su}$
		Açúcares totais [kg DQO m ⁻³]	n-butirato total [kg DQO m ⁻³]	Acetato total [kg DQO m ⁻³]	Lactato total [kg DQO m ⁻³]	H ₂ [kg DQO m ⁻³]	Carbono inorgânico [kmol C .m ⁻³]	Nitrogênio inorgânico [kmol N .m ⁻³]	Fermentadores de açúcar [kg DQO m ⁻³]	Fatores de inibição: $I_1 = I_{pH} I_{IN,lim}$

Adaptado de Batstone e colaboradores (2002).

Tabela 9. Matriz de Gujer com balanços de carbono e demanda química de oxigênio para os processos explorados no modelo desenvolvido por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019).

Componente → i		1	2	3	5	4	6	7	8	Balanços	
		S _{SU}	S _{BU}	S _{AC}	S _{LAC}	S _{H2}	S _{IC}	X _{CH}	X _{SU}		
DQO		1	1	1	1	1	0	1	1		
Conteúdo de carbono		0,0313	0,0250	0,0313	0,0311	0,0000	1,0000	0,0313	0,0305		
Processo ↓ j		S _{SU}	S _{BU}	S _{AC}	S _{LAC}	S _{H2}	S _{IC}	X _{CH}	X _{SU}	DQO	C
1	Consumo lactose	-1,00		0,22	0,60	0,02	0,00		0,17	0,00000	0,00000
2	Consumo butirato									0,00000	0,00000
4	Consumo acetato									0,00000	0,00000
5	Consumo hidrogênio									0,00000	0,00000
6	Consumo lactato		1,38	-0,44	-1,00	0,06	0,01		0,00	0,00000	0,00000
7	Decaimento celular						0,00	1,00	-1,00	0,00000	0,00000

Adaptado de Flores-Alsina e colaboradores (2016).

Pode-se observar na Tabela 10, linha 1, referente ao consumo de lactose, que foi desconsiderado o processo de hidrólise de carboidratos complexos. Além disso, na linha 6, para o processo de consumo de lactato, não foi incluído o coeficiente de rendimento celular. O critério utilizado para essa exclusão foi baseado em observações dos resultados experimentais colhidos em laboratório, apresentados a seguir (Blanco, Oliveira e Zaiat, 2019).

Na matriz de Gujer são apresentados os componentes do modelo (colunas i) para cada qual foi atribuído se ele apresenta ou não valor de DQO (linha DQO, 1 e 0 respectivamente), e seu equivalente em conteúdo de carbono. Para cada processo, a representação do respectivo coeficiente de rendimento foi calculada pelo valor do coeficiente estequiométrico multiplicado pelo total subtraído do rendimento celular, pois desta forma, o rendimento celular não seria contabilizado várias vezes no final do somatório de ambos balanços. O componente de carbono inorgânico agrega ao somatório dos produtos entre os coeficientes de rendimento e o equivalente em carbono do componente. Dessa forma, após a verificação do fechamento dos balanços de massa para DQO e carbono, seguiu-se para a modificação do ADM1 em Matlab®.

5.1.1 Modificação do ADM1 em MATLAB®, modelo controle, X_Cont

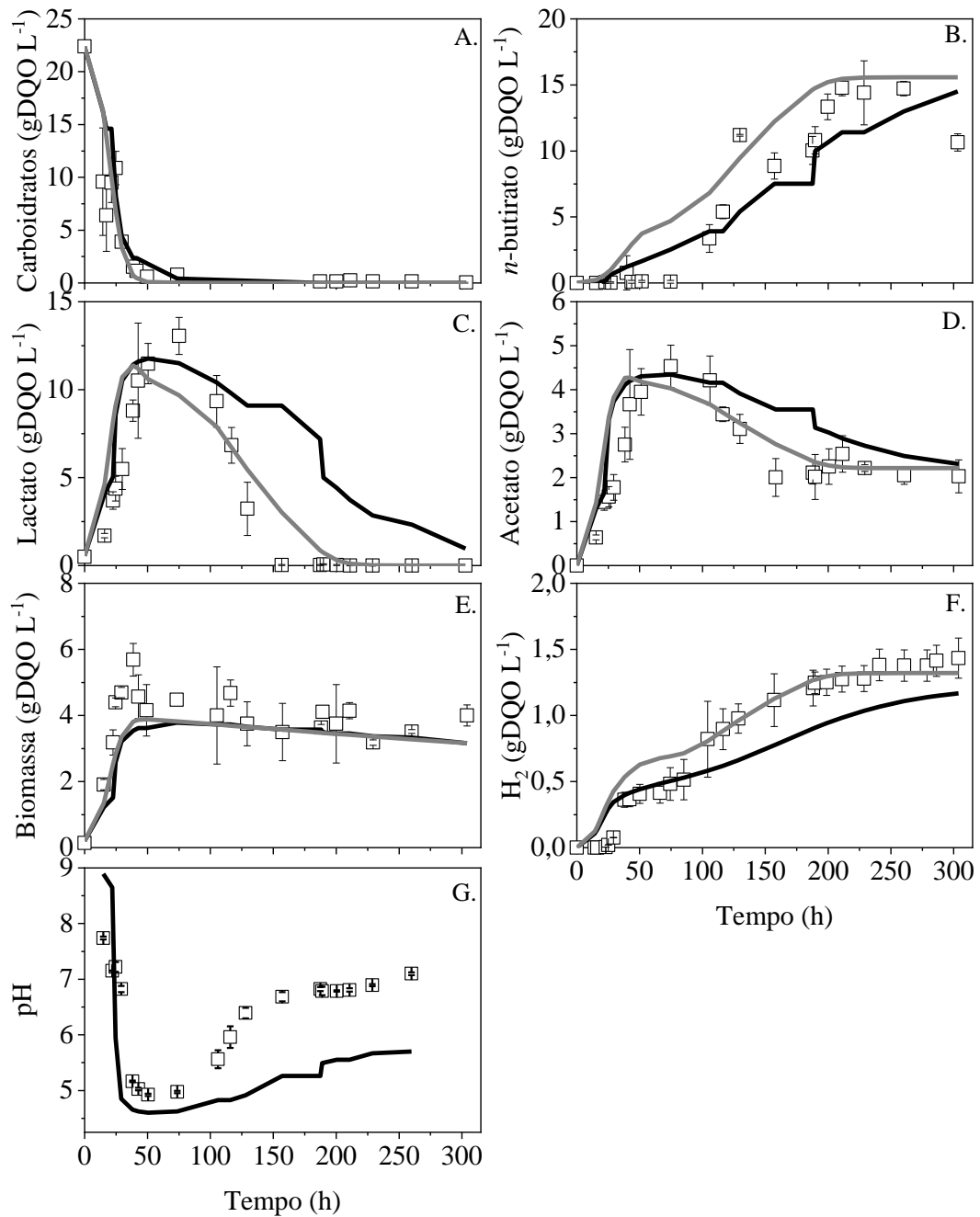
Para o desenvolvimento de todos os modelos, inclusive o controle, modificou-se a estrutura do ADM1, removendo-se as frações de macronutrientes proteínas e gorduras, e seus posteriores processos de hidrólise. Dessa forma, os processos dependentes dos produtos da hidrólise dos macronutrientes foram desconsiderados. Sendo assim, avaliou-se apenas os metabólitos apresentados na Figura 9, carboidratos totais, lactato, acetato, butirato, H₂, sendo estes intermediados pela biomassa fermentadora de carboidratos.

Este primeiro modelo ainda desconsiderava as equações de transferência de H₂ entre fases, portanto, a Eq. 35 de vazão do conteúdo gasoso das bateladas foi considerada igual a zero. Desta forma, tanto a vazão de H₂ quanto a de gás carbônico foram impactadas. Considerou-se as duas formas de inibição das equações de fermentação de carboidratos e de lactato, ou seja, devido à influência do pH e devido ao nitrogênio amoniacal. Por fim, os valores das constantes cinéticas de velocidade máxima de consumo de açúcar e lactato, constantes de meia saturação de açúcar e lactato, bem como o coeficiente de rendimento celular foram mantidos os mesmos (Tabela 3).

O modelo controle foi executado com sucesso e não apresentou problemas de integração, não excedendo os limites de $1E^{-12}$ estabelecidos pelo integrador ODE15s, tendo seus

resultados comparados aos dados experimentais e ao modelo desenvolvido por Blanco Oliveira e Zaiat (2019) (Figura 11).

Figura 11. Comparativo de resultados experimentais (\square) com suas respectivas barras de erro, dados simulados no modelo desenvolvido por Branco, Oliveira e Zaiat (2019) (—) e do modelo Controle (—)



Fonte: adaptado de Branco, Oliveira e Zaiat (2019).

Observando-se os resultados da modelagem matemática, nota-se que ambos modelos, apresentaram resultados próximos aos dados experimentais (do inglês, *fitting*, ajuste, encaixe, adequado, condizente). Visualmente, para alguns componentes, como os de consumo de lactato e acetato a partir de 75 h e de síntese de H₂ e *n*-butirato, o modelo desenvolvido por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019) pareceu ajustar-se melhor aos dados experimentais. No entanto, pelos modelos serem idênticos, acredita-se que essa variação seja apenas em relação ao *software* utilizado para integração do modelo. Mais precisamente, sobre o método de integração, já que Blanco, Oliveira e Zaiat (2019) utilizaram o método de Runge Kutta de 4ª ordem, enquanto que o modelo controle sofreu integração pelo solucionador de equações diferenciais rígidas (do inglês, *stiff differential equations solver*), ODE15s.

Apesar disso, o modelo controle representou de maneira adequada os principais eventos observados nos dados experimentais, sendo: o completo consumo de carboidratos nas primeiras 75 h (Figura 11 A) e a queda abrupta de pH nas primeiras 50h (Figura 11 G), resultado da produção de lactato e acetato, principalmente. Além disso, as simulações de consumo de carboidratos totais e de crescimento celular também estão condizentes ao observado experimentalmente (Figura 11 E). As deficiências do modelo foram as mesmas obtidas por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019), cuja síntese de *n*-butirato também se mostrou antecipada (Figura 11 B), bem como os picos de produção de lactato e acetato, que atingiram os valores de pico e tiveram seu consumo iniciado antecipadamente (Figura 11 C e D). Esta imperfeição do modelo pode ser explicada devido à ausência de um fator que impossibilite o desencadeamento destas reações, como total consumo de carboidratos.

Algumas bactérias como os *C. acetobutylicum* são capazes de fermentar tanto açúcares simples quanto metabólitos secundários como o lactato e acetato. Diez-Gonzalez, Russel e Hunter (1995), verificaram a influência dos substratos presentes no meio de cultura dessas bactérias. Aquelas que se adaptaram a meios contendo acetato e lactato apresentam maiores atividades enzimáticas de lactato desidrogenase independente da concentração de NAD. Sendo assim, estes microrganismos se mostram mais adaptados ao meio em relação àquelas que se desenvolveram em outros meios sejam eles contendo apenas glicose ou glicose e acetato para a síntese de H₂ e *n*-butirato. Esta seria a primeira evidência de que pode haver a ocorrência de inibição desses microrganismos consumidores de lactato nas primeiras horas de batelada, devido à concentração de açúcares presentes no meio.

Em relação as simulações de rendimentos de H₂, ambos modelos superestimaram sua produção no início da fermentação, até 75 h. Mas após este ponto, no que diz respeito ao consumo de acetato e lactato para formação de *n*-butirato e H₂, a curva deste gás se ajustou aos

dados experimentais até cerca de 200 h. Momento no qual todo reagente limitante lactato é consumido, cessando as reações (Figura 11 F).

Houve uma ligeira alcalinização do meio após cerca de 75 h, onde o pH foi elevado de entorno de 4,5 até 5,5. Mas diferentemente do observado experimentalmente, o modelo Controle não conseguiu rebalancear o pH do sistema até o patamar de neutralidade (Figura 11 G).

5.1.2 Modificação do ADM1 em MATLAB®, modelo controle com transferência de massa entre fases, X_LTM1 e X_LTM2

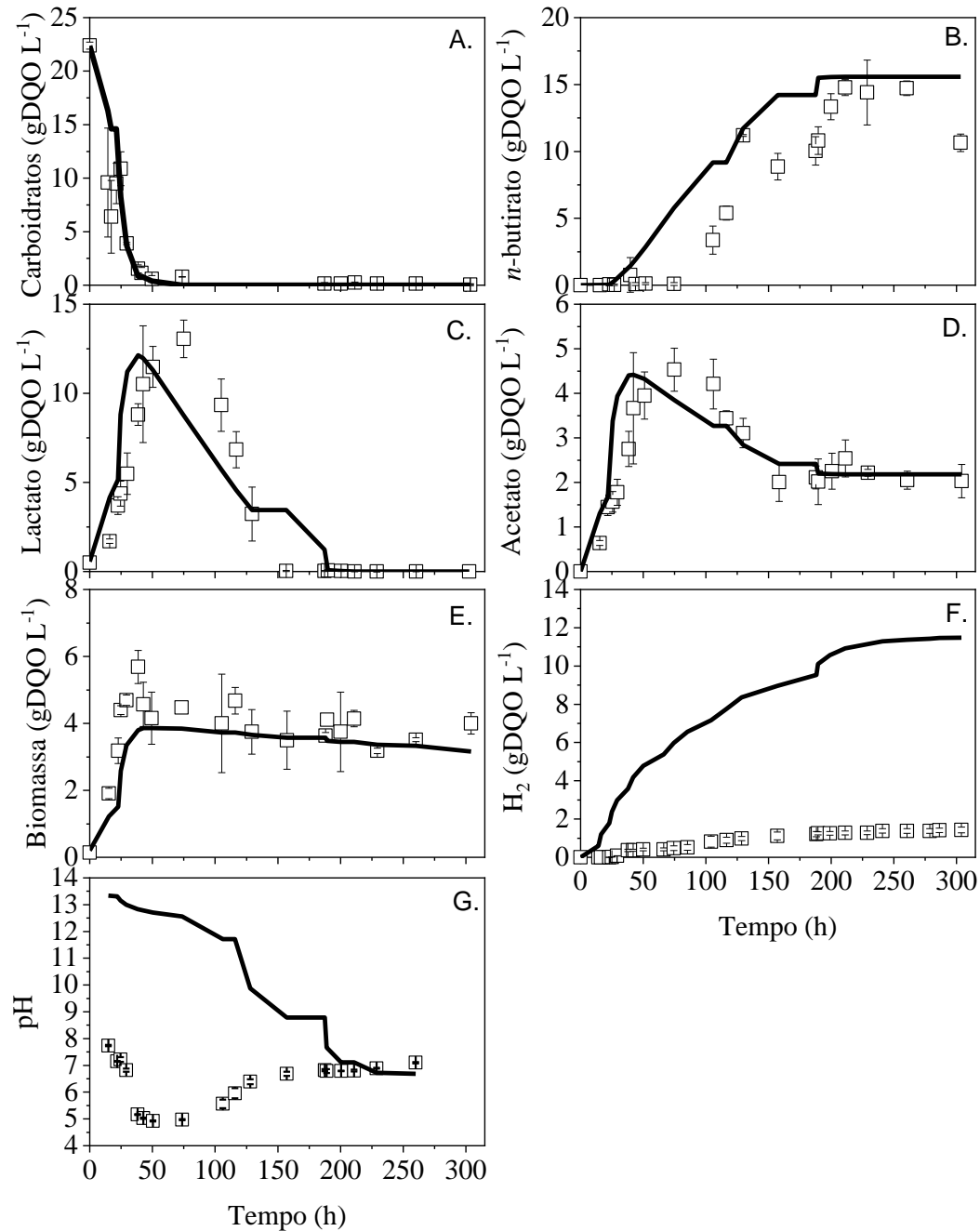
Buscando primeiramente compreender a questão da participação dos fenômenos de transferência de massa no modelo e sua influência no cálculo do pH, adicionou-se ao modelo o efeito da vazão de gás sugerido por Batstone e colaboradores (2002), descrito pela Eq. 38. Essa equação considera que há um fator de fricção na saída de gás dos reatores (k_p), que implica na redução da vazão da saída quando a pressão de gás interna (P_{gas}) é superior a pressão atmosférica (P_{atm}). Denominou-se este modelo como X_LTM1 e os resultados da simulação estão disponíveis nas Figura 12.

Pode-se observar que as simulações dos metabólitos secundários acetato, lactato e *n*-butirato mantiveram-se semelhantes ao modelo anterior, assim como o consumo de açúcares totais e o crescimento de biomassa. No entanto, optar pela introdução do mecanismo de transferência de massa, reduziu drasticamente a capacidade do modelo de representar a produção de H_2 . Desde o início da simulação, a vazão de gás é excessiva e acaba influenciando na remoção do H_2 da fase líquida, o que mostra nessa condição que a produção de H_2 acumulada excedeu em 800% a produção experimental (Figura 12 F). Buscando verificar se a divergência dos valores de pH e H_2 obtidos no modelo anterior eram reflexo da função escolhida para representar a vazão gasosa do reator de batelada, alterou-se a Eq. 38 do modelo pela Eq.66. Denominou-se o modelo de Modelo X_LTM2:

$$q_{\text{gas}} = \frac{R T_{\text{op}}}{(P_{\text{gas total}} - P_{\text{gas H}_2\text{O}})} V_{\text{Liq}} (\rho_{\text{T H}_2} + \rho_{\text{T CO}_2}) \quad \text{Eq. 66}$$

Rosèn e Jeppsson (2006) sugerem que essa equação seja evitada por apresentar comumente problemas numéricos de resolução devido ocorrência de estados estacionários durante a resolução dos sistemas de equações. Mesmo assim optou-se por simular novamente

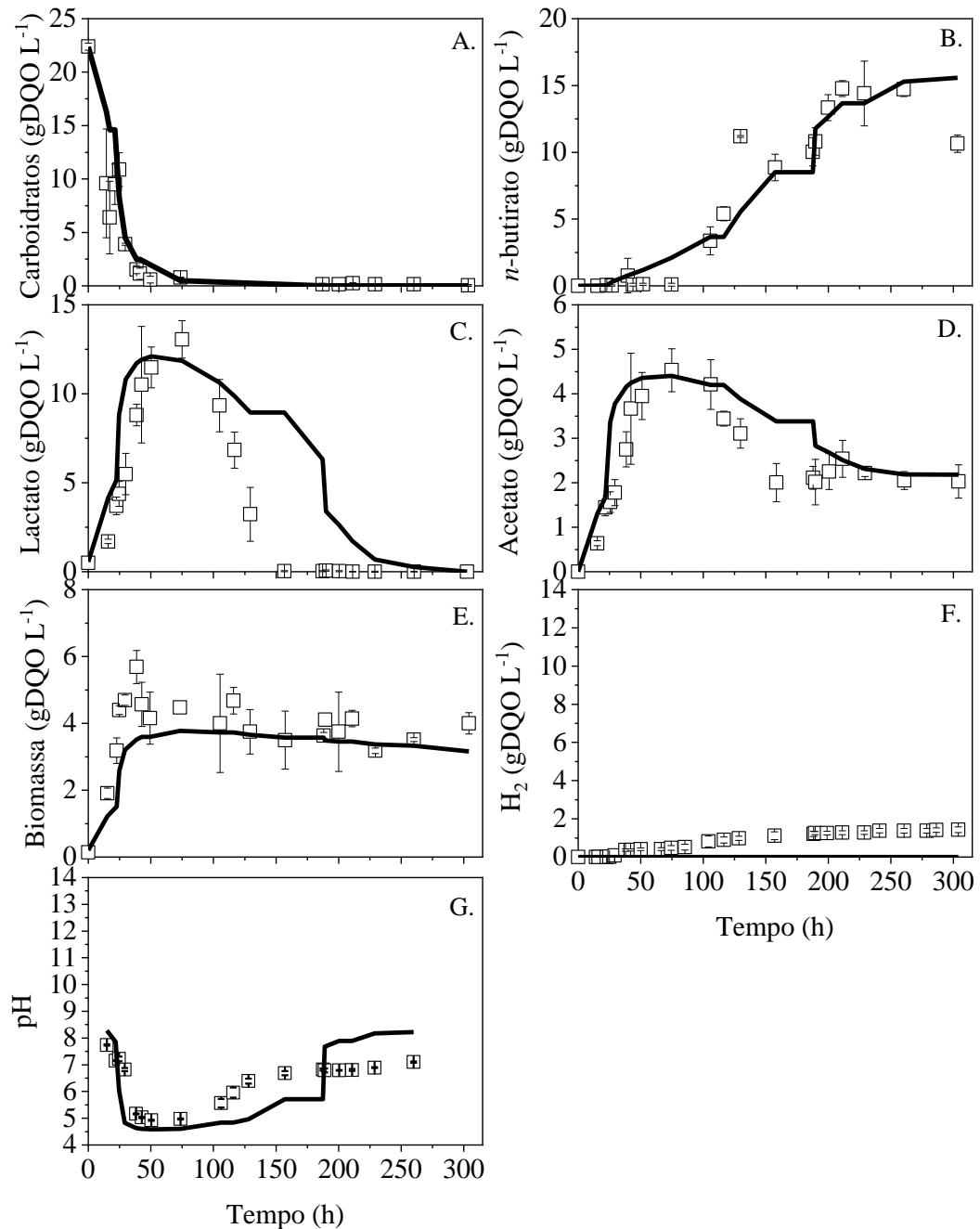
Figura 12. Comparativo de resultados experimentais (\square), com suas respectivas barras de erro, e do Modelo X_LTM1 (—) do presente trabalho considerando fenômenos de transferência de massa entre fases líquida e gasosa com equação proposta por Batstone (2002)



Fonte: adaptado de Branco, Oliveira e Zaiat (2019).

o modelo com esta alteração para observar os comportamentos do modelo frente a essa alteração da vazão (Figura 13).

Figura 13. Comparativo de resultados experimentais (\square), com suas respectivas barras de erro, e do modelo de simulação do presente trabalho considerando fenômenos de transferência de massa entre fases líquida e gasosa com equação proposta por Rosèn e Jeppsson (2006), modelo X_LTM2 (—)



Fonte: adaptado de Branco, Oliveira e Zaiat (2019).

Pode-se observar que para o caso da simulação do consumo de carboidratos e de biomassa não houve alteração notável (Figura 13 A e E), porém, para os metabólitos secundários acetato e lactato, nota-se o atraso em seus consumos após a formação do pico de

síntese, em torno de 75 h (Figura 13 C e D). Isto permitiu que a concentração de *n*-butirato prevista pelo modelo se ajustasse melhor aos dados experimentais, uma vez que os parâmetros cinéticos foram mantidos idênticos aos determinados por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019). Já para a representação do H₂, o modelo foi incapaz de simular sua produção. Mesmo na fase líquida, os valores ficaram bastante inferiores aos experimentais, e este fato não foi devido à transferência do H₂ para a fase gasosa (Figura 13 F). Em relação ao pH, os resultados ficaram próximos ao primeiro modelo, porém, com atraso a partir do momento de alcalinização do meio, em torno de 100 h, reflexo do consumo dos metabólitos secundários (Figura 13 G).

5.1.3 Modificação do ADM1 em MATLAB® para determinação de parâmetros por simulações de Monte Carlo Cadeias de Markov – modelo Cont-MCMC

Tendo observado que os modelos com limitações à transferência de massa entre fases X_LTM1 e X_LTM2 não proporcionaram bons ajustes para produção de H₂ e valores de pH, buscou-se manter o modelo controle, e verificar o comportamento das simulações de Monte Carlo associado às Cadeias de Markov (MCMC) na determinação dos parâmetros cinéticos referentes às equações cinéticas de Monod, sendo: velocidades máximas de consumo de carboidratos e de lactato ($k_{m_{SU}}$, $k_{m_{Lac}}$), suas respectivas constantes de meia saturação ($K_{S_{SU}}$, $K_{S_{Lac}}$) e o rendimento celular a partir de carboidratos (Y_{SU}).

Antes de prosseguir com as tentativas de determinação de parâmetro, observou-se que os resultados da aplicação de MCMC tendiam a se aproximar melhor dos dados experimentais que possuíam maior número de amostragens no tempo. Para contornar essa situação, utilizou-se as funções β -*spline* para gerar pontos para que todas as variáveis possuíssem o mesmo número de amostragens, fixando-se o número total de pontos em 100. Posteriormente, para determinação dos erros entre os modelos, utilizou-se os dados experimentais brutos.

Além disso, notou-se que durante simulações anteriores (não apresentadas neste trabalho), os parâmetros que exercem relação proporcional e inversamente proporcional ao consumo de substratos na equação de Monod (Eq. 6 e 7, por exemplo para o consumo de açúcares lactato, respectivamente), levavam o algoritmo a tomar mais tempo para o término das simulações e os resultados dos diagnósticos de Geweke implicavam em baixa convergência das distribuições destes parâmetros à Normal. Bem como a apresentação de valores muito altos para equilibrar o resultado de velocidade máxima de consumo de substrato, ou valores muito baixos para o coeficiente de rendimento celular. Em vista disso, empregou-se limites tanto para *fmincon* quanto para MCMC (Tabela 10).

Tabela 10. Limites estabelecidos para a função *fmincon* e algoritmo de Monte Carlo Cadeias de Markov para a determinação de parâmetros livres dos modelos

Parâmetro	Limite inferior	Limite superior
k_{msu}	1 E-3	10
K_{Ssu}	1 E-3	100
Y_{Su}	1 E-3	0,5
k_{mLac}	1 E-3	1
K_{SLac}	1 E-3	10

Comparou-se os efeitos do aumento do número de iterações na cadeia de Markov de 5.000 a 50.000 ao determinar os parâmetros cinéticos livres pelo método de MCMC. Após realizar as simulações das condições propostas de número de iterações para a cadeia de Markov, dispôs-se os resultados da determinação de parâmetros abaixo (Tabela 11).

Tabela 11. Resumo dos parâmetros determinados pelo método de Monte Carlo Cadeias de Markov, para o modelo Cont-MCMC de 5.000 até 50.000 iterações por simulação

MC	Parâmetro	Média	Desvio padrão	Erro Monte Carlo	Tau	Geweke
5.000	k_{msu}	3,09	0,84	0,0536	21,16	0,95
	K_{Ssu}	70,76	20,70	1,3387	22,58	0,99
	Y_{Su}	0,21	0,02	0,0015	25,89	0,95
	K_{mLac}	0,03	0,01	0,0007	29,13	0,69
	K_{SLac}	4,02	2,88	0,2411	28,54	0,33
10.000	k_{msu}	2,97	0,97	0,0550	42,90	0,95
	K_{Ssu}	66,88	24,04	1,3599	33,62	0,96
	Y_{Su}	0,21	0,02	0,0017	34,55	0,95
	K_{mLac}	0,04	0,01	0,0009	46,34	0,81
	K_{SLac}	4,40	2,89	0,2334	48,51	0,30
15.000	k_{msu}	2,94	0,92	0,0364	25,75	0,93
	K_{Ssu}	66,90	23,31	0,9217	23,60	0,90
	Y_{Su}	0,21	0,02	0,0011	34,54	0,98
	K_{mLac}	0,03	0,01	0,0007	43,81	0,77
	K_{SLac}	4,49	2,93	0,2039	44,55	0,47
20.000	k_{msu}	2,98	0,93	0,0409	35,04	1,00
	K_{Ssu}	67,63	23,64	1,0323	34,65	0,99
	Y_{Su}	0,21	0,02	0,0010	27,95	1,00
	K_{mLac}	0,03	0,01	0,0004	35,62	0,91
	K_{SLac}	4,44	2,90	0,1386	38,84	0,63
50.000	k_{msu}	2,98	0,86	0,0253	29,36	0,95
	K_{Ssu}	70,01	22,11	0,5738	30,45	0,97
	Y_{Su}	0,21	0,02	0,0006	37,65	0,99
	K_{mLac}	0,04	0,01	0,0006	57,04	0,87
	K_{SLac}	4,61	2,84	0,1323	45,92	0,61

As simulações MCMC vinculadas ao Modelo controle foram realizadas com sucesso. O tempo total de simulação aumentou consistentemente com o aumento do número de iterações, partindo do entorno de 6 h para o modelo de 5.000 iterações até mais de 52 h para o modelo de 50.000 iterações. Três principais fatores chamam atenção na comparação dos estudos por MCMC, sendo eles: a variação do desvio padrão e do erro relacionado ao método estocástico de Monte Carlo com o aumento do número de iterações, e outro é o aumento dos valores do diagnóstico de Geweke com o aumento das iterações (Tabela 11).

Os resultados das simulações de MCMC mostram que os parâmetros relacionados ao consumo de acetato e lactato apresentam grandes desvios padrão relacionados a estimativa destes parâmetros chegando até 72% para o caso da KS_{Lac} . Os parâmetros k_{MSU} e KS_{SU} , bem como k_{MLac} também apresentaram desvios padrão relativamente altos, representando em média, 30% do valor médio. A taxa de crescimento celular Y_{SU} foi o parâmetro que apresentou desvios padrão menores, dentro de 10 a 12% do valor médio (Tabela 11).

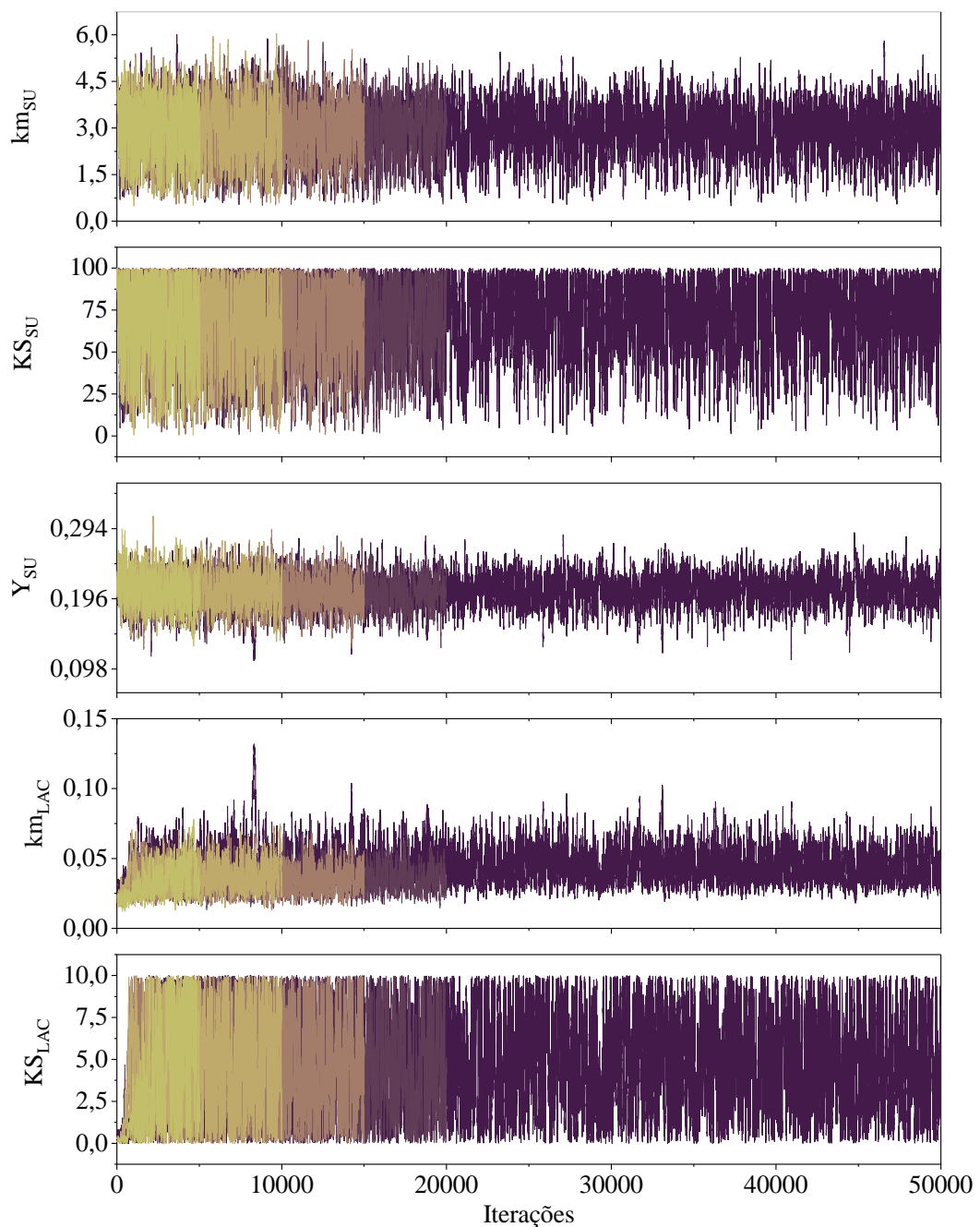
O erro relacionado à aplicação do método de Monte Carlo na determinação de parâmetros apresentou valores cada vez mais baixos com o aumento do número de iterações. Esta redução pode ser mais bem observada nos parâmetros de constantes de meia saturação tanto do consumo de açúcares quanto de lactato. De acordo com (HASTINGS, 1970), os erros associados ao método de Monte Carlo provêm de várias fontes, como o próprio processo de se gerar valores aleatórios, da própria normalidade da distribuição dos valores, erros computacionais e também devido ao tamanho das amostras. Por isso, percebe-se a redução dos erros do método de Monte Carlo com o aumento das iterações.

Similarmente, o aumento do número de iterações implicou no aumento dos valores de diagnóstico de Geweke. Este padrão pode ser observado principalmente em relação aos parâmetros relacionados ao consumo de lactato, k_{MSU} e KS_{SU} . O diagnóstico de Geweke é um indicador de convergência das Cadeias de Markov que busca identificar estatisticamente porções que se comportem de maneira estacionária. Ele avalia por meio de teste estatístico Z caso duas porções da cadeia diferem estatisticamente ou não. Quanto mais próximo a 1,0 é a razão fornecida como resposta do diagnóstico, mais próximo ao estado estacionário estas porções da cadeia de Markov se apresentam entre si.

Para se observar o comportamento das Cadeias de Markov do presente modelo, dispôs-se em gráfico de linhas os resultados de cada iteração em relação ao número de iterações, partindo de 0 a 50.000 iterações. Cada modelo foi representado por uma cor diferente a fim de se observar a variação entre eles (Figura 14). É importante ressaltar que neste momento utilizou-se de limites tanto na função *fmincon* do Matlab® quanto do algoritmo de MCMC para acelerar

a convergência de valores. Observando-se a equação de Monod para o consumo de substratos, nota-se que os parâmetros de velocidade máxima de consumo e constante de meia saturação são inversamente proporcionais. Além disso, nas primeiras simulações (não apresentadas), os valores de um parâmetro ou de outro tendiam a um valor mínimo ao final das simulações que levavam em média o dobro ou triplo do tempo antes de introduzir-se limites.

Figura 14. Dispersão de linhas das simulações para determinação de parâmetros do modelo Cont-MCMC pelo método Monte Carlo Cadeias de Markov de 5.000 até 50.000 iterações para as bateladas experimentais conduzidas por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019)

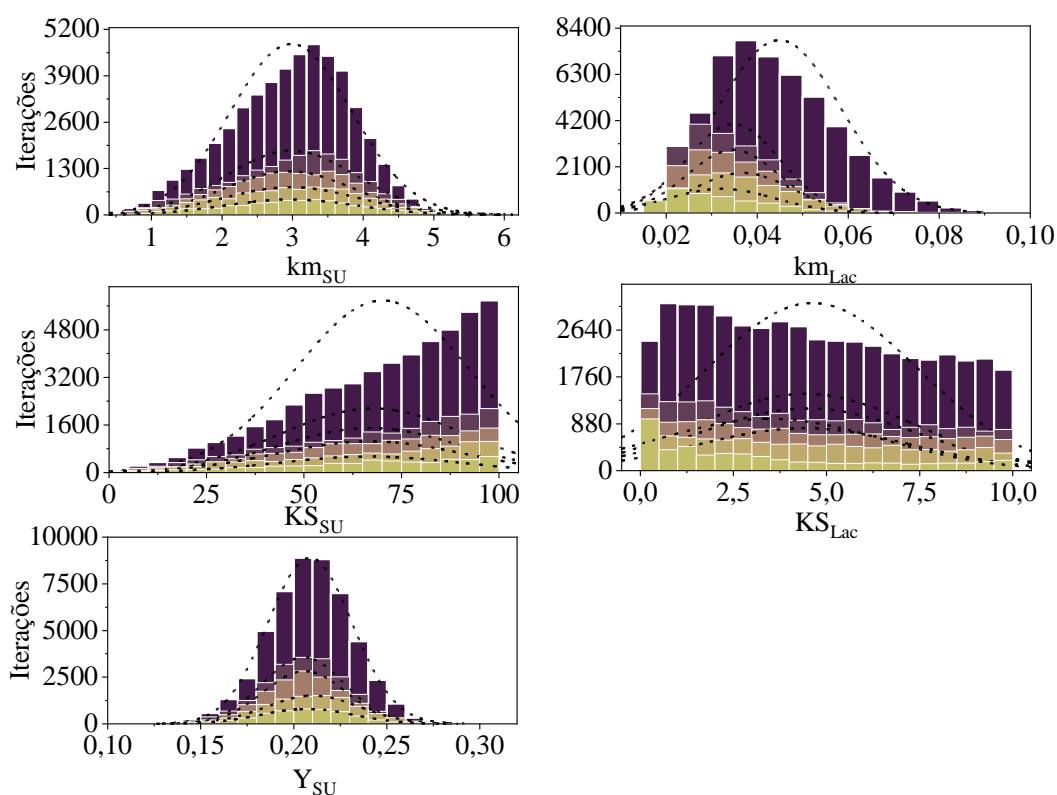


Legenda, nº iterações: — 5.000, — 10.000, — 15.000, — 20.000 e — 50.000.

Na determinação dos parâmetros km_{SU} , KS_{SU} , km_{Lac} e Y_{SU} , os valores simulados acumulam-se em torno de uma linha média, em torno de 3, 90, 0,03 e 0,20, respectivamente. O que traduz muito bem as médias apresentadas na Tabela 11. Porém, para as constantes de meia saturação, pode-se observar que sua dispersão é muito mais proeminente, e, portanto, os parâmetros de maior desvio padrão (Tabela 11). Pode-se observar o efeito das escolhas dos limites de valores para a determinação de parâmetros principalmente para as constantes de meia saturação do consumo de substratos KS_{SU} e KS_{Lac} para balizar as inclusões de valores nas Cadeias de Markov entre os valores 100 e 10 gDQO L⁻¹, respectivamente.

Em relação à compreensão dos valores atribuídos aos parâmetros pelo diagnóstico de Geweke, seu comportamento pode ser melhor observado na forma gráfica de histogramas (Figura 15).

Figura 15. Histogramas da distribuição dos valores de acordo com o número de iterações do modelo Cont-MCMC realizado para determinação de parâmetros cinéticos pelas simulações de Monte Carlo Cadeias de Markov das operações em bateladas conduzidas por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019)



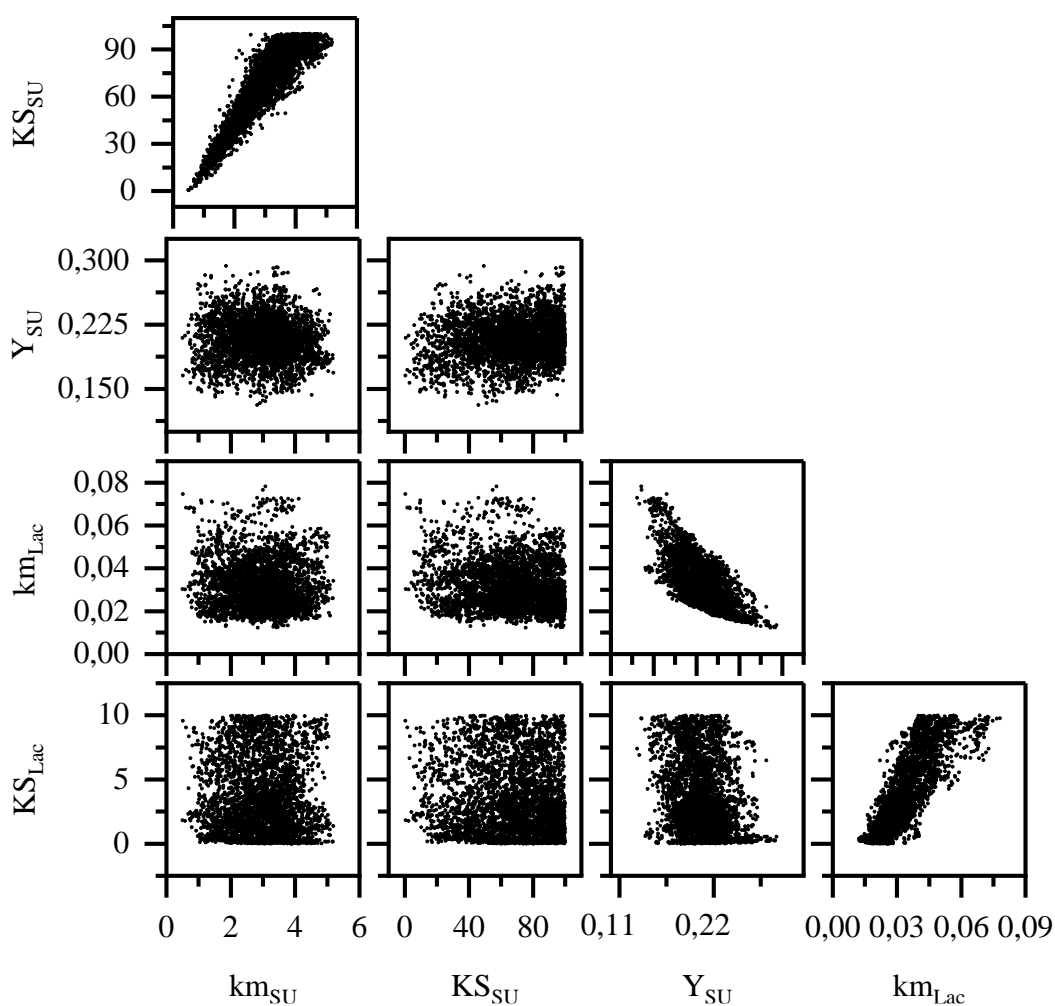
Legenda, nº iterações: 5.000, 10.000, 15.000, 20.000 e 50.000.

Para os parâmetros km_{SU} , KS_{SU} e Y_{SU} , que apresentaram valores de Geweke acima de 0,95, observa-se curvas de distribuição mais aproximam à normal. Já para a constante km_{Lac} com valor mais baixo, de 0,69, este parâmetro determinado já tem uma distribuição estatística de assimetria negativa. No entanto, para a constante de meia saturação do lactato, com valor de Geweke de 0,33, aproximadamente, a curva é bastante diferente de uma distribuição normal (Tabela 11 e Figura 15). É importante salientar que o diagnóstico de Geweke envolve a comparação entre porções das Cadeias de Markov, normalmente descartando as primeiras porções, até a estabilização da cadeia. Por definição, os valores incluídos nas Cadeias de Markov são testados para assumir distribuição estatística normal, portanto, quanto maior o valor de Geweke, mais próximo a uma distribuição normal a representação de densidade estatística dos parâmetros estimados estará. Porém, não existe o valor ideal para Geweke, uma vez que ele apenas indica essa convergência de dados, cabe ao modelador decidir se os valores estimados estão condizentes ou não (SAHLIN, 2011).

Com o aumento do valor de Geweke, de 0,32 para 0,63 aproximadamente, esperava-se que as curvas de distribuição se aproximassem de uma distribuição normal, como ocorrido com o parâmetro km_{Lac} . No entanto, este padrão não é observado na Figura 15, todavia, alguns apontamentos podem ser feitos em relação a essa comparação. Com o aumento do número de iterações, o valor médio do parâmetro estimado variou, mas seu desvio padrão se manteve em $2,89 \text{ gCOD L}^{-1}$, aproximadamente. Porém o período de simulação, aumentou de 6 h para cerca de 52 h, mostrando que talvez, não valha a pena despende tanto tempo de simulação para a determinação de uma variável, caso o valor dela não implique em diferenças significativas nos resultados finais de simulação, ao se comparar o modelo matemático com os valores experimentais.

De modo a investigar as questões relacionadas à determinação de variáveis pelo método MCMC, decidiu-se relacionar os parâmetros determinados em função de seus histogramas, agregando-os em gráficos de correlação (Figura 16).

Figura 16. Resultado das correlações entre as distribuições das médias dos valores determinados para as variáveis livres do modelo Cont-MCMC-5k



Pode-se observar na Figura 16 que os pares de parâmetros km_{SU} e KS_{SU} , km_{Lac} e KS_{Lac} apresentam valores que aumentam e diminuem simultaneamente. Seus pontos se concentram ao redor de uma reta de maneira que se pode inferir uma forte correlação positiva entre estes parâmetros. Já km_{Lac} e Y_{SU} também apresentam distribuição de seus valores seguindo forte tendência linear entre si, porém negativa. Ou seja, à medida que os valores de km_{Lac} diminuem, os de Y_{SU} aumentam. Para verificar o grau de correlação entre os parâmetros e mesmo se há correlação entre os outros parâmetros não citados, elaborou-se a seguinte composição de valores de correlação para todos os valores de iteração utilizados no modelo Cont-MCMC (Tabela 12).

Tabela 12. Resultado do teste de análise de correlação para os parâmetros determinados pelo método de Monte Carlo Cadeias de Markov em com diferentes números de iterações para o modelo Cont-MCMC

5.000	kms_{SU}	KS_{SU}	Y_{SU}	km_{Lac}	KS_{Lac}
kms_{SU}	1,0000				
KS_{SU}	0,9049	1,0000			
Y_{SU}	-0,0671	0,1344	1,0000		
km_{Lac}	-0,0536	-0,1939	-0,6841	1,0000	
KS_{Lac}	-0,0499	-0,0983	-0,2667	0,8413	1,0000
10.000	kms_{SU}	KS_{SU}	Y_{SU}	km_{Lac}	KS_{Lac}
kms_{SU}	1,0000				
KS_{SU}	0,8958	1,0000			
Y_{SU}	-0,1444	0,1005	1,0000		
km_{Lac}	-0,0469	-0,1914	-0,5871	1,0000	
KS_{Lac}	-0,1057	-0,1041	-0,0277	0,7877	1,0000
15.000	kms_{SU}	KS_{SU}	Y_{SU}	km_{Lac}	KS_{Lac}
kms_{SU}	1,0000				
KS_{SU}	0,8950	1,0000			
Y_{SU}	-0,1684	0,0831	1,0000		
km_{Lac}	0,0564	-0,1008	-0,5974	1,0000	
KS_{Lac}	0,0063	-0,0186	-0,0853	0,8143	1,000
20.000	kms_{SU}	KS_{SU}	Y_{SU}	km_{Lac}	KS_{Lac}
kms_{SU}	1,0000				
KS_{SU}	0,9045	1,0000			
Y_{SU}	-0,2077	0,0264	1,0000		
km_{Lac}	0,0885	-0,0627	-0,6171	1,0000	
KS_{Lac}	0,0072	-0,0098	-0,0741	0,7893	1,0000
50.000	kms_{SU}	KS_{SU}	Y_{SU}	km_{Lac}	KS_{Lac}
kms_{SU}	1,0000				
KS_{SU}	0,8923	1,0000			
Y_{SU}	-0,2399	0,0155	1,0000		
km_{Lac}	0,1269	-0,0281	-0,6638	1,0000	
KS_{Lac}	0,0368	0,0068	-0,1387	0,7815	1,0000

Fonte: o autor.

Os resultados de correlação confirmam que as variáveis da fermentação de açúcares kms_{SU} e KS_{SU} apresentam forte correlação positiva, com base nos valores obtidos para todos os 4 modelos com números diferentes de iterações. O mesmo pode ser dito para os parâmetros da fermentação do lactato, km_{Lac} e KS_{Lac} . Porém, para a relação entre Y_{SU} e km_{Lac} a correlação é negativa e fraca. Para as relações das demais variáveis, não puderam ser observados padrões de

correlação (Tabela 12). Analisou-se o desempenho dos modelos comparando-se o RMSE de cada simulação (Tabela 13).

Tabela 13. Resultado da RMSE das simulações do modelo Cont-MCMC com número de iterações variando de 5.000 a 50.000 das variáveis determinadas por MCMC

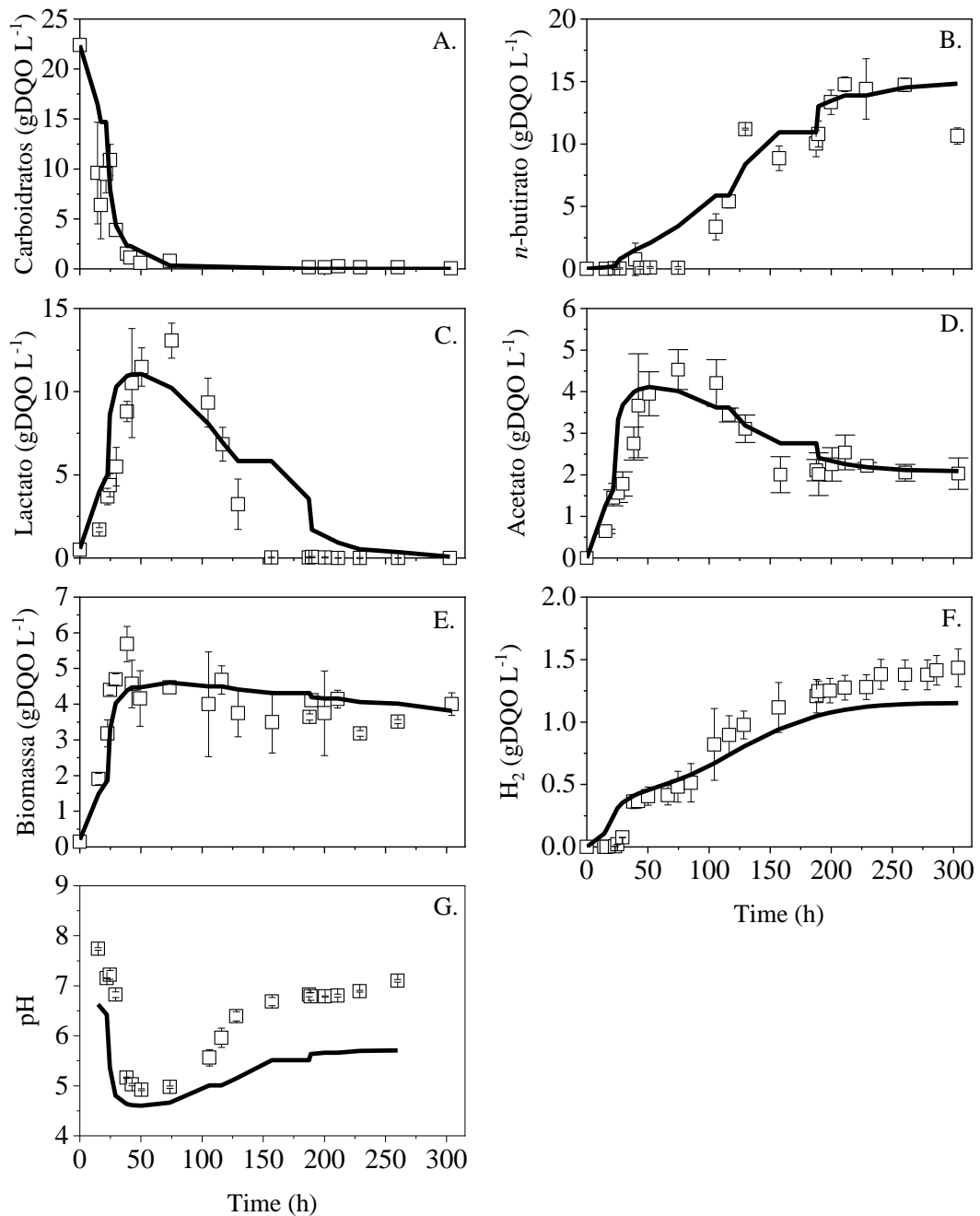
Variável	Unidade	50.000	20.000	15.000	10.000	5.000
Carboidratos	(gDQO L ⁻¹)	3,2252	3,1459	3,1560	3,0467	3,0687
Lactato	(gDQO L ⁻¹)	2,1721	3,2107	3,2100	2,6746	2,2515
H₂	(gDQO L ⁻¹)	0,1735	0,2254	0,2261	0,2011	0,1863
<i>n</i>-butirato	(gDQO L ⁻¹)	1,7748	1,9811	1,9852	1,6880	1,8288
Acetato	(gDQO L ⁻¹)	0,7170	0,8297	0,8275	0,7909	0,7528
Biomassa	(gDQO L ⁻¹)	0,7118	0,6933	0,6950	0,6738	0,6654
pH		1,1660	1,2537	1,2523	1,1767	1,0534

Fonte: o autor.

A Tabela 15 resume os erros RMSE observados nas simulações. Pode-se notar que com o aumento do número de iterações de 5.000 a 20.000 o valor de RMSE tendeu a aumentar. No entanto, ao se realizar a determinação de parâmetros com 50.000 iterações, o valor de RMSE tornou a baixar, ficando próximo ao valor encontrado para os resultados de 10.000 iterações. Ao se observar os valores na Tabela 15, tem-se como principais componentes responsáveis pelo aumento do RMSE carboidratos, lactato e *n*-butirato.

Apesar de o modelo Cont-MCMC simulado a partir de 50.000 iterações ter apresentado valores maiores para o diagnóstico de Geweke, bem como menores erros de Monte Carlo, frente aos outros números de iterações. Há de se levar em conta o tempo de simulação para obtenção destes resultados e o erro final atribuído a cada variação no número de iterações. Em relação a RMSE, a diferença entre o modelo com 50.000 iterações e o de 5.000 é baixa, porém o tempo de simulação é 10 vezes maior, passando de 45 hde diferença. Portanto, devido ao tempo de simulação e variação de RMSE, o modelo Cont-MCMC de 5.000 iterações será escolhido para representar os modelos desta sessão (Figura 17).

Figura 17. Comparativo de resultados experimentais (\square), com suas respectivas barras de erro, e o modelo Cont-MCMC 5.000 iterações (—)



Fonte: adaptado de Branco, Oliveira e Zaiat (2019).

Visualmente, a curva de carboidratos parece fornecer ótimo ajuste aos dados experimentais, porém os erros obtidos na mensuração destes valores em laboratório também se mostraram altos, implicando em grandes valores para desvio padrão. Isto afetou diretamente o comportamento do modelo frente aos carboidratos, que foi consumido até em torno de 75 h por este modelo (Figura 17 A). Junto ao consumo de carboidratos, observa-se a síntese de outros

metabólitos, o acetato e lactato, junto à liberação de H_2 graças a fermentação heterolática e acetogênese, bem como o crescimento celular (Figura 17 C, D, E e F). Devido ao aumento da concentração de ácidos orgânicos no meio, resultado da fermentação, observa-se a queda brusca do pH do meio do entorno de 7 até 4,5 (Figura 17 G).

Em relação ao *n*-butirato, observa-se que houve uma formação precoce deste metabólito no meio, mostrando valores expressivos de síntese a partir de 25 h. Em seguida a curva de simulação do *n*-butirato mostrou crescimento até concentrações próximas de 15 gDQO L^{-1} no tempo final de simulação, em torno de 300 h (Figura 17 B). A síntese precoce deste metabólito implicou no consumo antecipado de acetato e lactato, impedindo que ambos acetato e lactato atingissem a concentração máxima obtida experimentalmente (Figura 17 C e D). Além destes dois metabólitos terem sua concentração máxima limitada, na segunda etapa fermentativa, que ocorre a partir da depleção de carboidratos em cerca de 75 h, observa-se o lento consumo destes metabólitos, atrasando em 150 h o consumo total de lactato do sistema (Figura 17 C).

A curva de simulação referente à biomassa foi incapaz de atingir os valores experimentais máximos, mostrando, assim como Blanco, Oliveira e Zaiat (2019), uma deficiência do modelo em relação à simulação de biomassa. Ao contrário dos autores, não se adotou valores da literatura para compor as simulações de biomassa, buscou-se estimá-los por meio do método do MCMC. Tanto k_{MSU} quanto Y_{SU} , são diretamente proporcionais ao crescimento de biomassa pela cinética de Monod, sendo, além disso, linearmente dependentes. Portanto, mesmo ao se obter valores maiores para Y_{SU} , k_{MSU} teve obrigatoriamente de assumir valores menores. Inferiores até mesmo aos valores estimados por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019). Por isso ambos modelos apresentaram comportamentos semelhantes quanto ao crescimento de biomassa.

Em relação à representação de H_2 , o modelo Cont-MCMC 5.000 iterações mostrou-se bastante adequado. No entanto, a síntese de H_2 foi antecipada, como se observou para o *n*-butirato. Este modelo não permite a visualização da formação de H_2 em patamares, como observado por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019), ele mostra apenas um crescimento contínuo a partir de 25 h até o final das 300 h de simulação (Figura 17 F).

Por fim, o pH não foi bem representado por este modelo, a não ser pela parte inicial até 50 h, na qual há a acidificação do meio graças as concentrações de acetato e lactato. A partir deste momento, o lento consumo de acetato e lactato não foi capaz de conferir alcalinização ao meio (Figura 17 G).

5.1.4 Modificação do ADM1 na plataforma MATLAB® para inclusão de inibição e determinação de parâmetros por simulações de Monte Carlo associado às Cadeias de Markov – modelo X_INIB

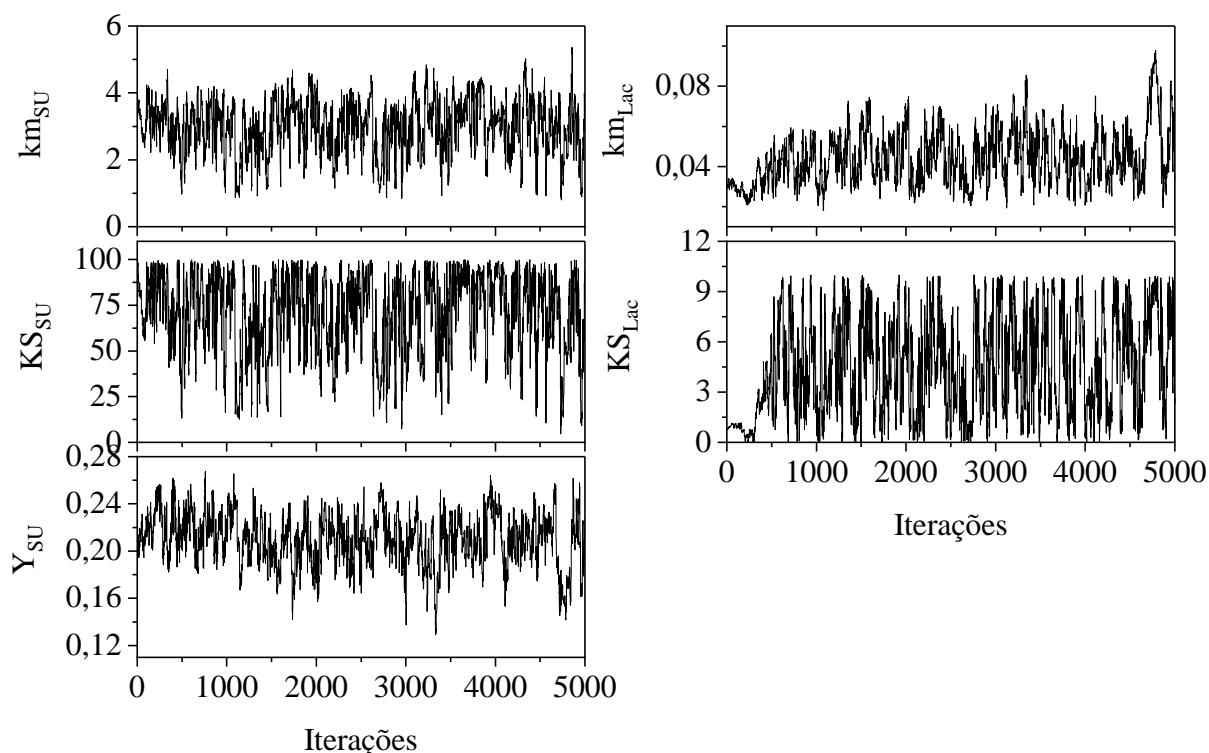
A fim de verificar a relação dos carboidratos sobre organismos fermentadores de acetato e lactato, decidiu-se adequar o modelo para incorporar os efeitos de inibição competitiva por substrato. Assim, introduziu-se a equação de inibição pela concentração de carboidratos à equação da taxa de consumo de lactato, representado pela Eq. 42, na tentativa de minimizar a questão do adiantamento da síntese do metabólito *n*-butirato. Optou-se por realizar a determinação de parâmetros pelo método MCMC junto à alteração do modelo considerando inibição.

Utilizou-se neste modelo 5.000 iterações para a tentativa de estimar os parâmetros livres. O tempo total de simulação aumentou em relação ao modelo Cont-MCMC 5k em aproximadamente 2 h, levando este modelo ao tempo total de 7 h de simulação. Ao término das simulações, obteve-se o resumo da determinação de parâmetros por MCMC (Tabela 14), a dispersão em linha dos valores contidos nas Cadeias de Markov (Figura 20), da distribuição das frequências dos intervalos destes valores (Figura 18) e correlação entre os parâmetros (Figura 19).

Tabela 14. Parâmetros determinados pelo método de Monte Carlo Cadeias de Markov, para o modelo com inibição

Parâmetro	Média	Desvio padrão	Erro Monte Carlo	Tau	Geweke
k_{msu}	2,9547	0,8202	0,0523	33,37	0,9409
K_{Ssu}	71,4100	21,5350	1,3764	28,94	0,9385
Y_{Su}	0,2084	0,0210	0,0014	35,80	0,9905
k_{mLac}	0,0391	0,0116	0,0011	62,90	0,5825
K_{SLac}	4,1532	2,8263	0,2775	71,19	0,0704

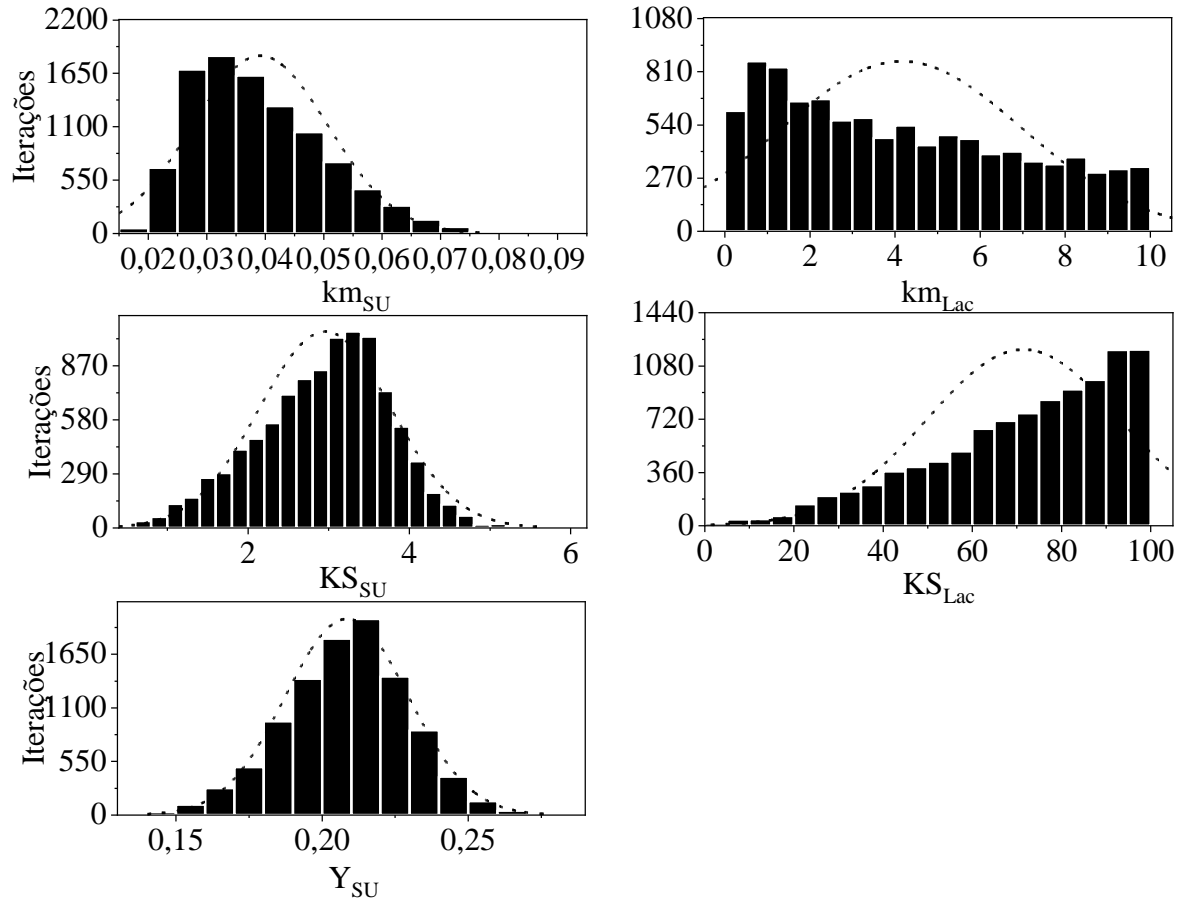
Figura 18. Resultados das dispersões em linha dos valores aceitos para compor as Cadeias de Markov com 5.000 iterações das simulações do modelo X_Inib



A apresentação dos valores aceitos para compor as Cadeias de Markov no formato de dispersão em linhas permite uma análise visual sobre a convergência destas Cadeias. Busca-se pequenas dispersões ao redor da média (Tabela 14). Em alguns gráficos esta tarefa torna-se fácil de ser observada como para km_{SU} e Y_{SU} (Figura 18). Sahlin (2011) adverte que apesar de este ser um artifício de análise das Cadeias de Markov, deve-se utilizar de métodos diagnósticos como o de Geweke para análise de convergência.

De acordo com as Figura 13 e 17, pode-se dizer que a inclusão da cinética de inibição neste modelo não modificou sua dependência ao uso de limites para a determinação dos parâmetros KS_{SU} e KS_{Lac} . E para os demais parâmetros foram atribuídos valores perto do ótimo segundo diagnóstico de Geweke. A fim de se verificar como se comportaram as distribuições das frequências destes valores comparados à Normal, elaborou-se os gráficos de histogramas das Cadeias de Markov (Figura 19).

Figura 19. Distribuição das frequências dos valores que compõem as Cadeias de Markov do modelo considerando inibição por carboidratos, X_{Inib} , para determinação de parâmetros cinéticos pelo método de Monte Carlo Cadeias de Markov com 5.000 iterações



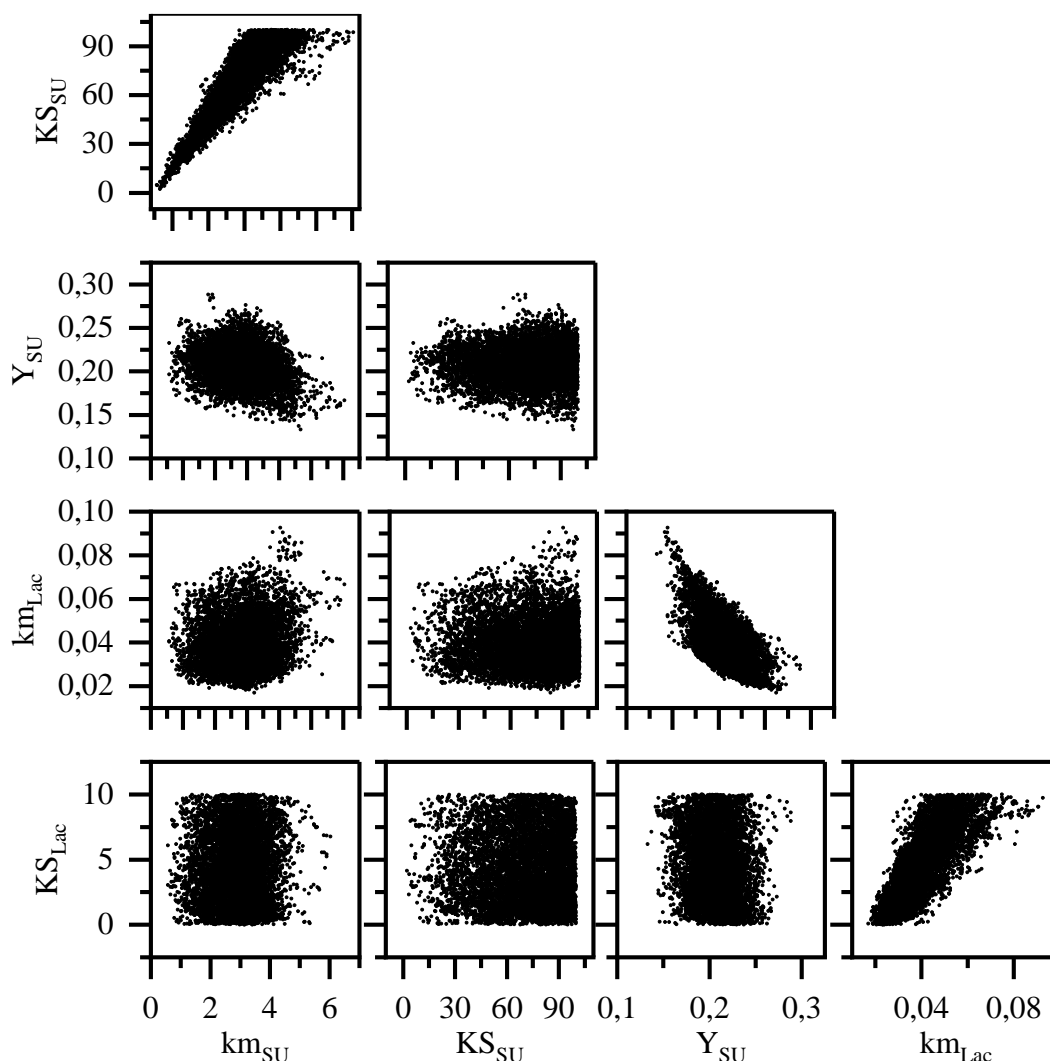
Fonte: o autor.

Ao se observar os histogramas apresentados na Figura 19, pode-se notar que às curvas mais próximas à Normal foram atribuídos melhores valores pelo diagnóstico de Geweke (Tabela 14). Portanto pode-se sugerir que os valores dos parâmetros relacionados ao consumo de açúcar, km_{SU} , KS_{SU} e Y_{SU} estão menos suscetíveis aos erros do método MCMC, como por exemplo o de a Cadeia de Markov não atingir o estado estacionário, logo, convergência (SAHLIN, 2011). As distribuições dos parâmetros KS_{SU} e km_{Lac} permaneceram as mesmas que as dos modelos anteriores. Já em relação à KS_{Lac} , nota-se um forte distanciamento de sua distribuição à uma Normal, explicando os baixos valores atribuídos pelo diagnóstico de Geweke para a convergência da Cadeia de Markov para este parâmetro.

Um dos fatores que podem impactar a atribuição de baixos valores de Geweke para parâmetros determinados é a ocorrência de alta correlação entre ambos. Portanto, da mesma

forma como realizou-se na sessão anterior, elaborou-se os gráficos de correlação entre os parâmetros determinados no modelo X_Inib (Figura 20).

Figura 20. Resultado das correlações entre as distribuições das médias dos valores determinados para as variáveis livres do modelo X_Inib



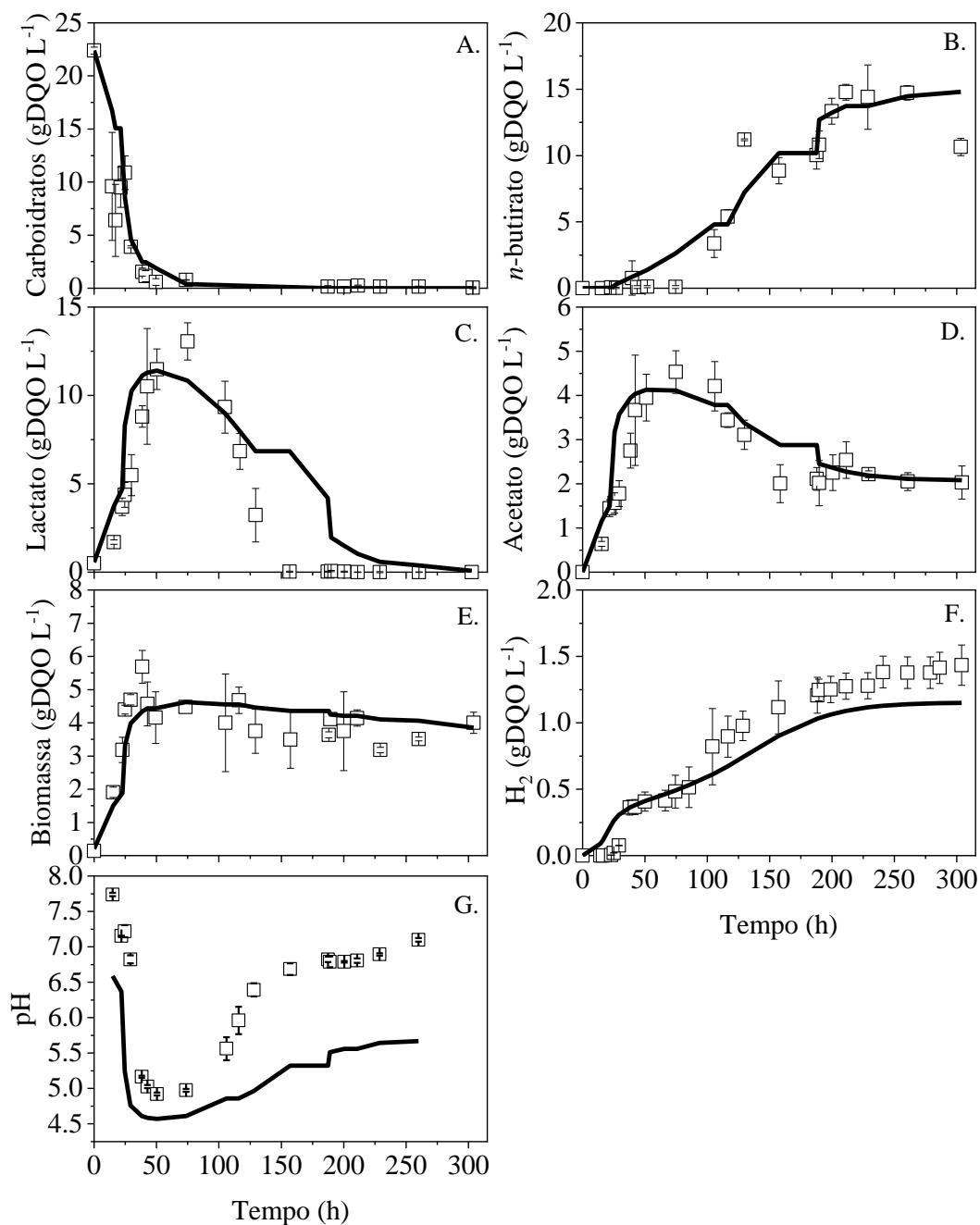
De acordo com a Figura 20, há indícios de que alguns parâmetros determinados pelo método de MCMC apresentem correlação. Primeiramente km_{SU} e KS_{SU} , apresentam uma tendência crescente entre si, semelhante ao padrão encontrado entre o par km_{Lac} e KS_{Lac} , indicando que possa haver forte correlação positiva entre si. Já os pares de parâmetros Y_{SU} e km_{Lac} , apresentam correlação inversa, mas pelo formato da distribuição dos valores médios será necessário determinar a correlação entre ambos. Para estes e demais parâmetros, calculou-se a correlação (Tabela 15).

Tabela 15. Resultado do teste de análise de correlação para os modelos controle modificados para simulação MCMC.

X_Inib	kms_{SU}	KS_{SU}	Y_{SU}	km_{Lac}	KS_{Lac}
kms_{SU}	1,0000				
KS_{SU}	0,8942	1,0000			
Y_{SU}	-0,0394	0,1935	1,0000		
km_{Lac}	-0,0637	-0,1949	-0,6901	1,0000	
KS_{Lac}	-0,0602	-0,0884	-0,2030	0,8104	1,0000

Como se acreditava, os pares de parâmetros km_{SU} e KS_{SU} , e km_{Lac} e KS_{Lac} , indicaram forte correlação entre si, nos valores de 0,8942 e 0,8104, respectivamente. O outro par de parâmetros Y_{SU} e km_{Lac} mostrou média correlação inversa entre si, no valor de 0,6901. Os demais pares de parâmetros apresentaram baixa correlação entre si (Tabela 15). Aparentemente, a inclusão da inibição para ocorrência do consumo de acetato e lactato não influenciou na correlação já estabelecida entre estes parâmetros, como observou-se no modelo anterior Cont-MCMC. A fim de se observar o comportamento ao longo do tempo de simulação do modelo X_Inib, a Figura 21 mostra o comparativo entre os dados experimentais e os obtidos por simulação por este modelo.

Figura 21. Comparativo de resultados experimentais (\square), com suas respectivas barras de erro, e do modelo X_Inib considerando inibição competitiva (—)



5.1.5 Modificação do ADM1 na plataforma MATLAB® para determinação de parâmetros por simulações de Monte Carlo associado às Cadeias de Markov considerando dois eventos e inibição, X_2-Ferm

Visto que a determinação dos parâmetros cinéticos das constantes de meia saturação por MCMC nos modelos anteriores, apresentaram baixos valores de Geweke, além do

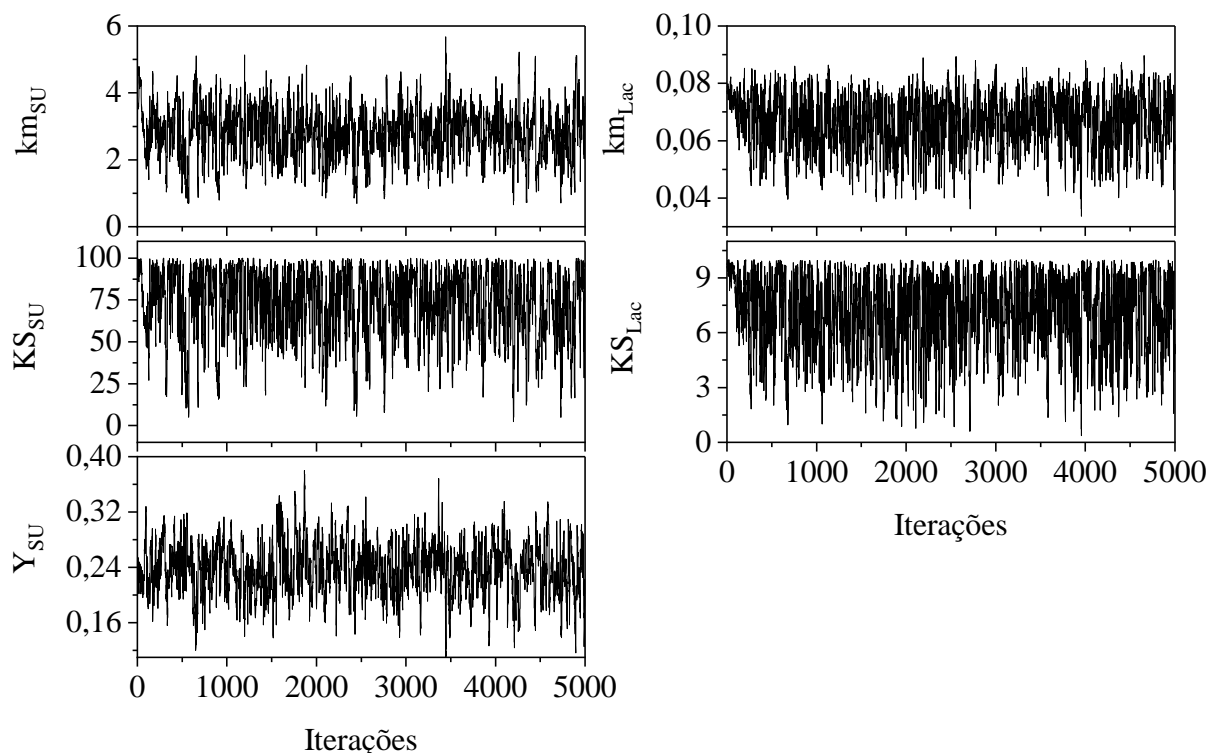
distanciamento dos histogramas de distribuições normais, e para outros parâmetros, os valores de desvios padrão apresentaram-se elevados, optou-se pela divisão do modelo em dois eventos para observar a influência da determinação dos parâmetros, ou seja, como se fosse duas bateladas. Em um primeiro modelo seriam estimadas as reações de consumo de açúcar e formação de acetato, lactato e H_2 . Este modelo teria suas simulações finalizadas nos momentos de pico de formação de acetato e lactato, entre 50 e 75 h. Os valores finais obtidos nesta “primeira batelada” seriam considerados como valores iniciais da “segunda batelada”, na qual as simulações compreenderiam o consumo de acetato e lactato na formação de *n*-butirato e H_2 . Considerou-se cada batelada como um evento, sendo assim, no primeiro evento foram determinados os parâmetros k_{msu} , KS_{su} e Y_{su} , e portanto, no segundo evento km_{Lac} e KS_{Lac} .

A Figura 22 mostra a dispersão dos valores aceitos para fazer parte da Cadeia de Markov, e em seguida, na Tabela 16, dispõe-se os valores dos parâmetros determinados pelo modelo de dois eventos com inibição por 5.000 iterações.

Tabela 16. Parâmetros determinados pelo método de Monte Carlo Cadeias de Markov com 5.000 iterações, para o modelo dividido em dois eventos

Parâmetro	Média	Desvio padrão	Erro Monte Carlo	Tau	Geweke
k_{msu}	2,8047	0,7968	0,03	14,88	0,9261
KS_{su}	72,2440	21,1870	0,78	14,90	0,9084
Y_{su}	0,2382	0,0380	0,00	14,92	0,9639
km_{Lac}	0,0665	0,0099	0,00	8,61	0,9560
KS_{Lac}	7,0541	2,1048	0,09	8,27	0,8980

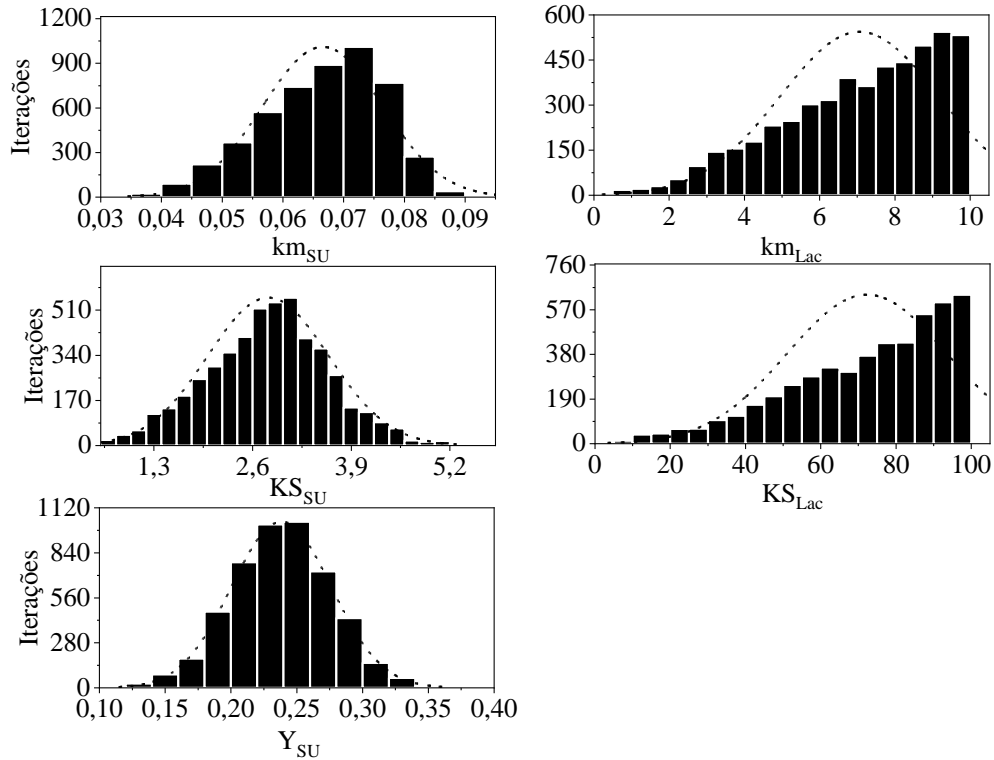
Figura 22. Resultados das dispersões em linha dos valores aceitos para compor as Cadeias de Markov com 5.000 iterações das simulações do modelo X₂-Ferm



A apresentação da dispersão dos valores determinados pelo método MCMC no formato de dispersão junto (Figura 22) aos dados determinados com seus indicadores estatísticos (Tabela 16) contendo os valores médios destes parâmetros, considerando uma distribuição Normal, permite que se observe a distribuição dos valores nas Cadeias de Markov em torno do valor médio. Para os parâmetros km_{SU} , km_{Lac} e Y_{SU} , a baixa dispersão dos valores ao redor da média é mais evidente que para os parâmetros das constantes de meia saturação KS_{SU} e KS_{Lac} . Além disso, mais uma vez se observa a necessidade de se estabelecer limites para determinação de KS_{SU} e KS_{Lac} , de 0 a 100 e de 0 a 10, respectivamente.

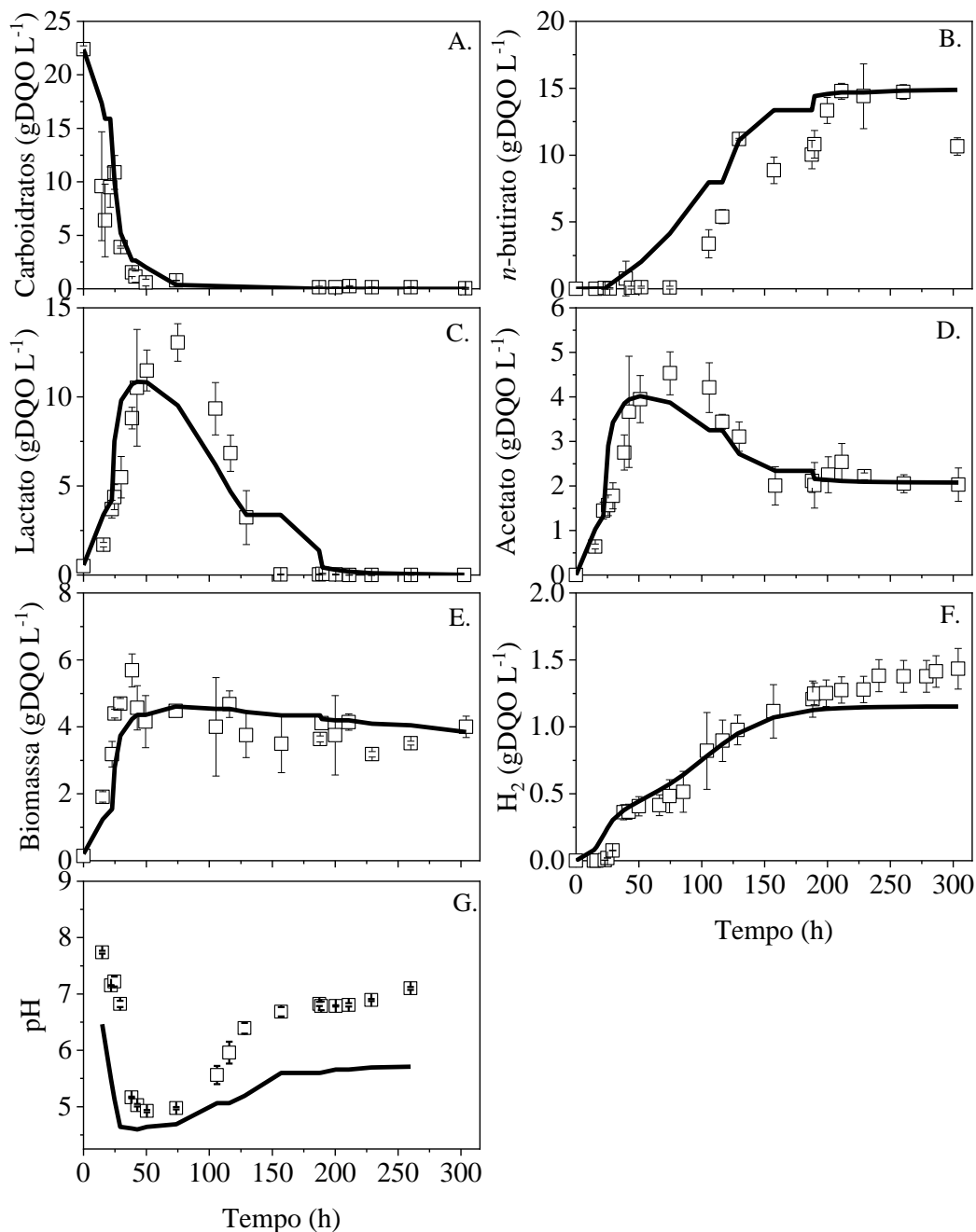
A Tabela 16 exibe valores mais promissores no quesito de convergência das Cadeias de Markov. Nela pode-se observar que os valores atribuídos pelo diagnóstico de Geweke para os parâmetros relacionados ao consumo de lactato mostraram-se mais próximos a 1,0, valor ótimo. Isso indica que houve convergência nas Cadeias de Markov destes parâmetros. Portanto, como o diagnóstico de Geweke se baseia em testes do tipo Z entre porções das Cadeias de Markov que se comportam de forma estacionária, espera-se obter distribuições próximas à Normal para todos os parâmetros. Isto poderá ser observado nos histogramas referentes a frequência de distribuição de cada parâmetro (Figura 23).

Figura 23. Histogramas do modelo X₂-Ferm considerando dois eventos fermentativos para determinação de parâmetros cinéticos pelo método Monte Carlo Cadeias de Markov com 10.000 iterações



Os histogramas referentes aos parâmetros da fermentação do açúcar mais uma vez apresentaram distribuição próximas à Normal. Já os parâmetros da fermentação do lactato, o KS_{Lac} , na verdade, apresentou uma distribuição completamente diferente desta vez. Seu histograma representa uma assimetria negativa, assim como KS_{SU} , o que pode ter fortalecido ainda mais sua correlação com km_{Lac} , porém não faz sentido realizar outra análise de correlação, sendo que esta já foi verificada anteriormente. Seguiu-se com a simulação do modelo com as médias dos parâmetros obtidos (Figura 24).

Figura 24. Comparativo de resultados experimentais (\square), com suas respectivas barras de erro, e do modelo dividido em dois eventos X_2-Ferm (\blacksquare) após a determinação dos parâmetros livres por MCMC



Fonte: adaptado de Branco, Oliveira e Zaiat (2019).

O presente modelo apresenta curva de consumo de carboidrato mais estendida, apresentando leve afastamento dos dados experimentais de concentração mais baixa de carboidratos. Um atraso de até 25 h em relação aos modelos anteriores pode ser verificado, fator que pode ter impactado em maiores erros (Figura 24 A). A determinação de parâmetros k_{mSU} e Y_{SU} maiores que nos modelos anteriores propiciou um melhor ajuste dos metabólitos

secundários até cerca de 50 h de simulação (Figura 24 C e D). Neste momento, a síntese de *n*-butirato torna-se mais evidente, bem como a de H₂, a qual apresentou comportamento bastante similar aos modelos anteriores (Figura 24 F). No entanto, ao contrário do modelo X_Inib, desta vez o algoritmo de MCMC deu preferência a relativizar o erro entre os metabólitos acetato, lactato e *n*-butirato. Adiantando o consumo de acetato e lactato, e, portanto, antecipando a síntese de *n*-butirato até cerca de 200 h, onde a curva de dados simulados passa a interceptar os dados experimentais novamente (Figura 24 B, C e D).

O comportamento anômalo observado nas curvas de acetato e lactato dos modelos anteriores sofreu uma antecipação neste modelo de cerca de 25 h (Figura 24 C e D), momento no qual ambos metabólitos já apresentavam baixa concentração no meio. Observou-se que a divisão do modelo em dois eventos fermentativos propiciou consumos mais rápidos de acetato e lactato, e não rendeu níveis maiores de pH ao meio, apenas antecipou a leve alcalinização observada nos modelos anteriores em cerca de 25 h (Figura 24 G).

Mesmo que a este modelo tenha sido atribuído maior média para o parâmetro Y_{SU} em relação aos modelos anteriores (Tabela 16), o modelo não foi capaz de atingir o pico de concentração de microrganismos fermentadores obtidos experimentalmente. No entanto, acredita-se que esse valor não será atingido, pois o valor de pico de concentração de biomassa assume um valor que destoia da tendência de morte celular após a fase de crescimento logarítmico de microrganismos. Além disso, observa-se valores de erro bastante grandes para esse componente, limitando a real interpretação do ocorrido durante as bateladas experimentais (Figura 24 E).

5.2 Modelos considerando biomassa alongadora de cadeia

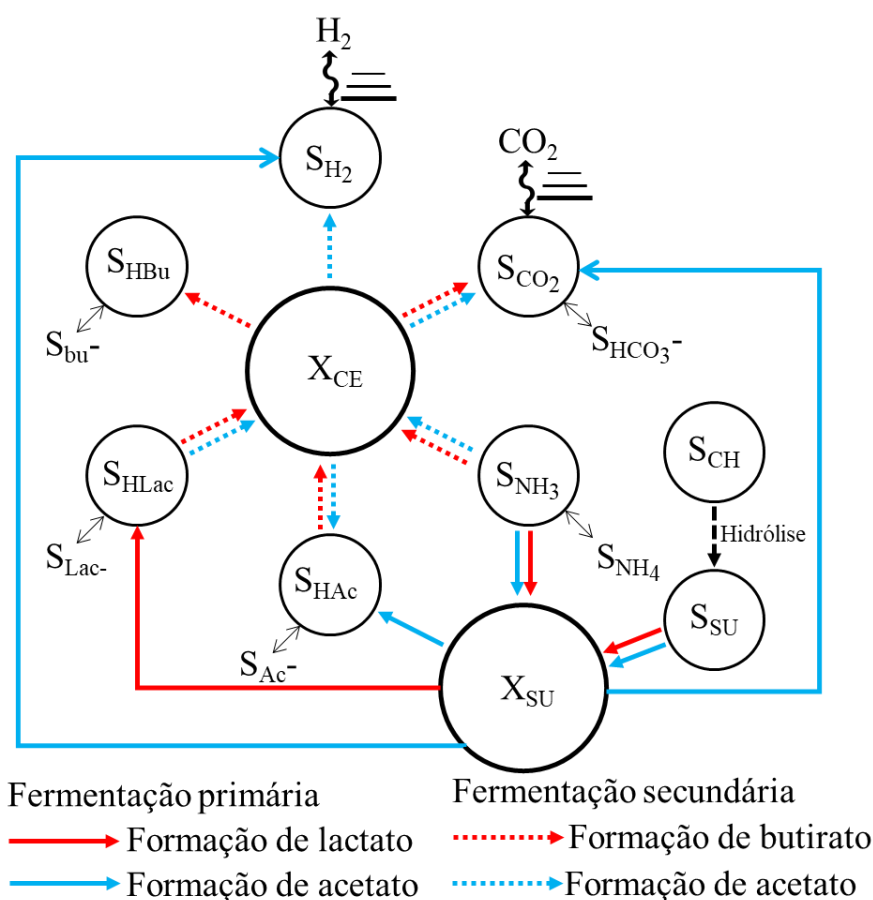
O seguinte modelo busca representar as mesmas duas etapas fermentativas observadas nos modelos anteriores, porém com o acréscimo da hidrólise de lactose (Figura 25, seta tracejada). A fermentação primária que considera o consumo de açúcar seguido de síntese dos metabólitos secundários acetato, lactato e H_2 , intermediados pela biomassa fermentadora de açúcares, a qual se beneficia de parte dessa matéria orgânica para realizar crescimento celular (Figura 25, setas contínuas).

A fermentação secundária seria iniciada quando a concentração de açúcares no meio fosse reduzida, permitindo que os microrganismos fermentadores secundários (os alongadores de cadeia, X_{CE}) atuem realizando a síntese de *n*-butirato e H_2 a partir da combinação de acetato (acceptor de elétrons) e lactato (doador de elétrons). Diferentemente dos primeiros modelos, esta etapa fermentativa leva em conta o crescimento celular dos microrganismos X_{CE} (Figura 25, setas pontilhadas). Em ambas etapas fermentativas considerou-se: a formação de gás carbônico devido à fermentação e consumo de amônia para crescimento celular, a transferência de gases entre as fases líquida e gasosa (Figura 25, setas onduladas), bem como, para o balanço de pH, as espécies químicas ionizadas dos principais metabólitos (Figura 24, setas duas pontas).

Pode-se observar na Figura 25 que este modelo é um pouco mais complexo que o anterior, devido à consideração da etapa de hidrólise de lactose e o acréscimo de uma biomassa que atua de forma independente das fermentadoras primárias. Neste momento, podem ser verificadas a influência da concentração inicial de cada biomassa, e dos efeitos da transferência de massa entre fases na determinação de parâmetros e na comparação dos valores simulados com os dados experimentais.

Para a representação dos processos esquematizados no modelo conceitual, desenvolveu-se a matriz de Peterson. Nesta os processos são dispostos em linhas, enquanto que cada coluna representa os componentes participantes dos processos, de acordo com seus coeficientes de rendimentos de produto sobre substrato e de rendimento celular (Tabela 19). Na extremidade direita da matriz estão dispostas as equações de taxas de reação referentes ao processo (Eq. 41-46). Estas deverão ser inclusas no modelo matemático que representará o procedimento realizado em laboratório (Tabela 9). Para efeito de simplificação, apenas os processos verificados nas bateladas realizadas em laboratório foram incluídos nas tabelas.

Figura 25. Modelo conceitual para acidogênese de lactose pela biomassa X_{SU} e fermentação secundária de lactato, alongamento de cadeia de acetato à *n*-butirato, pela biomassa X_{CE}



Fonte: autor.

A partir dos dados experimentais, os coeficientes estequiométricos dos metabólitos foram substituídos nos respectivos processos para verificação dos balanços de massa para carbono e matéria orgânica medida em DQO. É importante ressaltar que ao se considerar a lactose como principal constituinte do soro de leite (cerca de 76%), e por não haver análises de composição proteica das bateladas, o balanço de compostos nitrogenados foi desconsiderado (Tabela 17). Porém, devido a importância das espécies amônia e amoníaco no balanço de pH, adotou-se um valor inicial para o íon amônio com base na literatura (Tabela 6), e esta foi incluída apenas no modelo modificado do ADM1. Por fim, feitas as considerações desenvolveu-se a matriz de balanço de matéria orgânica medida em DQO e de balanço de carbono (Tabela 28).

Tabela 17. Matriz de Peterson simplificando os processos e componentes envolvidos no processo fermentativo considerando duas biomassas independentes do atual modelo estudado

Componente →	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	ρ_j [kg DQO m ⁻³ d ⁻¹]
j Processo ↓	S _{SU}	S _{AC}	S _{LAC}	S _{BU}	S _{H2}	S _{IC}	S _{IN}	X _{CH}	X _{SU}	X _{CE}	
1 Hidrólise da lactose	1							-1			$k_{HID,CH} X_{CH}$
2 Consumo de glicose	-1	$(1-S_{su})f_{ac,su}$	$(1-S_{su})f_{lac,su}$		$(1-Y_{su})f_{h2,su}$	$-\sum_{i=1}^n C_i v_{i,1}$	$-(1-Y_{su})N_{bac}$		Y_{su}		$k_{m,su} \frac{S_{su}}{K_s + S_{su}} X_{su} I_1$
3 Consumo de acetato		-1					$-(1-Y_{ac})N_{bac}$				
4 Consumo de lactato		$-f_{ac,lac}$	-1	$(1-Y_{ce})f_{bu,lac}$	$(1-Y_{ce})f_{h2,lac}$	$-\sum_{i=1}^n C_i v_{i,3}$	$-(1-Y_{lac})N_{bac}$			Y_{ce}	$k_{m,lac} \frac{S_{lac}}{K_{s,lac} + S_{lac}} X_{CE} I_2$
5 Consumo de <i>n</i> -butirato				-1			$-(1-Y_{bu})N_{bac}$				
6 Consumo de H ₂					-1		$-(1-Y_{h2})N_{bac}$				
7 Decaimento X _{su}								1	-1		$k_{dec,Xsu} X_{su}$
8 Decaimento X _{ce}								1		-1	$k_{dec,Xce} X_{ce}$
	Açúcares totais [kg DQO m ⁻³]	Acetato total [kg DQO m ⁻³]	Lactato total [kg DQO m ⁻³]	<i>n</i> -butirato total [kg DQO m ⁻³]	Gás de hidrogênio [kg DQO m ⁻³]	Carbono inorgânico [k mol C .m ⁻³]	Nitrogênio inorgânico [kmol N .m ⁻³]	Hidrólise de lactose [kg DQO m ⁻³]	Fermentadoras de açúcar [kg DQO m ⁻³]	Alongadoras de cadeia [kgDQO m ⁻³]	Fatores de inibição: $I_1 = I_{pH} I_{IN,lim}$ $I_2 = I_{pH} I_{IN,lim} I_{comp}$

Fonte: adaptado de Batstone e colaboradores (2002).

Tabela 18. Matriz de Gujer com balanços de carbono e demanda química de oxigênio para os processos explorados no modelo considerando duas biomassas independentes

Componente → i		1	2	3	4	5	6	7	8	9	Balanços	
Processo ↓ j		S_{SU}	S_{AC}	S_{LAC}	S_{BU}	S_{H2}	S_{IC}	S_{CH}	X_{SU}	X_{CE}		
DQO_i	DQO	1	1	1	1	1	0	1	1	1		
C_i	Cont. Carbono	0,0313	0,0313	0,0311	0,0250	0,0000	1,0000	0,0313	0,0305	0,0305		
Componente → i		1	2	3	4	5	6	7	8	9		
j	Processo ↓	S_{SU}	S_{AC}	S_{LAC}	S_{BU}	S_{H2}	S_{IC}	S_{CH}	X_{SU}	X_{CE}	DQO	C
		Hidrólise lactose	1,00					0,00	-1,00			0,00000
1	Consumo lactose	-1,00	0,21	0,57		0,02	0,00		0,21		0,00000	0,00000
2	Consumo <i>n</i> -butirato										0,00000	0,00000
4	Consumo acetato										0,00000	0,00000
5	Consumo hidrogênio										0,00000	0,00000
6	Consumo lactato		-0,39	-1,00	1,23	0,05	0,01			0,11	0,00000	0,00000
7	Decaimento X _{SU}						0,00	1,00	-1,00		0,00000	0,00000
8	Decaimento X _{CE}						0,00	1,00		-1,00	0,00000	0,00000

Fonte: adaptado de Flores-Alsina e colaboradores (2016).

Na matriz de Peterson (Tabela 17) pode-se observar que a primeira linha de processos compreende à hidrólise de lactose. Este processo não depende de biomassa alguma e terá sua taxa de reação $k_{HID,CH}$ determinada pelo método MCMC, uma vez que experimentalmente este valor não pôde ser determinado. O processo de consumo de glicose será intermediado pela biomassa fermentadora primária X_{SU} e sujeito a inibição pela queda de pH a partir do valor de 4,5, da mesma forma que os modelos anteriores e sua taxa de consumo foi calculada da mesma forma. Já para o processo de alongamento de cadeia, pode-se observar na linha 4, que será intermediado pela biomassa X_{CE} e na sua equação característica do processo ela foi sujeita à inibição I_2 , esta variável agrupa os efeitos do pH, amônia e inibição competitiva pelo açúcar no meio. Por fim, neste modelo considera-se o crescimento celular de ambas biomassas e ambas biomassas estão sujeitas ao decaimento celular, como representado nas linhas 7 e 8.

Na matriz de Gujer (Tabela 18) também foram resumidos os componentes do modelo (colunas i) para cada qual foi atribuído se ele apresenta ou não valor de DQO (linha DQO, 1 e 0 respectivamente), seu equivalente em conteúdo de carbono. Para cada processo, a representação do seu coeficiente de rendimento foi calculada pelo valor do coeficiente estequiométrico multiplicado pelo total subtraído do rendimento celular, pois desta forma o rendimento celular não seria contabilizado várias vezes no final do Somatório de ambos balanços. O componente de carbono inorgânico agrega ao somatório dos produtos entre os coeficientes de rendimento e o equivalente em carbono do componente. No momento de fechamento dos balanços, pode-se observar que os coeficientes de rendimento celular foram determinados como 0,21 para as fermentadoras primárias e 0,11 para as fermentadoras secundárias. A determinação destes valores por MCMC deverá atender essas exigências dos balanços de matéria orgânica e carbono.

5.2.1 Modificação do ADM1 na plataforma MATLAB® para duas biomassas independentes, desconsiderando os efeitos de transferência de massa entre fases, 2X_ADM-CE/H2

Para adequação do modelo alterou-se as equações diferenciais para os metabólitos principais, incluindo a biomassa X_{CE} nos dados de entrada. Além disso, diferenciou-se os carboidratos totais, agora representados por X_{SU} , dos carboidratos simples glicose e galactose, por S_{SU} . Como houve a adição de mais duas variáveis, o vetor de valores iniciais precisou ser readequado para contê-las. Realizadas essas alterações, deparou-se com a seguinte questão:

Quais seriam os valores iniciais de cada biomassa, se a biomassa inicial total é de $0,20 \text{ gDQO L}^{-1}$?

Primeiramente, tentou-se executar o modelo adicionando as variáveis X_{SU} e X_{CE} aos parâmetros livres a serem determinados. Esta tentativa foi executada com sucesso, porém os resultados não foram expressivos, uma vez que o MCMC foi incapaz de calcular ambas biomassas com a condição de que sua soma fosse $0,2 \text{ gDQO L}^{-1}$. Várias vezes os resultados das simulações apresentavam o valor do parâmetro X_{CE} igual a zero. Este fato mostrou uma grande deficiência do modelo em ter valores iniciais estimados pelo método MCMC. Acredita-se que tenham sido atribuídos baixos valores ao parâmetro de alongamento de cadeia e valores médios de erro tenham sido assumidos devido à baixa atividade durante o início da simulação (ocorrência da fermentação primária). Diante dessa deficiência, decidiu-se realizar sucessivas simulações alterando-se a razão das biomassas (Tabela 19), e caso houvesse diferença entre as simulações, seria adotada aquela que apresentasse menor soma de média dos quadrados dos resíduos.

Tabela 19. Exemplificação da variação de relação entre concentrações iniciais de biomassa fermentadora primária e secundária

Parâmetro	Relação entre concentração de biomassas (gDQO L^{-1})									
$X_{\text{SU},0}$	0,10	0,11	0,12	0,13	0,14	0,15	0,16	0,17	0,18	0,19
$X_{\text{CE},0}$	0,10	0,09	0,08	0,07	0,06	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01

Fonte: o autor.

De acordo com (HAARIO *et al.*, 2006), uma das dificuldades dos métodos de MCMC, até o desenvolvimento do modelo DRAM, era a determinação de parâmetros com alta correlação. Como verificou-se que a alta correlação entre os parâmetros k_{MSU} e K_{SU} , k_{MLac} e K_{Lac} apresentaram aumento da complexidade para determinação de parâmetros por MCMC, decidiu-se fixar as constantes de meia saturação com base na literatura (Danielsson, 2014 e Blanco, Oliveira e Zaiat, 2019). Neste momento, a constante de hidrólise de carboidratos e o coeficiente de rendimento celular da fermentação secundária também foram tratados como parâmetros livres (Tabela 20).

Tabela 20. Parâmetros livres a serem determinados pelo método MCMC no modelo considerando duas biomassas independentes.

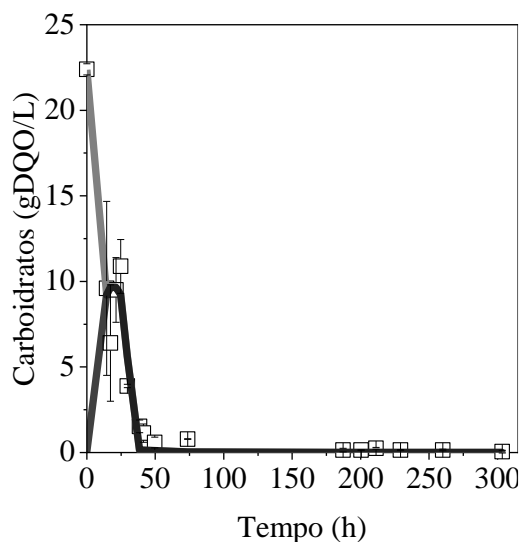
Parâmetro Livre	Descrição	Unidade
$k_{\text{HID,CH}}$	Constante de hidrólise de carboidratos	h^{-1}
k_{mSU}	Velocidade máxima de consumo de glicose	h^{-1}
k_{mCE}	Velocidade máxima de consumo de lactato	h^{-1}
Y_{SU}	Rendimento de biomassa fermentadora primária sobre consumo de glicose	$\text{gDQO g}^{-1}\text{DQO}$
Y_{CE}	Rendimento de biomassa fermentadora secundária sobre consumo de acetato e lactato	$\text{gDQO g}^{-1}\text{DQO}$

Fonte: o autor.

Decidiu-se propor dois modelos com a inclusão do alongamento de cadeia: um considerando os efeitos de transferência de massa entre fases (2X_ADM-CE) e outro os desconsiderando (2X_ADM-CE/H₂). Sendo que para ambos modelos foram realizadas 10 simulações para cada relação entre biomassas (Tabela 20) junto a determinação de parâmetros por MCMC. As simulações foram realizadas considerando 5.000 iterações para as Cadeias de Markov, com base nos resultados obtidos na sessão 1.8.3.. Apesar do diagnóstico de Geweke ter atribuído baixos valores aos parâmetros de alta correlação referentes ao alongamento de cadeia, a somatória de RMSD em relação aos dados experimentais para o modelo de 5.000 iterações foram as menores.

Os modelos desenvolvidos convergiram e seus resultados apresentaram menores variações de RMSE. Podem ser observadas variações mais abruptas de erro para o modelo 2X_ADM-CE entre as concentrações iniciais de biomassa de 0,10 a 0,12gDQO L⁻¹. Enquanto isso, as simulações sem limitações na transferência de massa entre fases do modelo 2X_ADM-CE/H₂ se apresentaram mais lineares na distribuição de erros. Antes de suceder com a apresentação dos resultados dos modelos separadamente e discutir suas particularidades, será apresentada uma característica em comum entre ambos, os efeitos da hidrólise de carboidratos complexos (Figura 26).

Figura 26. Comparativo de resultados de consumo de carboidratos experimentais (\square) com suas respectivas barras de erro, hidrólise de carboidratos (\blacksquare) e formação e consumo de carboidratos simples (—) do modelo de duas biomassas



Fonte: adaptado de Branco, Oliveira e Zaiat (2019).

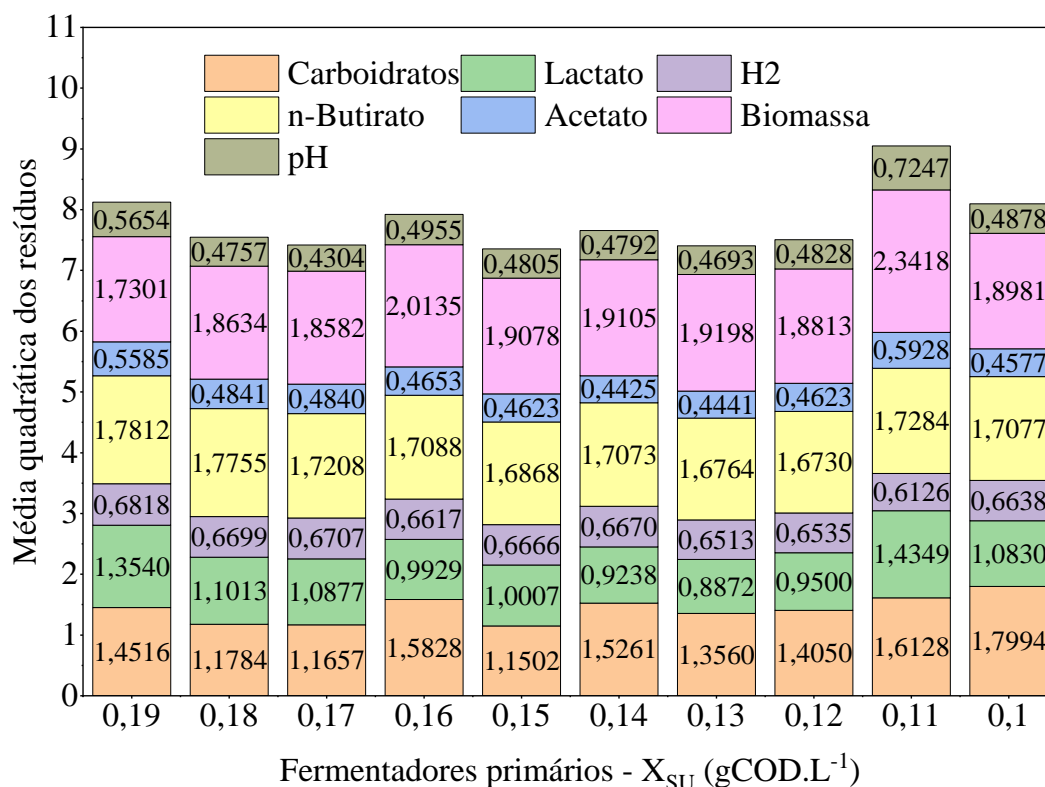
Muito autores julgam essencial a inclusão da etapa de hidrólise em modelos baseados no ADM1 (ROSÉN; JEPPSSON, 2006; DANIELSSON, 2014; HINKEN *et al.*, 2014; SATPATHY *et al.*, 2016b; MONTECCHIO; YUAN; MALPEI, 2018). Apesar da introdução desta etapa ter implicado no aumento da complexidade do modelo, acrescentando mais um parâmetro livre a ser determinado por MCMC, os resultados apresentaram bom ajuste (Figura 26). Ao considerar-se a etapa de hidrólise de lactose como função de uma cinética química de primeira ordem, observou-se melhor ajuste dos modelos em relação a consideração anterior. Enquanto englobar tanto a hidrólise de carboidratos quando consumo microbiano de carboidratos em uma única cinética de Monod apresentava RMSE médio de $0,8378 \text{ gDQO L}^{-1}$ de carboidratos, a inclusão da etapa hidrolítica reduziu o RMSE para uma média de $0,3570 \text{ gDQO L}^{-1}$ de carboidratos, e propiciou outro padrão de comportamento as curvas de síntese de acetato e lactato, bem como para o crescimento microbiano, que serão reportados a seguir.

5.2.2 Modelo considerando efeitos de transferência de massa entre fases - 2X_ADM-CE

As simulações foram realizadas com sucesso para todas as relações entre concentrações iniciais de fermentadores primários e secundários, obtendo-se convergência tanto para o modelo 2X_ADM-CE, quanto para o método MCMC. A simulação de cada modelo

perdurou entre 6 e 8h, sendo que os modelos que apresentaram menores valores de diagnóstico de Geweke para a determinação de parâmetros foram os que mais se aproximaram de 8. Na Figura 27, são apresentados os valores de média dos quadrados dos resíduos obtidos para cada modelo em relação ao valor inicial dos organismos fermentadores de acordo com a Tabela 19.

Figura 27. Média dos quadrados dos resíduos do modelo **considerando** limitações na transferência de massa para valores iniciais de fermentadores primários.



Legenda: $X_{CE,0} = 0,2 - X_{SU,0}$ (gCOD L⁻¹). Açúcar, lactato, acetato, *n*-butirato, biomassa e H₂ são expressos em gCOD L⁻¹, enquanto pH é adimensional. Fonte: o autor.

Os valores de RMSE apresentaram comportamento semelhante entre as simulações com diferentes concentrações iniciais de biomassa. Observa-se um leve decréscimo nos valores de erro na porção central das concentrações de X_{SU} , entre 0,17 e 0,12g DQO.L⁻¹ principalmente devido ao melhor ajuste das simulações de carboidratos aos dados experimentais (Figura 26). Além disso, os parâmetros de comparação com dados experimentais que apresentaram maior representação na somatória dos RMSE foram açúcares, *n*-butirato e biomassa. Verificou-se uma fraca correlação negativa entre a concentração inicial de fermentadores primários e os erros decorrentes dessa escolha (-0,3531).

Comparados aos modelos mostrados anteriormente, observa-se uma redução relevante dos erros sobre o consumo de açúcares, síntese e consumo de lactato, principalmente. O somatório destes valores sugere que o modelo cuja concentração inicial de fermentadores primários de 0,15 gDQO L⁻¹ apresenta melhor ajuste aos dados experimentais (menor RMSE). A partir disso, serão apresentados os resultados referentes ao método MCMC, como a dispersão dos valores dos parâmetros estimados dentro das Cadeias de Markov (Figura 27), os valores obtidos (Tabela 23).

Tabela 21. Valores determinados pelo método de MCMC dos parâmetros empregados no modelo 2X_ADM-CE para as diferentes condições iniciais de biomassas fermentadoras primárias e secundárias. Continua

$X_{SU,0}$	Parâmetro	Média	Desvio Padrão	Erro Monte Carlo	Tau	Geweke
0,19	$k_{HID, CH}$	0,0501	0,0054	0,0005	32,8110	0,9348
	k_{mSU}	0,4720	0,0773	0,0083	57,5410	0,9919
	Y_{SU}	0,2242	0,0230	0,0022	48,4740	0,9392
	k_{mCE}	1,0860	0,2414	0,0267	84,4820	0,9533
	Y_{CE}	0,1112	0,0371	0,0040	78,5080	0,8395
0,18	$k_{HID, CH}$	0,0512	0,0065	0,0008	76,2590	0,9300
	k_{mSU}	0,4731	0,0731	0,0058	36,9870	0,9255
	Y_{SU}	0,2206	0,0240	0,0020	43,9720	0,9991
	k_{mCE}	0,9060	0,2008	0,0258	153,2300	0,9570
	Y_{CE}	0,1113	0,0401	0,0046	111,5000	0,9490
0,17	$k_{HID, CH}$	0,0513	0,0061	0,0003	25,8000	0,9678
	k_{mSU}	0,4971	0,0910	0,0102	66,2690	0,9197
	Y_{SU}	0,2170	0,0223	0,0020	40,9650	0,9449
	k_{mCE}	0,7574	0,1349	0,0122	46,6550	0,8927
	Y_{CE}	0,1154	0,0351	0,0035	56,8770	0,7571
0,16	$k_{HID, CH}$	0,0521	0,0061	0,0005	27,6640	0,9806
	k_{mSU}	0,4971	0,0782	0,0083	64,5310	0,9485
	Y_{SU}	0,2119	0,0224	0,0017	32,2050	0,9410
	k_{mCE}	0,6620	0,1227	0,0132	72,5320	0,8221
	Y_{CE}	0,1276	0,0411	0,0038	58,9340	0,7319

Nota: $X_{CE,0} = 0.2 - X_{SU,0}$ (gCOD L⁻¹). Unidades dos parâmetros: $k_{HID, CH}$ (h⁻¹), k_{mSU} (h⁻¹), $Y_{SU}(1)$, k_{mCE} (h⁻¹), Y_{CE} (gDQO g⁻¹DQO).

Tabela 23. Valores determinados pelo método de MCMC dos parâmetros empregados no modelo 2X_ADM-CE para as diferentes condições iniciais de biomassas fermentadoras primárias e secundárias. Conclui

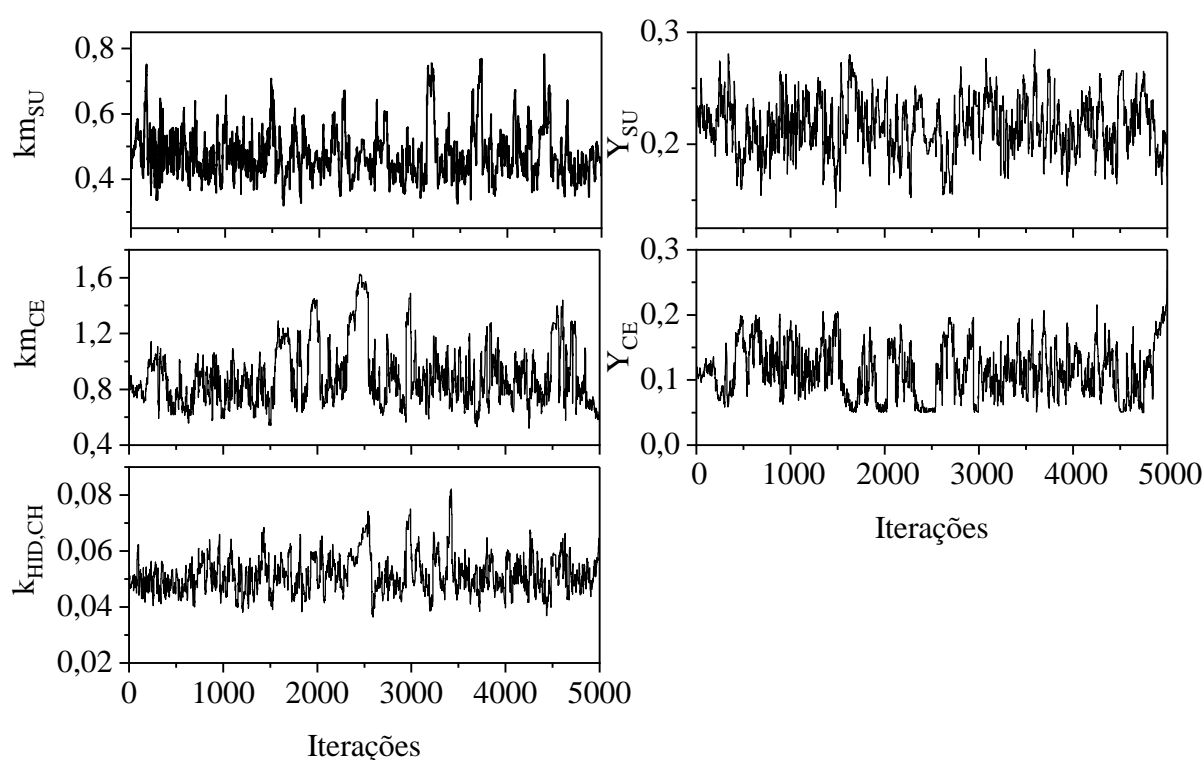
$X_{SU,0}$	Parâmetro	Média	Desvio Padrão	Erro Monte Carlo	Tau	Geweke
0,15	$k_{HID, CH}$	0,0515	0,0061	0,0005	26,8720	0,9792
	k_{msu}	0,5320	0,0993	0,0121	74,0660	0,9249
	Y_{su}	0,2078	0,0256	0,0027	69,7930	0,9413
	k_{mce}	0,5991	0,1230	0,0144	72,6330	0,9104
	Y_{ce}	0,1334	0,0491	0,0054	72,3300	0,7118
0,14	$k_{HID, CH}$	0,0516	0,0057	0,0004	30,9160	0,9975
	k_{msu}	0,5282	0,0840	0,0073	61,3810	0,9210
	Y_{su}	0,2086	0,0238	0,0018	25,1970	0,9696
	k_{mce}	0,5676	0,1021	0,0092	50,9520	0,9922
	Y_{ce}	0,1284	0,0425	0,0040	47,0910	0,9474
0,13	$k_{HID, CH}$	0,0509	0,0055	0,0003	23,4860	0,9982
	k_{msu}	0,5694	0,1109	0,0107	77,9820	0,9990
	Y_{su}	0,2016	0,0247	0,0018	32,0440	0,9932
	k_{mce}	0,4994	0,0788	0,0093	128,5600	0,9044
	Y_{ce}	0,1433	0,0421	0,0049	86,9000	0,9224
0,12	$k_{HID, CH}$	0,0527	0,0058	0,0004	21,7460	0,9502
	k_{msu}	0,5579	0,0836	0,0063	29,5060	0,9565
	Y_{su}	0,2000	0,0241	0,0020	25,5550	0,9704
	k_{mce}	0,4821	0,0660	0,0035	23,0160	0,9920
	Y_{ce}	0,1433	0,0392	0,0030	25,5600	0,9983
0,11	$k_{HID, CH}$	0,0525	0,0057	0,0003	19,7910	0,9573
	k_{msu}	0,5716	0,0772	0,0052	20,8980	0,9133
	Y_{su}	0,2057	0,0219	0,0019	39,6050	0,9400
	k_{mce}	0,4748	0,0677	0,0048	41,7830	0,9109
	Y_{ce}	0,1296	0,0379	0,0033	54,4260	0,8650
0,10	$k_{HID, CH}$	0,0528	0,0058	0,0005	28,5770	0,9704
	k_{msu}	0,5860	0,0838	0,0066	28,0830	0,9707
	Y_{su}	0,2035	0,0233	0,0018	29,9640	0,9692
	k_{mce}	0,4511	0,0723	0,0079	50,1920	0,9345
	Y_{ce}	0,1356	0,0406	0,0046	59,0910	0,7762

Nota: $X_{CE,0} = 0.2 - X_{SU,0}$ (gCOD L⁻¹). Unidades dos parâmetros: $k_{HID, CH}$ (h⁻¹), k_{msu} (h⁻¹), $Y_{su}(1)$, k_{mce} (h⁻¹), Y_{ce} (gDQO g⁻¹DQO). Fonte: o autor.

Com base na Tabela 23, observa-se valores médios bastante próximos para os parâmetros determinados sob diferentes condições iniciais. O parâmetro $k_{HID, CH}$ foi o que apresentou menor variação, cuja valor médio foi de $0,0515 \pm 0,0061$ gDQO.g⁻¹DQO.h⁻¹. Em seguida k_{msu} $0,5284 \pm 0,0349$ ¹, Y_{su} $0,2101 \pm 0,0067$, k_{mce} $0,6485 \pm 0,1634$ gDQO.g⁻¹DQO.h⁻¹ e Y_{ce} $0,1279 \pm 0,0092$. Nota-se que os maiores desvios padrões foram encontrados nos parâmetros referentes ao alongamento de cadeia, nas concentrações iniciais de $X_{SU,0}$ variando entre 0,17 e

0, 15 gDOQ.L⁻¹. Além disso, observa-se que o diagnóstico de Geweke apresenta resultados inferiores para estes parâmetros, chegando 0,7118 para Y_{CE} cuja $X_{SU,0}$ é de 0,15 gDOQ.L⁻¹. Valores próximos de 1,0 indicam melhor convergência pelo diagnóstico de Geweke, já que este diagnóstico propõe a comparação de porções da cadeia de Markov por meio da razão entre suas estatísticas de teste Z, identificando a característica estacionária entre elas (SAHLIN, 2011).

Figura 28. Resultados das dispersões em linha dos valores aceitos para compor as Cadeias de Markov com 5.000 iterações das simulações do modelo 2X_ADM-CE de valor inicial de fermentadores primários - $X_{SU,0}$ 0,15 gDQO L⁻¹



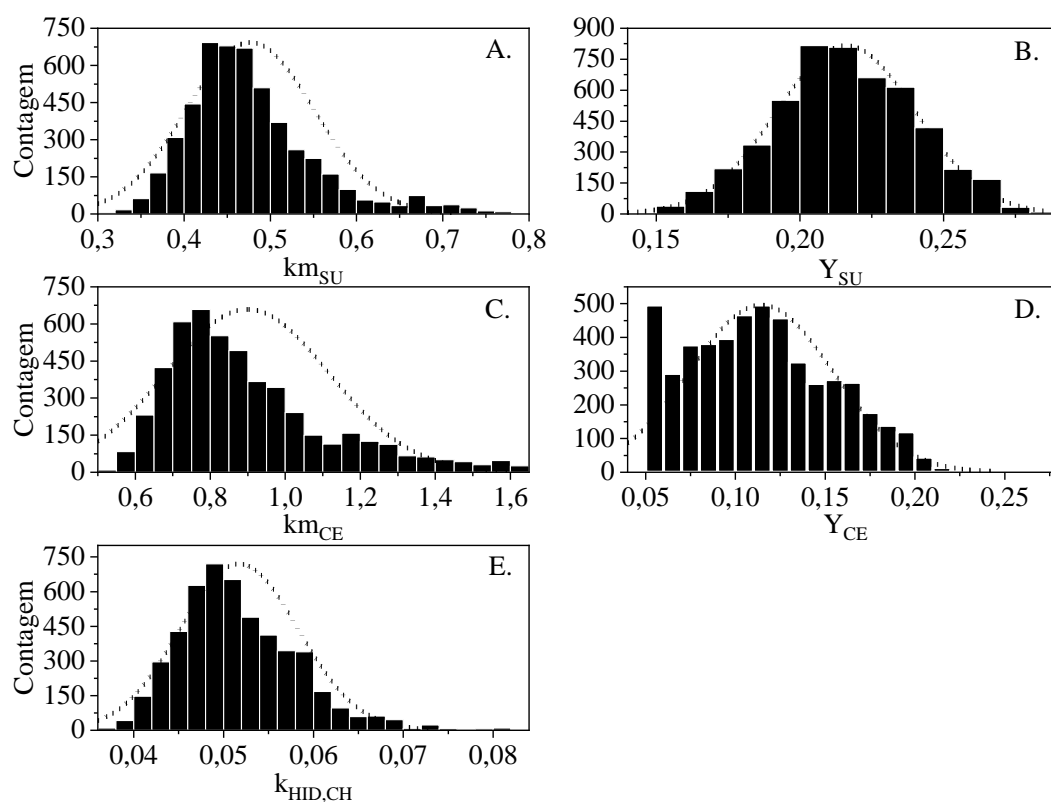
Fonte: o autor.

Os gráficos de distribuição mostram os valores dos parâmetros livres aceitos pelo método de inferência Bayesiana para fazerem parte da cadeia de Markov. Adotar um referencial da literatura para os parâmetros KS_{SU} e KS_{CE} foi de grande utilidade para a determinação de parâmetros por MCMC obtendo-se soluções mais rapidamente e com melhores indicadores de convergência. Ao contrário das simulações para determinação de parâmetros nos modelos anteriores, nos quais tentou-se determinar parâmetros de alta correlação como velocidade máxima de consumo de substrato, constante de meia saturação para consumo de substrato e taxa de crescimento celular a partir de substrato, este modelo mostrou menor variação entre os

valores aceitos para compor as Cadeias de Markov (Figura 28). Visualmente, este fator poderia implicar na presunção de convergência, mas Sahlin (2011), chama atenção ao se presumir convergência desta forma, e sugere métodos como o diagnóstico de convergência de Geweke para este fim.

Neste momento chegou-se ao ponto de decidir qual parâmetro seria mais importante para a escolha da condição inicial mais adequada para representar a hipótese de duas biomassas e alongamento de cadeia. A condição que o diagnóstico de Geweke indica melhor convergência ou a condição em que menores erros são encontrados. Como o objetivo deste trabalho não envolve teorização sobre os métodos matemáticos de convergência das Cadeias de Markov, optou-se por escolher a condição inicial que implicaria em menores erros. Portanto apresentar-se-á os resultados de MCMC para a condição inicial de $X_{SU,0}$ de $0,15 \text{ gDQO L}^{-1}$. Os histogramas referentes aos parâmetros determinados para esta concentração estão dispostos na Figura 29.

Figura 29. Histogramas das distribuições dos valores aceitos para compor a cadeia de Markov dos parâmetros livres determinados por MCMC com 5.000 iterações para o modelo 2X_ADM-CE, cuja condição inicial para $X_{SU,0}$ é de $0,15 \text{ gDQO L}^{-1}$



Pelo algoritmo de DRAM, os valores dos parâmetros para compor as Cadeias de Markov tendem a aproximar-se de uma distribuição Normal, uma vez que o diagnóstico de

Geweke usa de estatística Z para analisar convergência. Por isso, espera-se que as distribuições de valores no formato de histograma se aproximem de distribuições Normal. No entanto, deve-se ressaltar que esta não é uma forma de se presumir convergência (JESPERSEN, 2010). Os histogramas mostram que os parâmetros determinados $k_{HID,CH}$, k_{MSU} e Y_{SU} apresentaram curvas de distribuição bem próximas a uma Normal (Figura 29), no entanto, nem por isso a estes parâmetros foram atribuídos os maiores valores de diagnóstico de Geweke (Tabela 23).

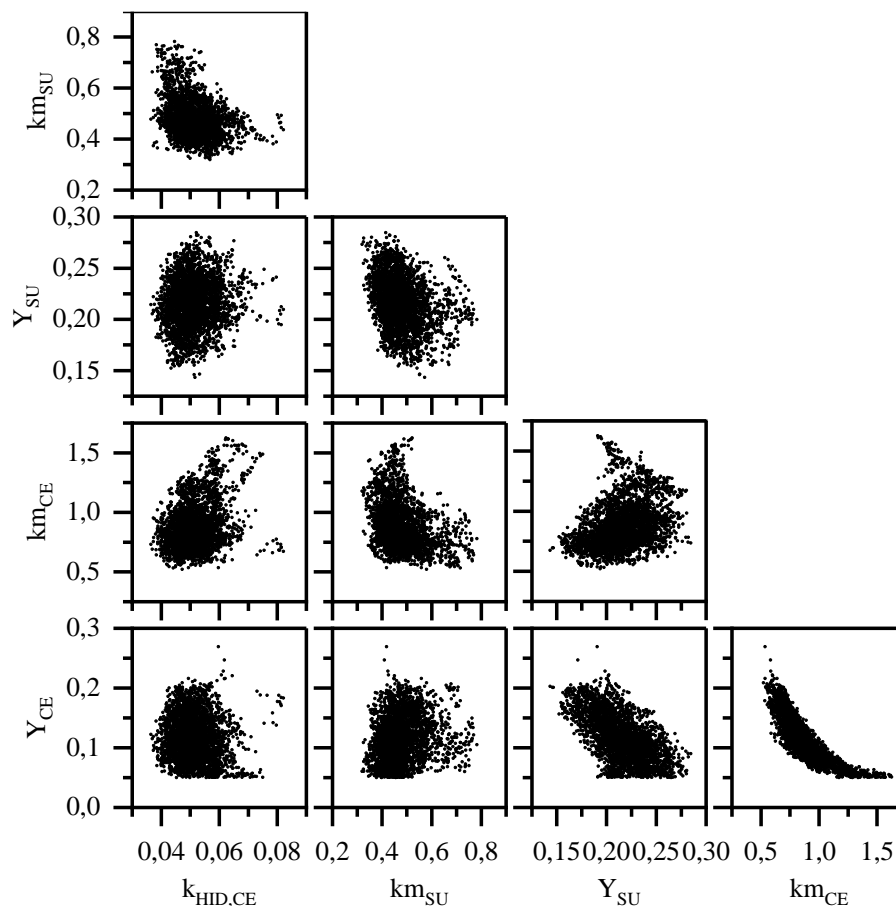
Por outro lado, os parâmetros referentes ao alongamento de cadeia, k_{MCE} e Y_{CE} , não se mostram tão distantes de uma distribuição Normal como nos modelos apresentados anteriormente. O parâmetro k_{MCE} apresenta distorção à direita ao passo que Y_{CE} apresenta um formato multimodal com dois picos de frequência nos valores de 0,05 a 0,06 e na região de 0,10 a 0,13 (Figura 29), mas mesmo assim obtiveram os maiores valores para diagnóstico de Geweke (Tabela 23) em relação aos modelos anteriores.

As análises de correlação entre os parâmetros determinados para modelo de duas biomassas considerando limitações na transferência de massa entre fases para simulação MCMC, 2X_ADM-CE estão dispostas na Tabela 22 e Figura 30.

Tabela 22. Resultado do teste de análise de correlação para modelo de duas biomassas considerando limitações na transferência de massa entre fases para simulação MCMC.

	$k_{HID,CH}$	k_{MSU}	Y_{SU}	k_{MCE}	Y_{CE}
$k_{HID,CH}$	1,0000				
k_{MSU}	-0,3341	1,0000			
Y_{SU}	0,2608	-0,2880	1,0000		
k_{MCE}	0,3603	-0,4402	0,5041	1,0000	
Y_{CE}	-0,2363	0,2393	-0,7501	-0,8658	1,0000

Figura 30. Resultado das correlações entre as distribuições das médias dos valores determinados para as variáveis livres do modelo 2X_ADM-CE para valor inicial de fermentadores primários de $0,15 \text{ gDQO L}^{-1}$, pelo método estatístico de MCMC

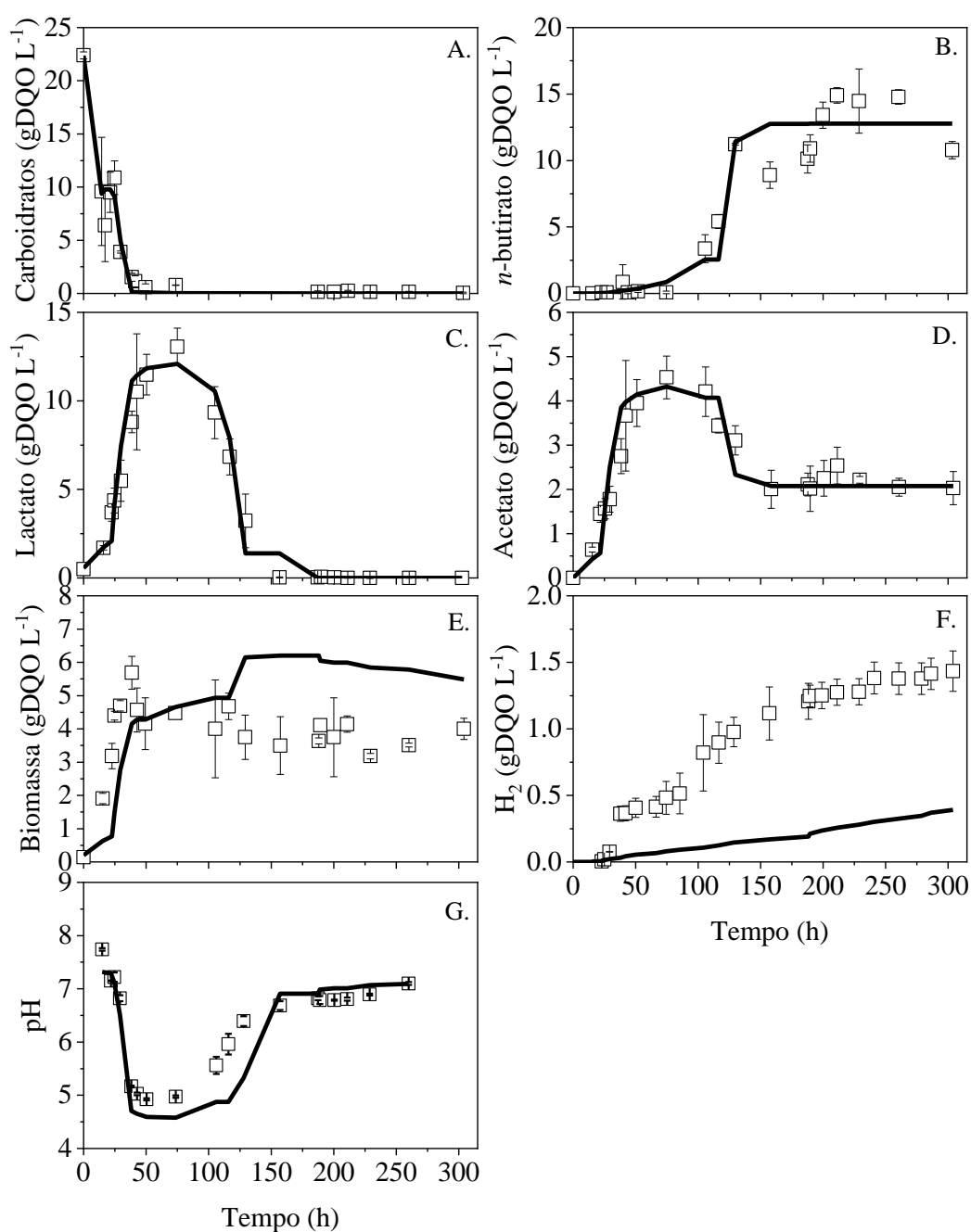


Fonte: o autor.

Observando-se ambos gráficos de correlação entre os parâmetros determinados pelo método MCMC (Figura 30), pode-se notar o formato de banana da correção entre os parâmetros de alongamento de cadeia, sugerindo visualmente a ocorrência de forte correlação inversa entre ambos. Já entre os outros parâmetros esta observação é mais complicada. Porém, se observada a relação entre os parâmetros de crescimento celular Y_{SU} e Y_{CE} , nota-se certo formato elíptico, também sugerindo correlação inversa entre ambos parâmetros. Na Tabela 22, nota-se forte correlação inversa entre os parâmetros Y_{SU} e Y_{CE} (-0,7501), e Y_{CE} e km_{CE} (-0,8658). E como havia sido observado, a correlação entre estes parâmetros é forte e inversa. Porém, diferentemente dos modelos estudados anteriormente, uma forte correlação entre estes parâmetros não os prejudicou ao serem determinados pelo método de MCMC, apresentando distribuições próximas à uma Normal e até mesmo valores aceitáveis para o diagnóstico de Geweke. Entre os outros parâmetros obteve-se médias e baixas correlações (Tabela 22).

Uma vez tendo-se determinado todos os parâmetros necessários para a simulação do modelo 2X_ADM-CE, prosseguiu-se com a simulação para obtenção dos perfis temporais dos metabólitos carboidratos, *n*-butirato, acetato, lactato, H₂, além do crescimento de biomassa total (X_{SU} e X_{CE}) e variações de pH (Figura 31).

Figura 31. Comparativo de resultados entre dados experimentais (□) com suas respectivas barras de erro e do modelo de duas biomassas considerando a transferência de massa entre fases, 2X_ADM-CE (—)



Fonte: adaptado de Branco, Oliveira e Zaiat (2019).

De acordo com a Figura 31, o modelo 2X_ADM-CE simulado com biomassa inicial de fermentadores primários de $0,15 \text{ gDQO L}^{-1}$ mostrou no geral um bom ajuste aos dados experimentais. Principalmente em relação aos metabólitos acetato, lactato e *n*-butirato (Figura 31 B, C e D). No entanto, os valores de biomassa, agora composta por duas populações microbianas foi superestimado a partir de 100 h (Figura 31 E), e os valores de H_2 , diferentemente dos modelos da seção 5.1, apesar de considerar limitações na transferência de massa entre fases, apresentou uma pequena produção em patamares, porém seu valor foi subestimado para menos de um terço da concentração obtida experimentalmente (Figura 31 F).

A primeira etapa das simulações, a qual é identificada pela fermentação primária, perdurou até que todo carboidrato fosse consumido. Este período é denotado pela rápida taxa de consumo deste metabólito, e equivalente produção dos ácidos graxos primários acetato e lactato com pequena liberação de H_2 no meio. Por consequência da acidificação do meio, o pH do sistema tende a decair até estabilizar-se no momento em que a síntese de acetato e lactato cessam. Esse período tanto nas simulações quanto nos experimentos de Blanco *et al.* (2019), perdurou por aproximadamente 50 h, e tanto as curvas de carboidratos quanto as de acetato, lactato e pH foram bem ajustadas aos valores experimentais do período (Figura 31 A, C e D), mostrando que o modelo 2X_ADM-CE ainda vai ao encontro das observações relatadas na literatura sobre fermentação de soro de leite (DAVILA-VAZQUEZ *et al.*, 2008; CASTELLÓ *et al.*, 2009; NAJAFPOUR *et al.*, 2009).

Durante a fermentação primária, a curva de crescimento de biomassa apresentou leve retardo em relação aos modelos elaborados anteriormente, os quais desconsideram a etapa de hidrólise de carboidratos (Figura 31 A). Este fato pode ser explicado pela diminuição da velocidade máxima de crescimento empregada nos modelos anteriores para este, uma vez que houve a separação das duas etapas envolvendo carboidratos, hidrólise e fermentação. E mesmo o aumento da taxa de crescimento celular (Y_{SU}) não foi o bastante para aproximar a curva de simulação do 2X_ADM-CE aos dados experimentais de produção de H_2 . O método de determinação de parâmetros por MCMC promoveu maior aproximação dos metabólitos acetato e lactato do que da biomassa neste período em que estes são governados pelo mesmo parâmetro de velocidade máxima de consumo de carboidratos, devido ao peso dos metabólitos primários na somatória dos resíduos ao quadrado.

Seguindo o mesmo padrão apresentado pelo modelo que considerava inibição competitiva da formação de *n*-butirato pela Eq. 42, 2X_ADM-CE mostrou um retardo positivo na formação deste metabólito (Figura 31 B). Pois além da equação de inibição, considerou-se a atuação de outra biomassa com menores taxa de crescimento celular (Y_{CE}) e concentração

inicial ($X_{CE,0}$). Já em relação ao H_2 , considerar limitações na transferência de massa entre fases mostrou-se novamente ineficaz para representar este sistema biológico. Ao longo de sua simulação tanto durante a fermentação primária quanto secundária, menos de um terço da quantidade obtida experimentalmente foi predita. Porém, ainda é possível observar os momentos de alteração de cada via metabólica, levando a produção de H_2 a ocorrer em patamares (Figura 31 F).

A equação referente a vazão de massa gasosa (Eq. 36) não foi capaz de representar os intervalos de liberação de gases do espaço livre quando fosse atingida a pressão limite (atmosférica, 1 atm). Rodriguez (2006), ao desenvolver seu modelo baseado em ADM1 para a fermentação de etanol, não obteve sucesso nas simulações referentes a H_2 . O autor sugere que o H_2 tenha sua produção e consumo muito sensíveis em relação a alterações de rotas metabólicas, concentrações de biomassa e até mesmo de transferência de massa. Em estudo recente sobre modelagem de sistemas de produção de H_2 a partir de soro de leite, Montecchio e colaboradores (2018) obtiveram produção superestimada de H_2 em seu modelo de estequiometria variável baseado em ADM1. Para contornar a situação, acrescentaram a rota de homoacetogênese ao modelo, melhor ajustando H_2 , porém, subestimando a produção de acetato.

Os resultados obtidos na segunda porção das simulações, na qual sugere-se a ocorrência do alongamento de cadeia, pode-se observar que o crescimento celular dos fermentadores secundários supera o decaimento dos fermentadores primários no entorno de 50 h, mostrando a atuação destes microrganismos no modelo (Figura 31 E). Este momento é marcado pela alteração da rota metabólica para a promoção do alongamento de cadeia (Kucek *et al.*, 2016a; Liu *et al.*, 2020). A partir deste momento, observa-se um lento consumo dos metabólitos primários acetato e lactato e ligeira formação de *n*-butirato até pouco antes de 100 h. Pois em seguida, devido ao crescimento celular, a alta população de fermentadores secundários intensificou o consumo de acetato e lactato do sistema, produzindo grandes quantidades de *n*-butirato e ainda mais biomassa (Figura 31 B e E). Em torno de 150 h depleção de lactato, doador de elétrons para ocorrência do processo de alongamento de cadeia (Figura 31 C). Nesse ponto, observou-se o decaimento de fermentadores secundários, bem como a estagnação do consumo de acetato e produção de *n*-butirato (Figura 31 D e B, respectivamente).

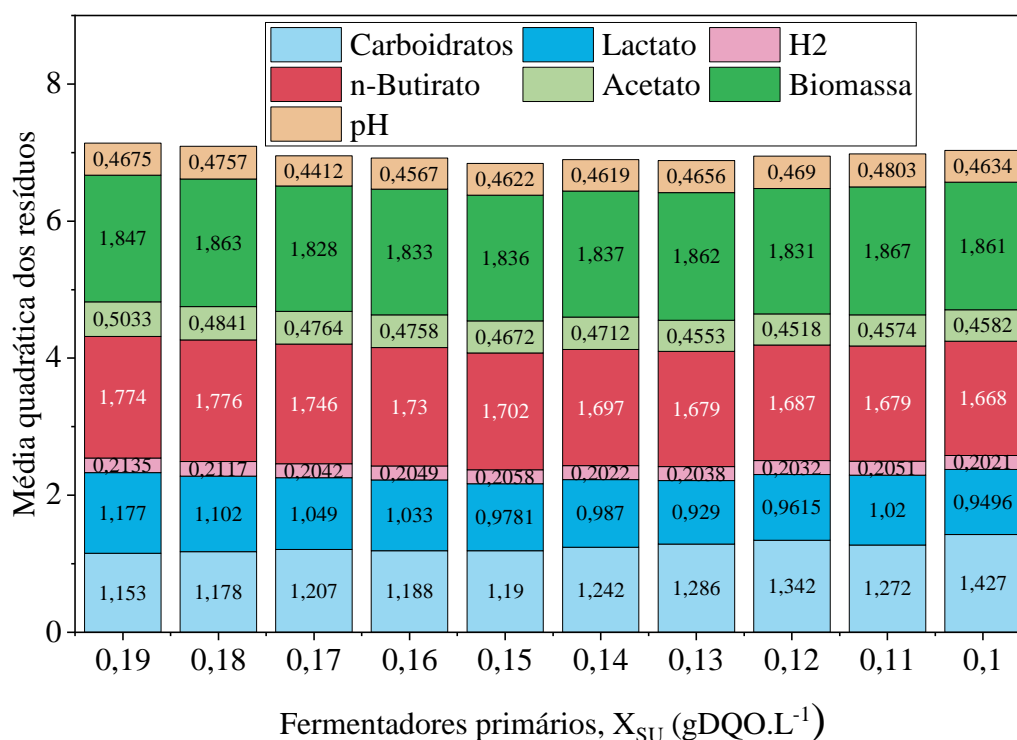
Outro evento importante a ser destacado é o de alcalinização do meio. De acordo com a Figura 31 G, o pH apresenta-se estabilizado entre aproximadamente 50 h e 125 h. A partir deste último momento observa-se incrementos na curva de pH, junto a momentos de maior consumo dos ácidos acético e láctico para a síntese de um ácido de menor constante de

dissociação, *n*-butirato. Neste momento observa-se também uma ligeira alteração na inclinação da curva de produção de H₂, resultado da degradação de lactato em acetil-CoA que participa do processo de alongamento de cadeia.

5.2.3 Modelo desconsiderando efeitos de transferência de massa entre fases - 2X_ADM-CE/H2

Os resultados do modelo 2X_ADM-CE/H2 serão apresentados de maneira semelhante ao correspondente modelo que considera as limitações de transferência de massa entre fases. Obteve-se sucesso nas simulações do presente modelo, as quais transcorreram entre 5 e 7 h até que houvesse convergência das Cadeias de Markov do método MCMC. Na Figura 32, resumiu-se os valores de média dos quadrados dos resíduos obtidos para cada modelo em relação ao valor inicial dos organismos fermentadores. E na Tabela 23 resumiu-se os valores determinados para os parâmetros livres deste modelo, bem como seus indicadores estatísticos do método MCMC.

Figura 32. Média dos quadrados dos resíduos do modelo desconsiderando limitações na transferência de massa – 2X_ADM-CE/H2 - para valores iniciais de fermentadores primários



Nota: $X_{CE,0} = 0,2 - X_{SU,0}$ (gCOD L⁻¹). Açúcar, lactato, acetato, *n*-butirato, biomassa e H₂ são expressos em gCOD L⁻¹, enquanto pH é adimensional. Fonte: o autor.

Tabela 23. Valores determinados pelo método de MCMC dos parâmetros empregados no modelo 2X_ADM-CE para as diferentes condições iniciais de biomassas fermentadoras primárias e secundárias. Nota: $X_{CE,0} = 0.2 - X_{SU,0}$ (gCOD L⁻¹). Unidades dos parâmetros: $k_{HID, CH}$ (h⁻¹), k_{MSU} (h⁻¹), Y_{SU} (gCOD g⁻¹DQO), k_{mCE} (h⁻¹), Y_{CE} (gCOD g⁻¹DQO), continua

$X_{SU,0}$	Parâmetro	Média	Desvio Padrão	Erro Monte Carlo	Tau	Geweke
0,19	$k_{HID, CH}$	0,0502	0,0064	0,0005	35,1160	0,9414
	k_{MSU}	0,4879	0,0980	0,0117	64,8180	0,9038
	Y_{SU}	0,2208	0,0278	0,0028	60,8250	0,9757
	k_{mCE}	1,0108	0,2163	0,0306	86,2240	0,8841
	Y_{CE}	0,1224	0,0423	0,0054	73,6680	0,8855
0,18	$k_{HID, CH}$	0,0502	0,0056	0,0005	32,6420	0,9149
	k_{MSU}	0,4829	0,0764	0,0071	41,2650	0,9160
	Y_{SU}	0,2230	0,0239	0,0019	30,9110	0,9324
	k_{mCE}	0,8937	0,2152	0,0223	52,2890	0,8030
	Y_{CE}	0,1098	0,0391	0,0036	46,7680	0,7823
0,17	$k_{HID, CH}$	0,0518	0,0062	0,0005	33,6390	0,9814
	k_{MSU}	0,4900	0,0777	0,0069	65,5660	0,9772
	Y_{SU}	0,2121	0,0247	0,0024	52,9760	0,9672
	k_{mCE}	0,7605	0,1819	0,0250	92,9370	0,8554
	Y_{CE}	0,1220	0,0448	0,0060	93,3490	0,9375
0,16	$k_{HID, CH}$	0,0514	0,0047	0,0008	48,6890	0,9697
	k_{MSU}	0,4793	0,0545	0,0097	13,4130	0,8272
	Y_{SU}	0,2135	0,0112	0,0021	24,9780	0,9822
	k_{mCE}	0,6282	0,0804	0,0155	27,7350	0,9982
	Y_{CE}	0,1342	0,0336	0,0066	27,0460	0,9328
0,15	$k_{HID, CH}$	0,0540	0,0055	0,0008	9,5989	0,8518
	k_{MSU}	0,4849	0,0477	0,0056	8,4200	0,9528
	Y_{SU}	0,2133	0,0201	0,0034	28,7120	0,8979
	k_{mCE}	0,6246	0,0722	0,0126	24,5300	0,9602
	Y_{CE}	0,1177	0,0261	0,0043	31,9980	0,9624
0,14	$k_{HID, CH}$	0,0539	0,0064	0,0011	34,8840	0,7879
	k_{MSU}	0,5108	0,0652	0,0110	15,4130	0,8768
	Y_{SU}	0,2106	0,0203	0,0034	17,2130	0,9407
	k_{mCE}	0,5426	0,0461	0,0080	14,2200	0,9796
	Y_{CE}	0,1295	0,0198	0,0036	23,9950	0,9663
0,13	$k_{HID, CH}$	0,0521	0,0053	0,0008	41,9540	0,9404
	k_{MSU}	0,5306	0,0564	0,0095	18,5470	0,9337
	Y_{SU}	0,2023	0,0181	0,0025	12,0180	0,8843
	k_{mCE}	0,4790	0,0553	0,0108	45,7580	0,9396
	Y_{CE}	0,1523	0,0266	0,0053	55,6080	0,7638

Tabela 25. Valores determinados pelo método de MCMC dos parâmetros empregados no modelo 2X_ADM-CE para as diferentes condições iniciais de biomassas fermentadoras primárias e secundárias. Nota: $X_{CE,0} = 0.2 - X_{SU,0}$ (gCOD L⁻¹). Unidades dos parâmetros: $k_{HID, CH}$ (h⁻¹), k_{MSU} (h⁻¹), Y_{SU} (gCOD g⁻¹DQO), k_{mCE} (h⁻¹), Y_{CE} (gCOD g⁻¹DQO), conclusão

$X_{SU,0}$	Parâmetro	Média	Desvio Padrão	Erro Monte Carlo	Tau	Geweke
0,12	$k_{HID, CH}$	0,0542	0,0071	0,0013	25,6110	0,9711
	k_{MSU}	0,5609	0,0506	0,0095	29,6710	0,9929
	Y_{SU}	0,2048	0,0195	0,0029	8,5404	0,9122
	k_{mCE}	0,4768	0,0462	0,0086	38,0220	0,8827
	Y_{CE}	0,1361	0,0237	0,0043	30,6400	0,9361
0,11	$k_{HID, CH}$	0,0520	0,0056	0,0011	20,2670	0,9979
	k_{MSU}	0,5676	0,0716	0,0133	23,3290	0,8639
	Y_{SU}	0,2021	0,0186	0,0031	13,7660	0,8960
	k_{mCE}	0,4800	0,0585	0,0115	34,9970	0,7394
	Y_{CE}	0,1269	0,0269	0,0051	34,5030	0,8135
0,10	$k_{HID, CH}$	0,0528	0,0060	0,0010	15,6220	0,8850
	k_{MSU}	0,5709	0,0688	0,0101	14,8970	0,8957
	Y_{SU}	0,2058	0,0207	0,0035	15,0510	0,9519
	k_{mCE}	0,4389	0,0511	0,0093	40,5650	0,8881
	Y_{CE}	0,1346	0,0296	0,0051	25,1960	0,8024

Fonte: o autor.

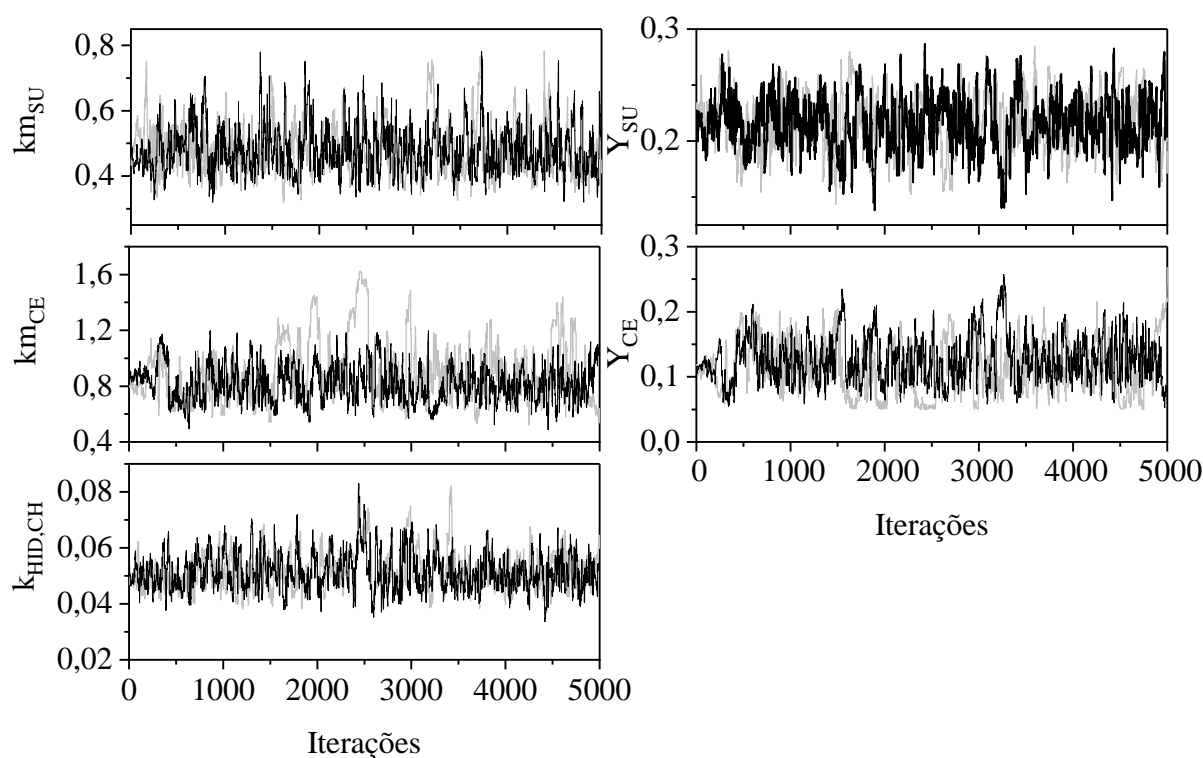
Os valores de RMSE apresentaram comportamento semelhante entre as simulações com diferentes concentrações iniciais de biomassa, mostrando-se menos sensíveis as variações deste parâmetro do que o modelo anterior, o 2X_ADM-CE (Figura 32). Biomassa e *n*-butirato ainda se apresentam como os principais parâmetros que agregam maior erro ao modelo. Seguido pelos carboidratos que tiveram seus erros reduzidos e lactato. H₂ apresenta uma ínfima participação nos erros do atual modelo, junto ao pH e acetato. Novamente a comparação entre os erros do modelo 2X_ADM-CE/H₂ e os pontos experimentais não possibilita a visualização de quaisquer relações entre o aumento ou diminuição dos fermentadores primários e a síntese/consumo privilegiado de metabólitos no sistema estudado (Figura 32).

Com base na Tabela 25, observa-se valores médios bastante próximos para os parâmetros determinados sob diferentes condições iniciais. O parâmetro $k_{HID, CH}$ foi o que apresentou menor variação, cujo valor médio foi de $0,0523 \pm 0,0059$ h⁻¹, seguido de Y_{SU} $0,2108 \pm 0,0205$, Y_{CE} $0,1285 \pm 0,0312$ e k_{MSU} $0,2108 \pm 0,0667$ gDQO.gDQO⁻¹.h⁻¹, por fim k_{mCE} $0,6335 \pm 0,1023$ gDQO.gDQO⁻¹.h⁻¹. Nota-se que os maiores desvios padrões não são mais relativos aos parâmetros do alongamento de cadeia. Além disso, observa-se que o diagnóstico de Geweke apresenta resultados inferiores para os parâmetros referentes à hidrólise de

carboidratos e de taxa de crescimento de fermentadores primários na condição inicial de $0,15 \text{ gDQO L}^{-1}$, condição que novamente indicou o menor MRSE. Observa-se também uma variação nos diagnósticos de Geweke para os outros parâmetros determinados entre todas as condições iniciais, sendo que no modelo anterior, o 2X_ADM-CE, apenas aos parâmetros de alongamento de cadeia eram atribuídos menores indicadores de convergência.

O somatório dos valores de RMSE sugere que o modelo cuja concentração inicial de fermentadores primários de $0,15 \text{ gDQO L}^{-1}$ apresenta melhor ajuste aos dados experimentais (menor RMSE). A partir disso, serão apresentados os resultados referentes a dispersão dos valores dos parâmetros estimados para compor as Cadeias de Markov deste modelo (Figura 33).

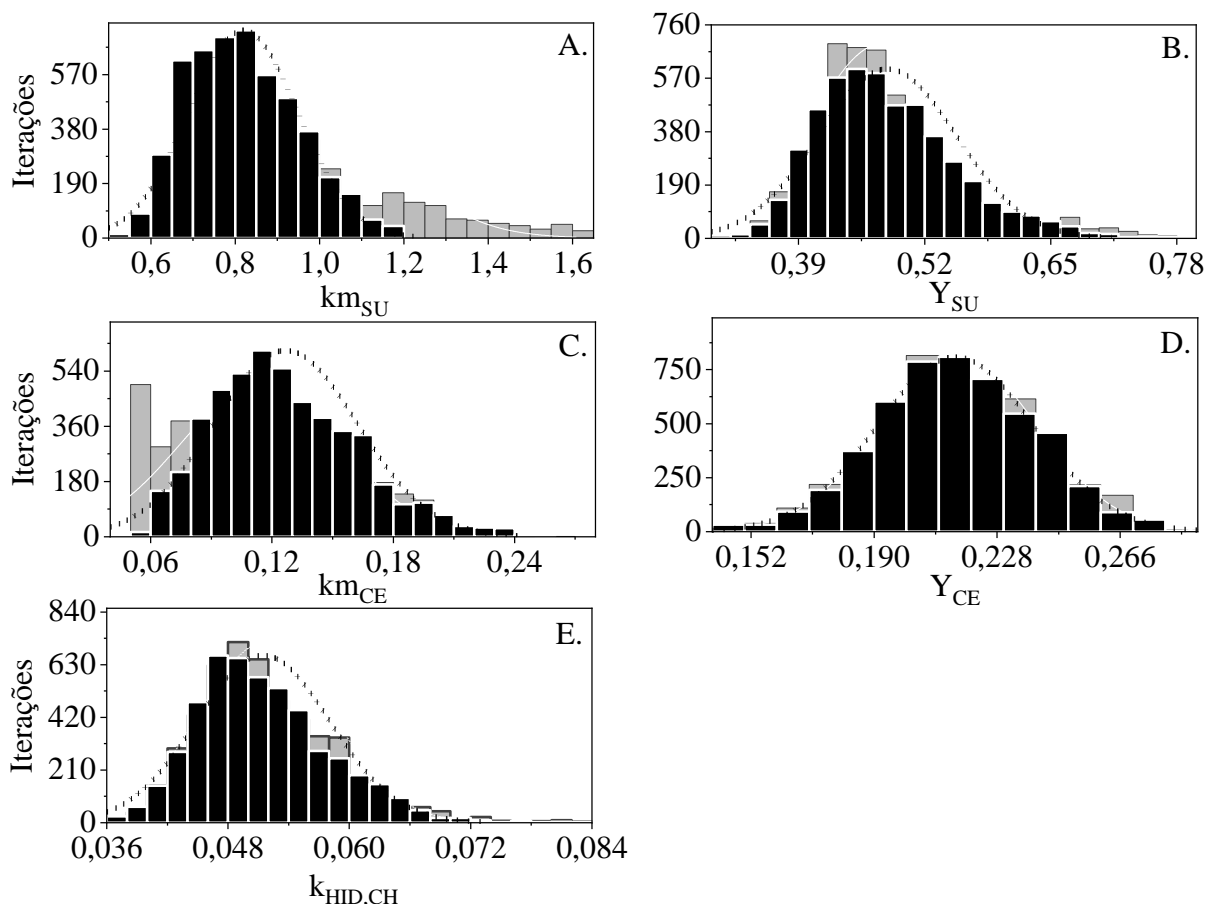
Figura 33. Distribuição dos 5.000 valores aceitos para compor as Cadeias de Markov das simulações do modelo 2X_ADM-CE/H2 (—) de valor inicial de fermentadores primários - $X_{\text{SU},0} 0,15 \text{ gDQO L}^{-1}$, comparadas ao modelo 2X_ADM-CE (—) nas mesmas condições iniciais



Os gráficos de distribuição para o atual modelo 2X_ADM-CE/H2 mostram os valores dos parâmetros livres aceitos pelo método de inferência Bayesiana comporem a cadeia de Markov (Figura 33). Ter adotado um referencial da literatura para os parâmetros K_{SU} e K_{CE} mostrou-se de grande utilidade para a determinação de parâmetros por MCMC obtendo-se

soluções mais rapidamente e com melhores indicadores de convergência, inclusive em relação ao modelo anterior 2X_ADM-CE, convergindo cerca de 1 h mais rápido.

Figura 34. Histogramas do modelo 2X_ADM-CE/H₂ (■) com respectiva distribuição normal dos dados para o valor inicial de fermentadores primários ($X_{SU,0}$) 0,15 gDQO L⁻¹, comparado ao modelo 2X_ADM-CE (▨) nas mesmas condições iniciais para determinação dos parâmetros livres



No geral, pode-se observar que a não consideração de fenômenos de transferência de massa para o H₂ não implicou em grandes alterações nas distribuições dos valores aceitos para os parâmetros. O parâmetro da hidrólise de carboidratos apresentou as menores variações entre todos os parâmetros, e mesmo assim, foram verificados menores valores de convergência (Figura 34 E, e Tabela 25). Os demais parâmetros: km_{SU} ; Y_{SU} ; e Y_{CE} , mostram-se distribuídos de forma similar ao observado no modelo anterior, porém com um valor de diagnóstico de convergência superior para Y_{SU} (Figura 34 A, B e D). Visualmente, apenas o parâmetro km_{CE} apresenta picos menores de valores comparado ao modelo anterior (Figura 34 C). Estes

apontamentos mostram mais uma vez a importância de se pautar as tomadas de decisão tendo pelo menos um método de diagnóstico de convergência como indicador (SAHLIN, 2011).

Da mesma forma que ao modelo anterior, a escolha da condição inicial de concentrações iniciais de biomassa foi baseada na condição que apresentou menor MRSE. Portanto, serão apresentados os resultados de MCMC para a condição inicial de $X_{SU,0}$ de 0,15 gDQO L⁻¹. Portanto, em seguida, serão apresentadas outras informações acerca desta escolha como, histogramas (Figura 34) e correlações encontradas (Figura 34 e Tabela 25).

A distribuição na forma de histogramas dos pontos aceitos para compor as Cadeias e Markov facilita a visualização de valores que se distanciaram da média e sua frequência dessas ocorrências. Estas distribuições não devem ser diretamente relacionadas ao diagnóstico de Geweke, como explicitado anteriormente. Em geral, o modelo 2X_ADM-CE/H2 apresentou histogramas mais simétricos que o modelo anterior, principalmente para os parâmetros que dizem respeito ao alongamento de cadeia. Visualmente, a distribuição dos valores de km_{SU} aproximaram-se mais de uma distribuição Normal, bem como km_{CE} e $k_{HID,CH}$ em relação aos modelos anteriores (Figura 34 A, C e E), apesar disso, ao parâmetro $k_{HID,CH}$ foi atribuído um valor inferior de convergência. Já os coeficientes de rendimento celular Y_{SU} e Y_{CE} apresentaram-se bem próximas às suas respectivas distribuições normais (Figura 34 B e D). Não obstante ao bom ajuste da distribuição de Y_{SU} a uma distribuição Normal, a este parâmetro também fora atribuído um valor inferior de diagnóstico de convergência. Fatos que vão ao encontro aos apontamentos de Solonen (2006) e Sahlin (2011) sobre a importância do uso de um diagnóstico de convergência.

Ao se analisar as correlações entre os parâmetros determinados e o modelo anterior 2X_ADM-CE, os parâmetros km_{CE} e Y_{CE} ainda apresentam forte correlação inversa entre si (- 0,8492, Tabela 24). Estes parâmetros exibem uma distribuição de correlação no formato de “banana” (Figura 35), formato comumente reconhecido em modelos não-lineares (BROWN; BERTHOUEX, 2002). Além disso, observou-se acréscimo na correlação entre os coeficientes de rendimento celular Y_{SU} e Y_{CE} , regredindo para uma média correlação inversa entre estes parâmetros (de - 0,7501 para - 0,7054, Tabelas 22 e 24, respectivamente). Observa-se também uma redução na correlação entre os parâmetros Y_{SU} e km_{CE} passando a ser baixa para este modelo (de 0,5041 para 0,4137, Tabelas 22 e 24, respectivamente). Novamente a forte correlação entre os parâmetros de alongamento de cadeia não os prejudicou ao serem determinados pelo método de MCMC, apresentando distribuições próximas à uma distribuição Normal. Entre os outros parâmetros foram obtidas médias e baixas correlações (Tabela 24).

Figura 35. Resultado das correlações entre as distribuições das médias dos valores determinados para as variáveis livres do modelo de duas biomassas desconsiderando a transferência de massa entre fases para determinação de parâmetros pelo método MCMC

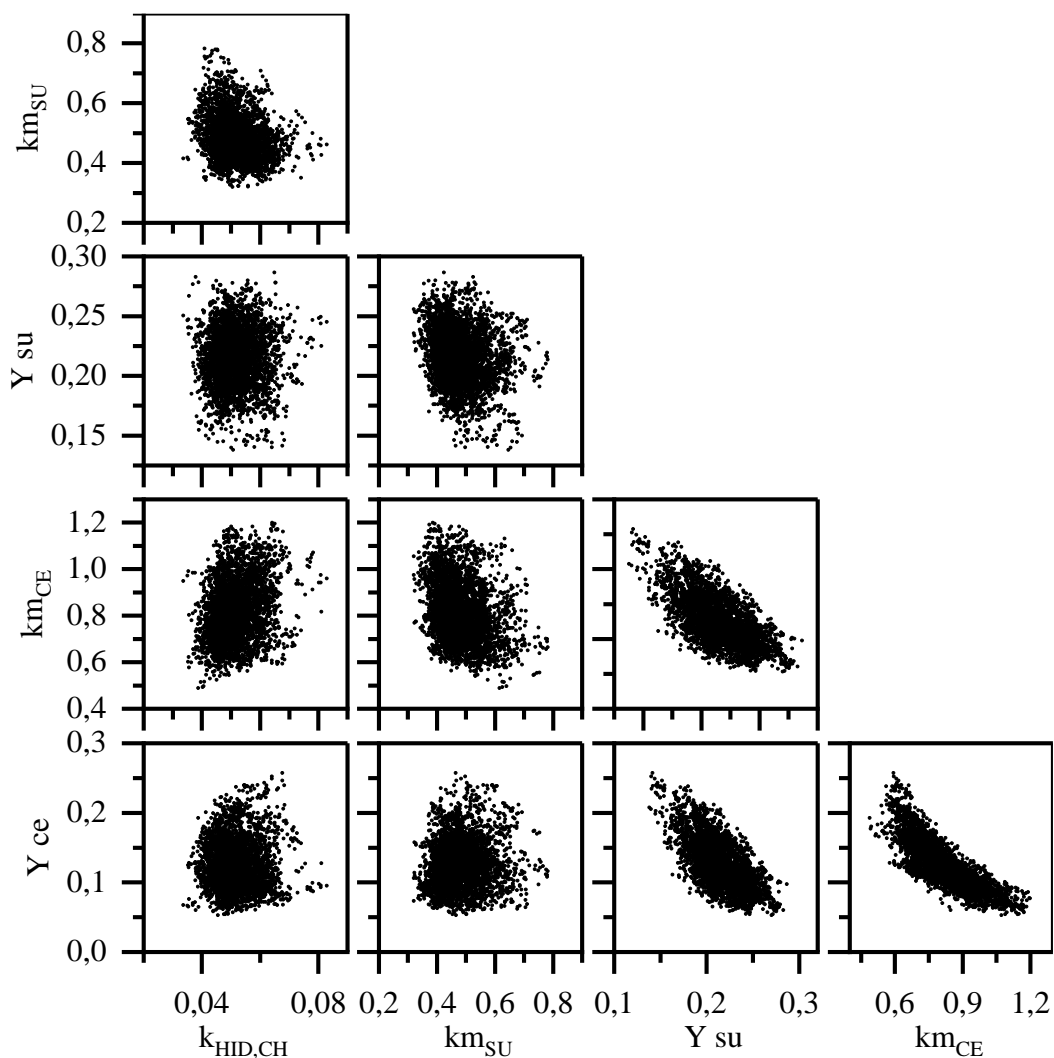
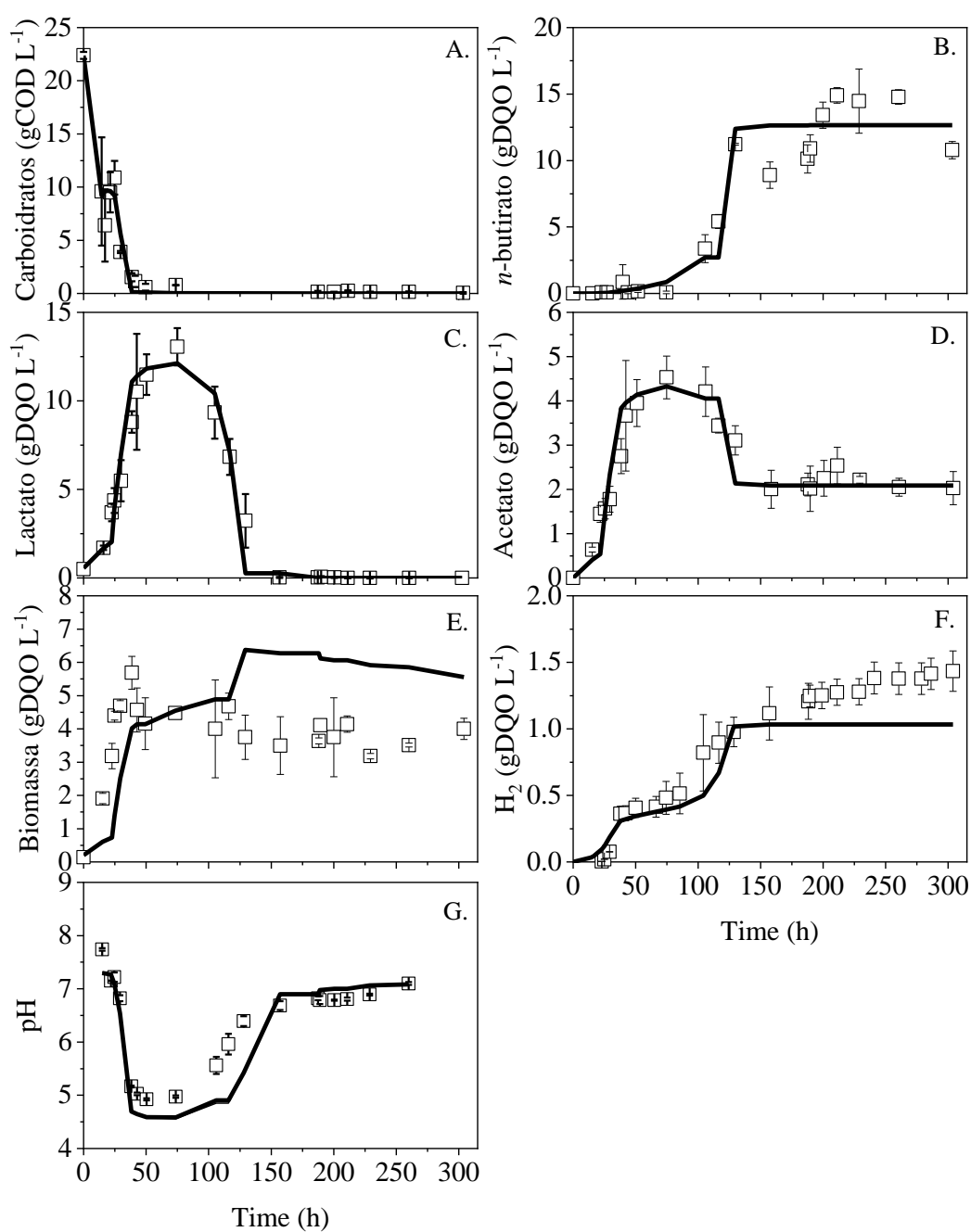


Tabela 24. Resultado do teste de análise de correlação para modelo de duas biomassas desconsiderando a transferência de massa entre fases para simulação MCMC

	$k_{HID,CH}$	k_{mSU}	Y_{SU}	k_{mCE}	Y_{CE}
$k_{HID,CH}$	1,0000				
k_{mSU}	-0,2817	1,0000			
Y_{SU}	0,1043	-0,2634	1,0000		
k_{mCE}	0,1642	-0,3418	0,4137	1,0000	
Y_{CE}	0,0057	0,1206	-0,7054	-0,8492	1,0000

Tendo determinado os parâmetros necessários para a simulação do modelo 2X_ADM-CE/H2, prosseguiu-se com a simulação para obtenção dos perfis temporais dos metabólitos carboidratos, *n*-butirato, acetato, lactato, H₂, além do crescimento de biomassa total (X_{SU} e X_{CE}) e variações de pH (Figura 36).

Figura 36. Comparativo de resultados entre dados experimentais (□) obtidos por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019) com suas respectivas barras de erro e do modelo de duas biomassas desconsiderando a transferência de massa entre fases (—)

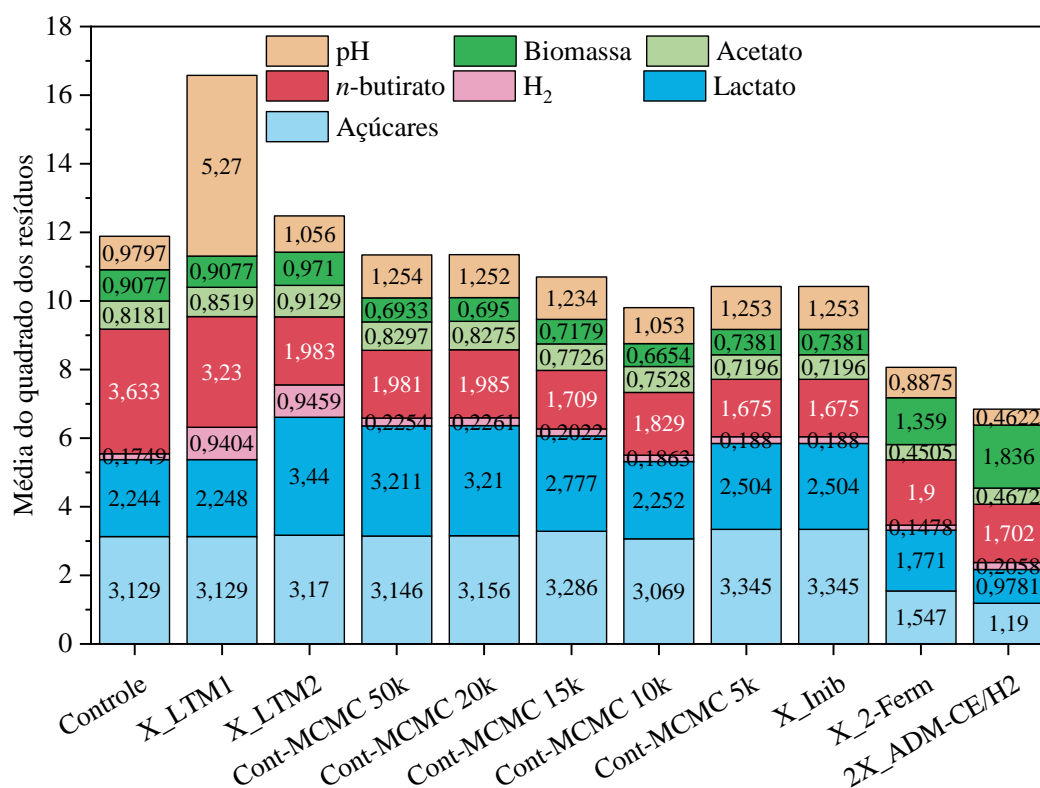


O modelo 2X_ADM-CE/H2 apresentou bom ajuste aos dados experimentais. O comportamento do modelo durante a primeira etapa de fermentação foi muito semelhante ao modelo 2X_ADM-CE (Figura 36). Notadamente, o presente modelo mostra melhor ajuste aos dados de H₂, permitindo a visualização dos patamares de produção deste metabólito. O patamar de fermentação primária apresentou rendimentos até 50 h, momento em que já se observa a depleção do substrato primário (carboidratos) (Figura 36 A e F). Até este momento cerca de 88% da concentração total de H₂ obtida experimentalmente foi predita. De 50 a 75 h, observa-se o início do patamar secundário, período no qual os fermentadores secundários passam pela fase de adaptação e experimentam os menores níveis de inibição competitiva pela concentração e carboidratos. A partir de 75 h até em torno de 125 h o modelo apresentou alta produção de H₂, recuperando 94% do H₂ obtido experimentalmente neste período, além de apresentar mais um pico de síntese celular, levando o modelo superar a concentração de biomassa obtida experimentalmente (Figura 36 G e H). Além das considerações sobre os valores obtidos para H₂, o modelo 2X_ADM-CE/H2 (Figura 36 F) comportou-se de maneira similar ao 2X_ADM-CE (Figura 31 F).

5.3 Comparativo entre os modelos de melhor ajuste

Com base nos resultados obtidos até então, selecionou-se os modelos que implicaram em menores valores nas somatórias de RMSE a fim de compará-los entre si e aos dados obtidos experimentalmente por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019). Decidiu-se excluir o modelo 2X_ADM-CE, apesar de apresentar menores valores de RMSE, pois ao considerar limitações nos mecanismos de transferência de massa, não apresentou resultados significativos nas simulações de H₂. Para os modelos considerando apenas uma biomassa será apresentada uma tabela comparativa de RMSE. Para o modelo 2X_ADM-CE/H2 utilizou-se o de concentração inicial de 0,15 gDQO L⁻¹ de fermentadores primários (Figura 37).

Figura 37. Gráfico de barras comparativo das médias dos quadrados dos resíduos dos modelos considerando apenas uma biomassa fermentadora para carboidratos e lactato



Nota: Unidades de média do quadrado dos resíduos para açúcar, lactato, acetato, *n*-butyrato, biomassa e H₂ expressas em gCOD L⁻¹, enquanto pH é adimensional. Fonte: o autor.

De acordo com o somatório de RMSE na Figura 36 dos modelos considerando apenas uma biomassa, Cont-MCMC 5k iterações e X_Inib foram os modelos que apresentaram menor erro. Para estes modelos os componentes de maior impacto na somatória de RMSE são as concentrações de carboidratos, lactato e *n*-butirato. Já para o modelo 2X_ADM-CE/H2 os parâmetros relacionados aos carboidratos, lactato e biomassa são aqueles que implicam nos maiores incrementos RMSE do modelo. Nota-se que o modelo 2X_ADM-CE/H2 apresenta menos da metade do RMSE decorrente de carboidratos e lactato em relação aos seus concorrentes Cont-MCMC 5k iterações e X_Inib. No entanto, em relação a concentração de biomassa do modelo 2X_ADM-CE/H2, o RMSE mostra-se superior ao dobro dos valores encontrados para Cont-MCMC 5k iterações e X_Inib.

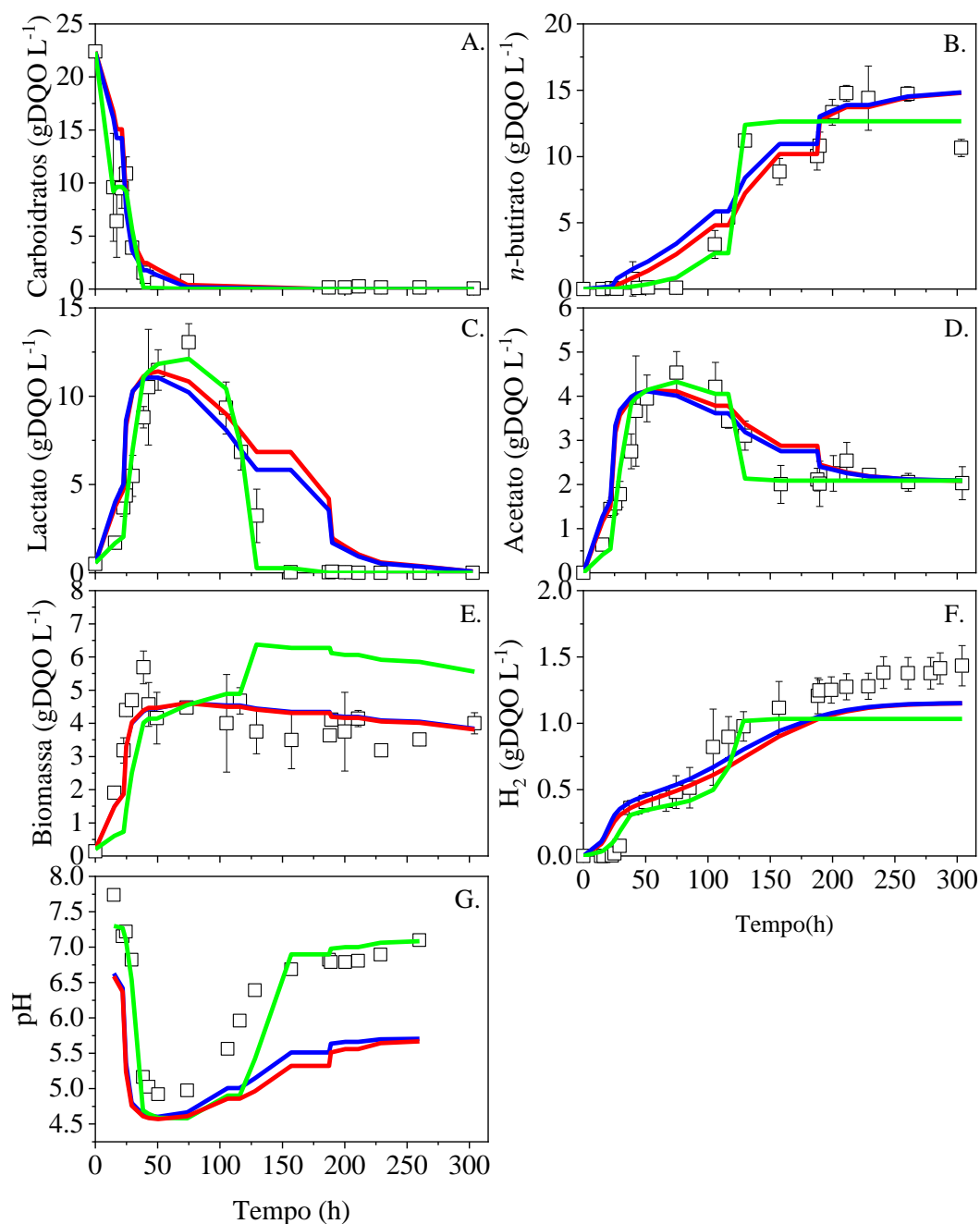
Os parâmetros determinados pelo método de MCMC para os modelos escolhidos estão dispostos na Tabela 25. Organizou-se também o comportamento temporal dos modelos Cont-MCMC 5k, X_Inib e 2X_ADM-CE/H2 para a concentração inicial de X_{CE} de 0,15 gDQO L⁻¹ (Figura 38).

Tabela 25. Resumo dos parâmetros obtidos no presente estudo pelo método de Monte Carlo Cadeias de Markov dos modelos eleitos como melhores ajustes às bateladas experimentais conduzidas por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019)

Parâmetros do modelo	Blanco, Oliveira e Zaiat (2019)	Presente estudo			Unidade
		Cont-MCMC-5k	X_Inib	2X_ADM-CE/H2	
$k_{HID,CH}$	-			0,05±0,01	h^{-1}
$k_{m_{SU}}$	3,62	3,09±0,84	2,95±0,82	0,481±0,07	h^{-1}
$K_{S_{SU}}$	76	70,8±20,7	71,41±21,54	0,5	$gDQO L^{-1}$
Y_{SU}	0,17	0,21±0,02	0,21±0,02	0,21±0,02	$gCOD g^{-1}COD$
$X_{SU,0}$	0,20	0,20	0,20	0,15	$gDQO L^{-1}$
$k_{m_{Lac/CE}}$	0,030	0,03±0,01	0,04±0,01	0,62±0,07	h^{-1}
$K_{S_{Lac/CE}}$	0,82	4,02±2,88	4,15±2,83	0,82	$gCOD L^{-1}$
Y_{CE}	-	-		0,13±0,04	$gCOD g^{-1}COD$
$X_{CE,0}$	-	-	-	0,05	$gDQO L^{-1}$

Legenda: $k_{HID,CH}$, constante de hidrólise de carboidratos; $K_{m_{SU}}$, constante de velocidade máxima de consumo de açúcares; $K_{S_{SU}}$ constante de meia saturação do consumo de açúcares; Y_{SU} taxa de crescimento celular pelo consumo de açúcar; $X_{SU,0}$ concentração inicial de fermentadores primários; $k_{m_{Lac/CE}}$ velocidade máxima de consumo de lactato/para alongamento de cadeia; $K_{S_{Lac/CE}}$ constante de meia saturação do consumo de lactato/para alongamento de cadeia; Y_{CE} taxa de crescimento celular pelo consumo de lactato para alongamento de cadeia; e $X_{CE,0}$ concentração inicial de fermentadores secundários para alongamento de cadeia. Fonte: o autor.

Figura 38. Comparativo entre os modelos desenvolvidos neste trabalho que apresentaram melhor ajuste aos dados experimentais (\square) de Blanco, Oliveira e Zaiat (2019). Com — X_Inib, — Cont-MCMC 5k iterações e — 2X_ADM-CE/H2



Fonte: adaptado de Blanco, Oliveira e Zaiat (2019).

A etapa de hidrólise de carboidratos é considerada desde o desenvolvimento do ADM1 como um importante processo na modelagem de sistemas anaeróbios (BATSTONE *et al.*, 2002). Desde então, diversos autores indicam a realização desta etapa na modelagem desde águas residuárias complexas (MANI; SUNDARAM; DAS, 2016), modelos com enfoque na

produção de H₂ (PEIRIS *et al.*, 2006; GADHAMSHETTY *et al.*, 2010), modelos que visem a produção de H₂ a partir de soro de leite (MONTECCHIO; YUAN; MALPEI, 2018) e também que visem a produção de ácidos orgânicos (B-ARROYO *et al.*, 2020). No entanto, alguns autores omitem a utilização desta etapa, focando apenas na questão de síntese de produtos de interesse, principalmente em modelos que considerem estequiometria variável (RODRÍGUEZ *et al.*, 2006; PENUMATHSA *et al.*, 2008; ANTONOPOULOU *et al.*, 2012).

A inclusão desta etapa no modelo 2X_ADM-CE/H2 mostrou uma redução de mais da metade de RMSE de carboidratos do que os modelos que não a consideravam. Em relação à estimativa de parâmetros, o valor determinado para a constante de hidrólise de carboidratos apresentou valor de $0,05 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ (Tabela 25), cerca de 10 vezes menor do que aqueles encontrados na literatura (BATSTONE *et al.*, 2002; MONTECCHIO; YUAN; MALPEI, 2018). Outros autores que trabalharam exclusivamente com hidrólise em sistemas anaeróbios determinaram valores desta constante de $0,0001 \text{ h}^{-1}$ até $0,008 \text{ h}^{-1}$ para sistemas termofílicos envolvendo carboidratos (CHRIST *et al.*, 2000). Posteriormente, Vlyssides e colaboradores (2012) determinaram a constante hidrolítica de reator piloto UASB tratando soro de leite da produção de queijos, e determinaram após a etapa anaeróbia a constante hidrolítica na ordem de $0,00015 \text{ h}^{-1}$. Portanto, pode-se dizer que a constante de hidrólise de carboidratos apresenta valores diferentes para cada tipo de sistema.

As curvas de consumo de carboidratos dos modelos Cont-MCMC 5k iterações e X_Inib podem ser observadas na Figura 38 A. Enquanto ambos modelos apresentam altas taxas de consumo de carboidratos, se observa o atraso no consumo deste metabólito por ambos modelos em relação aos dados experimentais. A consideração de hidrólise de carboidratos no modelo 2X_ADM-CE/H2 permitiu desvincular a constante de hidrólise de carboidratos ($k_{\text{HID,CH}}$) da velocidade máxima de consumo de açúcares de Monod (k_{MSU}). No início das simulações, isto permitiu que o método MCMC fosse direcionado para redução do erro entre os metabólitos primários acetato e lactato, os quais apresentaram curvas de síntese mais justas (Figura 38 C e D). O modelo que atingiu valores mais próximos aos picos de concentração de ambos metabólitos ($4,5$ e 12 gDQO L^{-1}), respectivamente foi o 2X_ADM-CE/H2. Acredita-se que estes valores tenham sido alcançados devido à inclusão tanto de inibição da biomassa fermentadora secundária X_{CE} por concentrações de carboidratos quanto pela redução da concentração inicial de biomassa que conduziria o consumo de acetato e lactato.

O acúmulo de ácidos orgânicos em sistemas anaeróbios decorrente da etapa fermentativa de carboidratos é responsável pela queda inicial de pH do meio. Em sistemas fermentando soro de leite, o etanol e os ácidos acético e láctico são comumente acumulados,

devido à ocorrência de fermentação homolática e/ou heterolática e a composição do microbioma (CASTELLÓ *et al.*, 2009; DAVILA-VAZQUEZ *et al.*, 2009; ASUNIS *et al.*, 2019; B-ARROYO *et al.*, 2020). Logo nos momentos iniciais das bateladas experimentais a síntese de lactato foi muito mais intensa, rendendo cerca de 3 vezes mais a concentração de acetato. Esta proporção entre ácidos orgânicos implicou diretamente na queda acentuada do pH, uma vez que o lactato (pKa 3,86) apresenta maior poder acidificante que o acetato (pKa 4,74). Além disso, durante a fermentação da lactose em ácido acético dióxido de carbono é produzido. O qual apresenta-se na forma de bicarbonato (pKa 6,3) em condições ácidas, contribuindo para o tamponamento do meio (Tabela 26). Este padrão perdurou até que todo carboidrato do sistema fosse consumido cessando a fermentação primária, em torno de 50 e 75 h (Figura 38 C e D).

Tabela 26. Principais reações ocorridas na fermentação de soro de leite

	^a ΔG _R
Hidrólise	
$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$	-87.2
Fermentação primária	
¹ $C_6H_{12}O_6 + 4H_2O \rightarrow 2C_2H_3O_2^- + 2HCO_3^- + 4H^+ + 4H_2$	-203.82
² $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_3H_5O_3^- + 2H^+$	-194.31
Fermentação secundária	
³ $C_3H_5O_3^- + 2H_2O \rightarrow C_2H_3O_2^- + H^+ + 2H_2 + HCO_3^-$	-4.75
⁴ $C_3H_5O_3^- + C_2H_3O_2^- \rightarrow C_4H_7O_2^- + HCO_3^-$	-53.0

¹fermentação heterolática, ²fermentação homolática, ³β-oxidação reversa e ⁴ciclo de alongamento de cadeia de lactato como doador de elétrons e acetato (reação global). Nota: Energia livre de Gibbs (ΔG) expressa em kJ mol⁻¹ os cálculos foram realizados de acordo com os parâmetros pré-estabelecidos por Kleerebezem e Van Loosdrecht (2010) em pH 7.0 e temperatura em 25°C.

Com altas concentrações de lactato e acetato no meio e um pH em torno de 5,0, o microbioma presente nas bateladas teria de se adaptar a fim de prolongar sua existência. Culturas mistas por serem mais diversos e versáteis apresentam comumente a capacidade de realizar fermentação de carboxilatos (englobando tanto a forma ácida dos ácidos carboxílicos quanto à forma dissociada). Esta fermentação secundária, é a busca por obtenção de energia para manutenção celular e crescimento, seguida da síntese de metano até carboxilatos de cadeia alongada, fruto do metabolismo celular (SPIRITO *et al.*, 2014). Foi identificado que o pH

(abaixo de 6) é um dos principais direcionadores de rotas metabólicas tratando-se do alongamento de cadeia cujo principal doador de elétrons é o lactato (CANDRY et al., 2020).

Esses apontamentos vão ao encontro do observado no trabalho de Blanco, Oliveira e Zaiat (2019) que durante suas bateladas observaram a recuperação do pH até a neutralidade durante a síntese de *n*-butirato. No entanto, o principal causador do término do alongamento de cadeia neste caso foi a depleção do doador de elétrons lactato. No trabalho realizado por Perna e colaboradores (2013), no qual Blanco, Oliveira e Zaiat (2019) se basearam, foi observado a estagnação da síntese de *n*-butirato nos períodos em que houveram problemas com controle do pH. No entanto, com a manutenção do pH em torno de 6,0 nas etapas seguintes e com o aumento da carga orgânica, as concentrações de lactato e acetato passaram a apresentar baixos valores no meio, enquanto a concentração de *n*-butirato e a recuperação de H₂ mostravam-se elevadas.

O processo de alongamento de cadeia de acetato para *n*-butirato observado no trabalho de Blanco, Oliveira e Zaiat (2019) implicou na alcalinização do meio, recuperando o valor de pH de 5 até gradativamente 7 (Figura 38 G). Acredita-se que o consumo dos ácidos acético (pKa 4,74) e láctico (pKa 3,86) durante o alongamento de acetato a *n*-butirato (pKa 4,82) tenha sido o principal fator de alcalinização do meio. No entanto, Cavalcante e colaboradores (2017) sugerem que além da recuperação de H₂ contido nas moléculas de lactato, a fermentação secundária apresenta a capacidade de fornecer alcalinidade ao meio na forma de bicarbonato. Estes ânions são resultantes do processo de β -oxidação reversa de lactato à acetato, e posteriormente no ciclo de alongamento de acetato à *n*-butirato (Tabela 26).

Eventos similares aos observados no trabalho de Blanco, Oliveira e Zaiat (2019) foram identificados na literatura. Matsumoto e Nishimura (2007) realizaram bateladas experimentais de 48 h com culturas puras de *C. diolis* a fim de identificar temperatura e pH ótimos para obtenção de maiores rendimentos de H₂. No entanto, o planejamento experimental empregado pelos autores não levou em conta o efeito de uma variável na outra. Ou seja, determinaram primeiro o pH ótimo de 6,8 e depois a partir deste pH fizeram bateladas em diferentes temperaturas variando de 25°C até 60°C, até obterem 40°C como temperatura ótima. A partir dos parâmetros considerados ótimos para operação, obtiveram o perfil temporal semelhante, no qual observa-se inicialmente altas concentrações de lactato e acetato, e ao decorrer do experimento ambos são consumidos para a síntese de *n*-butirato e H₂. Inclusive o pH se comporta de maneira semelhante, com queda inicial durante a fermentação de 6,8 até em torno de 6, seguido de alcalinização até próximo de 7,0, acompanhando a curva de síntese de *n*-butirato. No entanto, diferentemente de Blanco, Oliveira e Zaiat (2019), o fator limitante das reações foi a concentração do receptor de elétrons acetato. Além disso, por se tratar de cultura

pura, *C. diolis* mostrou mais afinidade para a realização de alongamento de cadeia do que para o consumo dos carboidratos presentes na cultura, como foi observado ao realizarem bateladas com o meio contendo apenas acetato e lactato (MATSUMOTO; NISHIMURA, 2007).

Contreras-Dávila e colaboradores (2020) investigaram a síntese de *n*-butirato por alongamento de cadeia durante bateladas e bateladas alimentadas utilizando restos de alimentos como substrato. O pH do meio foi ajustado apenas no início das bateladas. Foi observado durante as bateladas alimentadas que enquanto houvesse produção de *n*-butirato o pH sofria incrementos (de 4,7 para 5,2, dados dos autores). Durante a batelada o pH inicial era de 7,0 e decrescia durante o consumo de carboidratos e concomitante à produção de lactato até em torno de 4,8. Quando se notava a produção de *n*-butirato o pH também sofria alterações em direção à alcalinização (5,2 novamente), confirmando a capacidade de rebalancear o pH do meio pelo alongamento de cadeia.

A predição da síntese de H₂ pelos modelos foi bastante similar. Pode-se observar que a introdução da inibição aos modelos X_Inib e 2X_ADM-CE/H2 não mostrou melhor ajuste na fase inicial das simulações (Figura 38 F). Isto se deve ao fato de a síntese inicial de H₂ ser proveniente da fermentação primária, devido à predominância da fermentação heterolática. Desta forma, todo H₂ inicial pode ser atribuído à síntese de acetato (Tabela 30). No entanto ao se comparar os modelos, X-Cont-5k e X_Inib contra 2X_ADM-CE/H2, nota-se que este último foi capaz de se ajustar melhor aos dados experimentais, fator que pode ser atribuído à inclusão de hidrólise ao modelo, por não haverem diferenças nos valores de erro do modelo 2X_ADM-CE/H2 variando concentração de biomassa inicial (Figura 38 E).

Asunis e colaboradores (2019) identificaram o pH do meio como o mais importante fator determinante das rotas metabólicas durante a fermentação do soro de leite quando se busca altos rendimentos de H₂. Os autores identificam que durante o consumo de carboidratos, a rota metabólica que melhor oferece essas condições é a acetogênica em pH 6,0. No entanto, considerando águas residuárias como o CW que já possuem uma microbiota autóctone, a síntese de outros ácidos orgânicos como o lactato, pode ser favorecido, reduzindo os rendimentos de H₂ do sistema. Mas o direcionamento da fermentação para a fermentação secundária, onde há o consumo de lactato para síntese de acetato, promovendo a recuperação do H₂ não obtido na primeira etapa fermentativa.

De Gioannis e colaboradores (2014) estudaram a fermentação de duas CW submetidas a variados tratamentos de pH. Os autores observaram que a síntese de H₂ pela fermentação primária sofre grande variação de acordo com o pH do meio e a quantidade de carboidratos disponível. Portanto a CW que apresentava maiores concentrações de carboidratos, também

apresentou maiores rendimentos de H₂ em pH de 6,5. Em seguida, os autores analisaram o perfil de ácidos dos reatores estudados, e observaram grandes produções de *n*-butirato e acetato justamente nos reatores que apresentaram maiores rendimentos de H₂. No entanto, nada pôde ser verificado em relação a participação do lactato nestes eventos pois o perfil de ácidos não compreendia o lactato.

Outro fator a ser levado em conta na comparação dos modelos é o crescimento de biomassa. Os modelos X_Cont-5k e X_Inib apresentaram menores RMSE referentes a biomassa, mesmo não atingindo o valor máximo de concentração microbiana medido em SSV e convertidos em DQO. O modelo desenvolvido por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019) também apresentou valores subestimados nas simulações de crescimento microbiano. Os autores empregaram apenas uma população microbiana, adotando o valor de Y_{SU} de 0,17 gCOD g⁻¹COD, de acordo com literatura (BATSTONE *et al.*, 2002). Eles sugeriram que, ao se adotar um valor de literatura, e não ter incluído no modelo outros metabólitos minoritários que participariam do metabolismo microbiano, foram os principais fatores que impossibilitaram um bom ajuste do modelo proposto.

O presente trabalho estimou diversas vezes os fatores de crescimento celular por MCMC, mas não considerou outros metabólitos que pudessem ser responsáveis pelo crescimento microbiano nas primeiras horas de fermentação, como o caso de gorduras e proteínas, outros constituintes do soro de leite reconstituído. Os valores obtidos para Y_{SU} foram superiores aos utilizados por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019), porém a velocidade máxima de consumo de carboidratos (k_{MSU}) também determinada por MCMC e os resultados obtidos foram bastante inferiores, principalmente devido ao fato de incluir-se hidrólise nos modelos e 2X_ADM-CE/H2 (Tabela 27).

O modelo 2X_ADM-CE/H2 compreende o crescimento de duas biomassas independentes de fermentadores primários e secundários. Enquanto nas primeiras horas de fermentação as fermentadoras primárias se destacam com altas taxas de crescimento e em seguida assumem a fase de morte celular, as fermentadoras secundárias se adaptam para realizar o alongamento de cadeia. Então, a partir de 75 h, elas já apresentam um lento crescimento até cerca de 100 h, em que as fermentadoras secundárias exibem as maiores velocidades de crescimento celular (Figura 38 E). Este segundo pico de crescimento celular implicou no aumento do RMSE do modelo 2X_ADM-CE/H2. Diferentemente dos autores Gadhamshetty e colaboradores (2010) e Blanco, Oliveira e Zaiat (2019), optou-se por considerar o crescimento celular dos microrganismos alongadores de cadeia. Uma vez que Matsumoto e Nishimura (2007) observaram crescimento celular assim que H₂ era produzido em seu meio de cultura pura

de *C. diolis*. Weimer e Moen (2013) obtiveram taxas de crescimento celular de *M. elsdenii* tanto em meio contendo apenas lactose quanto em glucose, e os valores de velocidade máximas de crescimento celular foram semelhantes em ambos os casos. Diez-Gonzalez, Russell e Hunter (1995) observaram o crescimento de *C. acetobutylicum* P262 adaptados ao crescimento tanto em glicose quanto em lactato e acetato, sendo que neste último meio o pH de 6,2 foi determinado como ótimo para o desenvolvimento destes microrganismos. Em todos os trabalhos citados acima foram utilizadas culturas puras de microrganismos capazes de fermentar acetato e lactato e sintetizar *n*-butirato e H₂ a partir desses metabólitos.

No estudo realizado por Perna e colaboradores (2013), reiterando, no qual Blanco, Oliveira e Zaiat (2019) se basearam, foram determinados por T-RFLP (do inglês, *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*, método molecular, independente de cultivo, para análise de comunidades microbianas) os gêneros *C. beijerinckii* e *C. tyrobutyricum* capazes de sintetizar acetato e *n*-butirato. Porém, os autores não levaram em conta as necessidades dos microrganismos capazes de realizar alongamento de cadeia durante o preparo dos substratos para o isolamento destas culturas em bateladas. Portanto, obtiveram como resultado das sínteses em PCR os microrganismos capazes de fermentar lactose.

Há de se considerar que as medidas de sólidos suspensos voláteis estão sujeitas a erros experimentais. A tomada de pequenos volumes amostrais somado ao fato de a biomassa observada nos experimentos de Blanco, Oliveira e Zaiat (2019) ter sido floculenta podem ter sido responsáveis pelos grandes desvios padrões observados nos dados experimentais, chegando em alguns momentos a 1,49 gDQO L⁻¹, cerca de 36% do valor médio (usou-se fator de conversão de SSV para DQO). Münch e Pollard (1997) sugerem a utilização de um método eficaz para contagem de células após tingimento com marcador fluorescente e o uso de um fator para conversão dos resultados em base de DQO. Desta forma, os autores sugerem que a contagem de células seja mais fidedigna para avaliação de biomassa ativa, principalmente em experimentos realizados em bateladas.

Ao buscar a representatividade da biomassa nos trabalhos envolvendo modelagem de sistemas anaeróbios baseadas em ADM1, notou-se que a maioria deles busca estimar taxas de crescimento microbiano a partir do consumo de metabólitos (PEIRIS *et al.*, 2006; ANTONOPOULOU *et al.*, 2008; PENUMATHSA *et al.*, 2008; DANIELSSON, 2014; SATPATHY *et al.*, 2016b). Outros autores, como Xu (2019), baseiam-se nos valores experimentais de biomassa para calibrarem seus modelos. Este autor utilizou-se do método estocástico de Monte Carlo para predizer o comportamento da dinâmica de biomassa de seu sistema em escala industrial. Os resultados mostraram superestimação da concentração da

população de microrganismos ao longo do tempo de operação. Rodríguez e colaboradores (2006) sugerem que os modelos baseados em ADM1, para se mostrarem mais preditivos, deveriam seguir o modelo de estequiometria variável. E em relação aos objetivos do modelo, uma vez que se almeja a determinação de biomassa, o modelo deve estar delineado para essa necessidade.

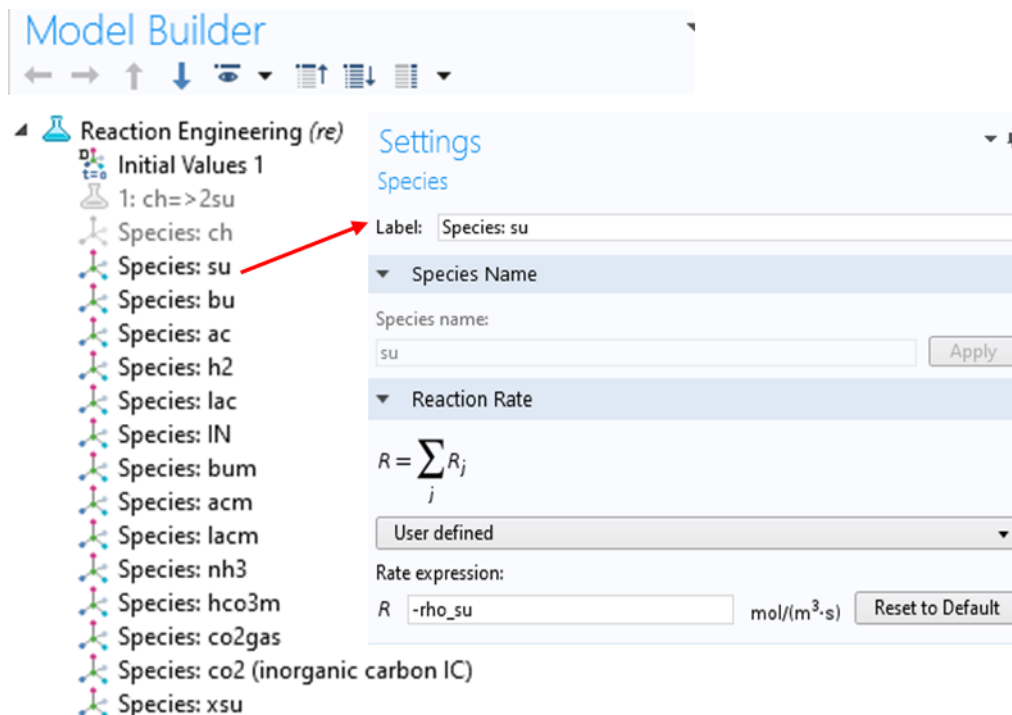
5.4 Adaptação dos modelos baseados em ADM1, X_Inib e 2X_ADM-CE/H2 no software COMSOL Multiphysics

Representou-se primeiramente o modelo desenvolvido em Matlab® para simulação das bateladas experimentais de Blanco, Oliveira e Zaiat (2019) antes de seguir-se com o acoplamento ao modelo CFD. A plataforma COMSOL Multiphysics® permite o desenvolvimento de modelos do tipo batelada no módulo de Engenharia de Reações Químicas. Desta forma, caso se obtivesse sucesso na simulação destes modelos, a calibração dos modelos seria realizada no próprio COMSOL Multiphysics®, facilitando o acoplamento ao modelo que considera CFD.

5.4.1 COMSOL Multiphysics®, simulação do modelo Cont-MCMC-5k e X_Inib em geometria 0-D

De modo a validar o cruzamento entre plataformas dos modelos desenvolvidos em Matlab® buscou-se representa-los no *software* comercial COMSOL Multiphysics®. Inicialmente, utilizou-se da interface física de engenharia de reações químicas e criou-se um modelo de geometria 0-D, ou seja, que trata apenas das reações de balanço químicas empregadas até agora, sem considerar equações de fluidodinâmica. Na interface de engenharia de reações químicas, os mesmos parâmetros cinéticos (determinados por MCMC, Tabela 25) de controle e operacionais, variáveis, equações cinéticas químicas e biológicas descritos nos modelos de Matlab® foram empregados. Estes foram dispostos nas abas próprias para parâmetros e variáveis. No caso das equações, estas foram tratadas como variáveis. Os valores iniciais de simulação foram alocados para a aba de valores iniciais disponível na interface de engenharia de reações químicas (Figura 39).

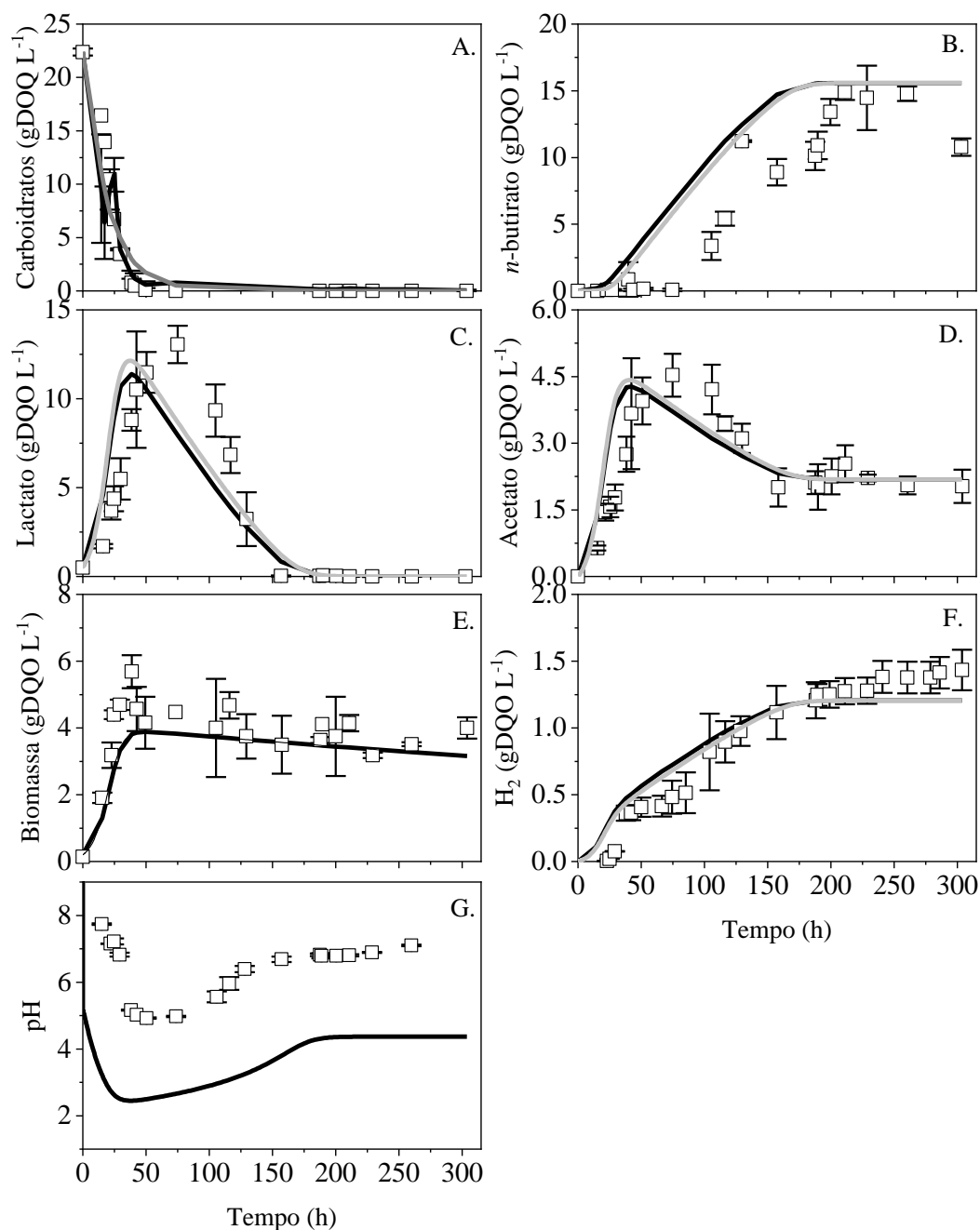
Figura 39. Ambiente de construção de modelos no COMSOL Multiphysics® para criação de espécies químicas que participaram das simulações do modelo X_Inib e designação de suas taxas de consumo/síntese



Fonte: adaptado de COMSOL Multiphysics®.

Na interface apresentada na Figura 39, solicita-se que cada componente do modelo seja inserido como uma espécie química. Por exemplo, carboidratos, atribuiu-se o nome de “su”, configurou-se a espécie como componente de leito e definiu-se a taxa de consumo de carboidratos “- rho_{SU}” com sinal negativo para indicar que era de consumo. O mesmo foi feito para os demais componentes do modelo. E por fim configurou-se o *solver* de equações que deu início as resoluções. O tempo de resolução dos modelos no COMSOL Multiphysics® não levou mais de um minuto. Os comparativos entre os modelos resolvidos neste *software* e os dados experimentais são mostrados na Figura 40.

Figura 40. Comparativo de resultados entre dados experimentais (\square) com suas respectivas barras de erro e os modelos adaptados para COMSOL Multiphysics®: Cont-MCMC-5k (\blacksquare), X_Inib desenvolvido em Matlab® (—)



Fonte: adaptado de Branco, Oliveira e Zaiat (2019).

A representação do modelo X_Inib no COMSOL Multiphysics® foi realizada com sucesso. No entanto, o modelo falhou ao tentar representar o cálculo de pH desconsiderando as equações referentes ao pH e inibição por pH (Figura 40 G). Inicialmente, acreditou-se que os erros pudessem estar ligados a constante de velocidade introduzida aos cálculos de balanço

entre espécies químicas k_{AB} , mas ao alterar-se estes valores, nenhuma mudança ocorria na curva de pH. Então, pelo fato de o pH calculado pelo modelo mostrar valores iniciais de 5,0, alterações nas concentrações iniciais dos ácidos foram realizadas, porém os resultados não mostraram sucesso. As reações de equilíbrio químico entre ácidos e seus íons não foi preditiva, levando o pH do sistema à valores abaixo de 3, implicando na inibição completa do sistema devido a equação de inibição por pH (Eq. 9). Até o momento não foi possível solucionar a questão do cálculo do pH, pelo menos não se mantendo a estrutura do ADM1, como é a proposta deste trabalho.

Os demais resultados das simulações foram comprometidos pela incapacidade de calcular-se o pH do sistema. Uma vez que as principais taxas de consumo e síntese de metabólitos são dependentes do fator de inibição por pH. Ao se comparar os resultados obtidos no COMSOL Multiphysics® (Figura 39) aos resultados obtidos em Matlab® (Figura 37), pode-se observar que as curvas dos metabólitos no COMSOL Multiphysics® são achatadas e mais se assemelham a retas, mostrando achatamento semelhante apenas nos términos das reações, nos períodos entre 25 e 50 h e entre 150 e 175 h (Figura 39).

Pode-se observar que os resultados obtidos no COMSOL Multiphysics® não apresentam os mesmos padrões dos resultados obtidos pelo modelo X_{Inib} , principalmente nos comportamentos das curvas de *n*-butirato, na qual apresentou formação antecipada do metabólito. Lactato, que durante a etapa de consumo mostrou-se acelerada para a formação de *n*-butirato e H_2 , sendo totalmente consumidos em apenas 200 h, uma vez que os resultados em Matlab mostram o consumo final de lactato em apenas 300 h. Biomassa apresentou crescimento inferior ao modelo X_{Inib} , não chegando a apresentar valores superiores a 4 gDQO L^{-1} (Figura 40 E). Por fim, H_2 também mostrou formação antecipada e até aproximadamente 175 h, a curva apresentou valores superiores aos dados experimentais, ao contrário do observado pelo modelo X_{Inib} (Figuras 37 F e 39 F).

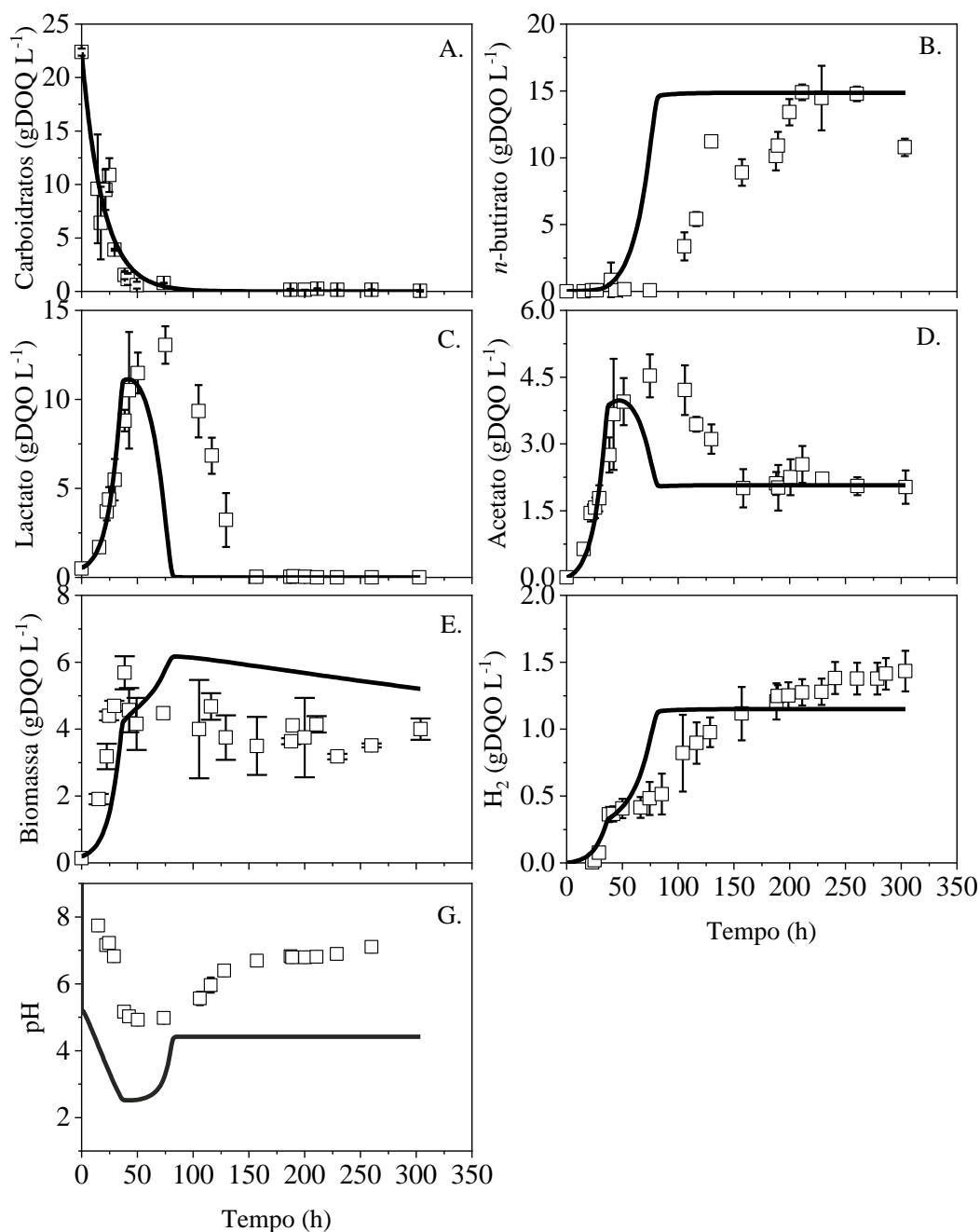
Apesar de ter sido configurado para representar tanto o modelo Cont-MCMC-5k quanto o modelo X_{Inib} desenvolvidos em Matlab®, nota-se que ambos apresentaram um comportamento bastante semelhante na plataforma COMSOL Multiphysics®. Desconsiderou-se a possibilidade de utilizar este modelo em COMSOL Multiphysics® para representação dos modelos baseados em ADM1 desenvolvidos na plataforma Matlab®.

5.4.2 COMSOL Multiphysics®, simulação do modelo 2X_ADM-CE/H2 em geometria 0-D

Buscou-se representar o modelo 2X_ADM-CE/H2 no *software* comercial COMSOL Multiphysics®. Inicialmente utilizou-se da interface física de engenharia de reações químicas e criou-se um modelo de geometria 0-D, desconsiderando neste primeiro momento as equações de fluidodinâmica. Na interface de engenharia de reações químicas, os mesmos parâmetros de controle e operacionais, variáveis, equações cinéticas químicas e biológicas descritos nos modelos de Matlab® foram empregados. Estes foram dispostos nas abas próprias para parâmetros e variáveis. No caso das equações, estas foram tratadas como variáveis. Os valores iniciais de simulação foram alocados para a aba de valores iniciais disponível na interface de engenharia de reações químicas.

Nesta interface, solicita-se que cada componente do modelo seja inserido como uma espécie química. Similarmente a representação do modelo X_Inib em COMSOL Multiphysics®, configurou-se as espécies químicas e atribuiu-se a umas suas respectivas taxas de consumo/produção. Incluiu-se as biomassas alongadoras de cadeia, X_{CE}, e as reações de hidrólise de carboidratos. Além disso foram mantidas todas as outras características do modelo X_Inib simulado anteriormente. Os parâmetros cinéticos empregados foram aqueles determinados por MCMC mostrados na Tabela 25 para o modelo 2X_ADM-CE/H2. Os resultados obtidos no COMSOL Multiphysics® para o modelo 2X_ADM-CE/H2 são mostrados na Figura 41.

Figura 41. Comparativo de resultados entre dados experimentais (\square) com suas respectivas barras de erro e do modelo 2X_ADM-CE/H2 adaptado para o COMSOL Multiphysics® (—) e modelo 2X_ADM-CE/H2 desenvolvido em Matlab® (—)



Fonte: adaptado de Branco, Oliveira e Zaiat (2019).

O modelo 2X_ADM-CE/H2 adaptado para COMSOL foi resolvido com sucesso. Apesar de não se conseguir representar o pH como nos modelos anteriores, as curvas de simulação apresentaram bons ajustes aos dados experimentais durante a fermentação primária, até 50 h. Por considerar-se mais pontos simulados no COMSOL, as curvas apresentam-se

levemente suavizadas em relação ao Matlab, o que pode ser visto com mais intensidade na curva referente aos carboidratos. Além disso, o substrato inicial de carboidratos mostrou bom ajuste aos dados experimentais e também em relação aos modelos resolvidos em Matlab® (Figura 41 A).

Em relação aos metabólitos acetato, lactato e *n*-butirato, suas curvas apresentaram bom ajuste apenas durante a fermentação primária, nos períodos entre 50 e 75 h. Porém em relação aos modelos resolvidos em Matlab®, os resultados no COMSOL Multiphysics® apresentaram menores valores de pico (Figura 41 B, C e D). Quando estes metabólitos passaram a ser consumidos, e sintetizado, no caso do *n*-butirato, pode-se observar grandes velocidades iniciais pela inclinação das curvas, mais uma vez mostrando a influência do pH nas reações do modelo.

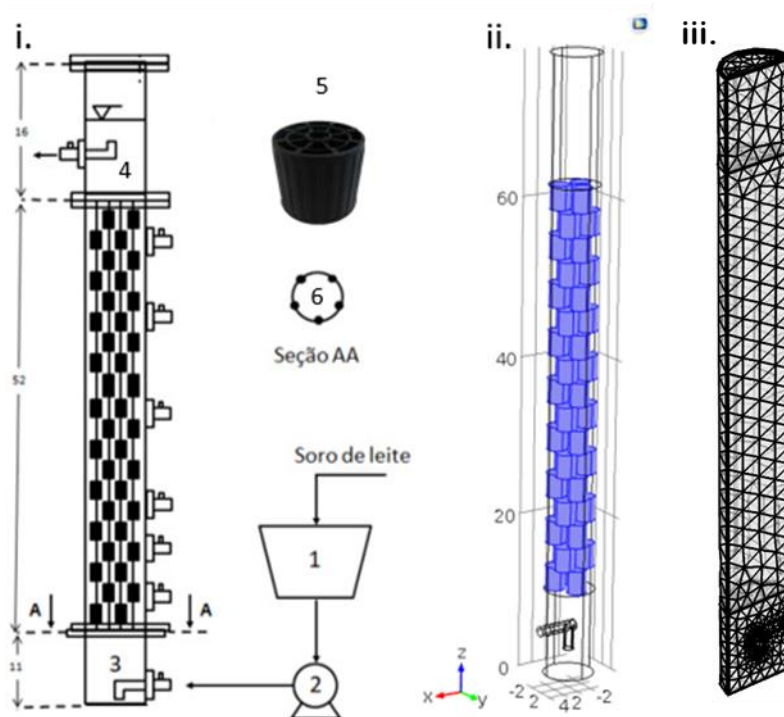
A curva de simulação de microrganismos mostra-se igualmente bem ajustada nos períodos iniciais até cerca de 50 h. E assim como observado nos metabólitos secundários, durante a fermentação secundária o modelo mostra um rápido crescimento celular até em torno de 75 h, momento que o doador de elétrons lactato foi totalmente consumido (Figura 41 E). A produção de H₂ sofreu os mesmos efeitos dos outros metabólitos e biomassa. Durante a fermentação primária apresentou curva bem ajustada aos dados experimentais e aos modelos resolvidos em Matlab®. No entanto, durante a fermentação secundária sem os efeitos da inibição por pH, a síntese de H₂ foi mais intensa, antecipando a curva de simulação (Figura 41 F).

Apesar de terem sido utilizados as mesmas condições iniciais e parâmetros cinéticos determinados por MCMC nos modelos solucionados pelo COMSOL, não se sabe ao certo porque não foi possível realizar os balanços íons para calcular o pH do modelo.

5.5 Desenvolvimento do modelo em regime contínuo em COMSOL Multiphysics® para método de fluidodinâmica computacional acoplada à cinética bioquímica

O modelo em geometria 3-D do reator utilizado por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019) foi desenvolvido no próprio ambiente COMSOL Multiphysics®. Inicialmente, optou-se pela representação em geometria 3-D devido às características do leito estruturado, que intercala a posição dos suportes de adesão da biomassa (Figura 42). Nesta sessão, optou-se por utilizar apenas os modelos Cont-MCMC-5k e o 2X_ADM-CE/H₂, desconsiderando os modelos X_Inib pois na plataforma COMSOL Multiphysics® apresentou resultados bastante semelhantes ao modelo Cont-MCMC-5k.

Figura 42. Representação gráfica do reator acidogênico de leito fixo estruturado e de seu modelo 3-D para modelar a etapa acidogênica em regime contínuo da fermentação de soro de leite



Legenda: Em **i.** AnSTBR, sendo **1.** Reservatório de soro de leite reconstituído; **2.** Bomba; **3.** Módulo de entrada do AnSTBR; **4.** Módulo de saída do AnSTBR; **5.** Cilindro de polietileno utilizado no leito estruturado para adesão de biomassa; **6.** Formato de estruturação do leito; e **ii.** Modelo virtual 3-D elaborado no software COMSOL Multiphysics® para realização das simulações CFD. **ii.** Modelo desenvolvido no software COMSOL Multiphysics® para representar **i.**, e **iii.** Corte no eixo xz para visualização da malha de elementos finitos criada para representar o AnSTBR, vista isométrica. Fonte: o autor.

A inclusão dos elementos do leito estruturado, tornou o modelo extremamente complexo com uma malha grosseira de mais de 160.000 elementos, limitando a funcionalidade do próprio computador utilizado para simulações. Decidiu-se simplificar o modelo empregando o artifício de alterar a porosidade do meio para representar o espaço ocupado pelos suportes de adesão. Para isso, desenvolveu-se o modelo de um suporte de adesão e calculou-se seu volume (V_{SUP}), multiplicou-se V_{SUP} pela quantidade de suportes de adesão (Figura 42, **ii** marcado em azul), obtendo-se ($V_{SUP,TOT}$). Para o cálculo do volume de vazios do leito, subtraiu-se do volume do leito (V_{LEITO}) o valor de $V_{SUP,TOT}$. E, por fim determinou-se a porosidade do meio (ϵ) (Eq. 73).

$$\varepsilon = \frac{V_{\text{SUP,TOT}} - V_{\text{SUP}}}{V_{\text{SUP,TOT}}} \quad \text{Eq. 73}$$

A determinação dos volumes do modelo criado. Obteve-se um modelo cujo $V_{\text{SUP,TOT}}$ é de 2,558 L. A partir do modelo criado para determinar V_{SUP} , estimou-se o volume de 0,7475 L, portanto a porosidade determinada para o meio foi de 0,7232 (Eq. 73). Com isso, a diferença em relação ao valor informado por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019) é da ordem de 40 mL, ou 3,95% do volume real. Deve-se esclarecer que esse cálculo não é preciso, pois não foi considerada a camada de biofilme formada nos meios de suporte, bem como as hastes que permitiam a estruturação do leito. Mas a partir dessa consideração, a malha de elementos finitos pôde ser criada possibilitando continuar com a configuração das físicas envolvidas na sua resolução.

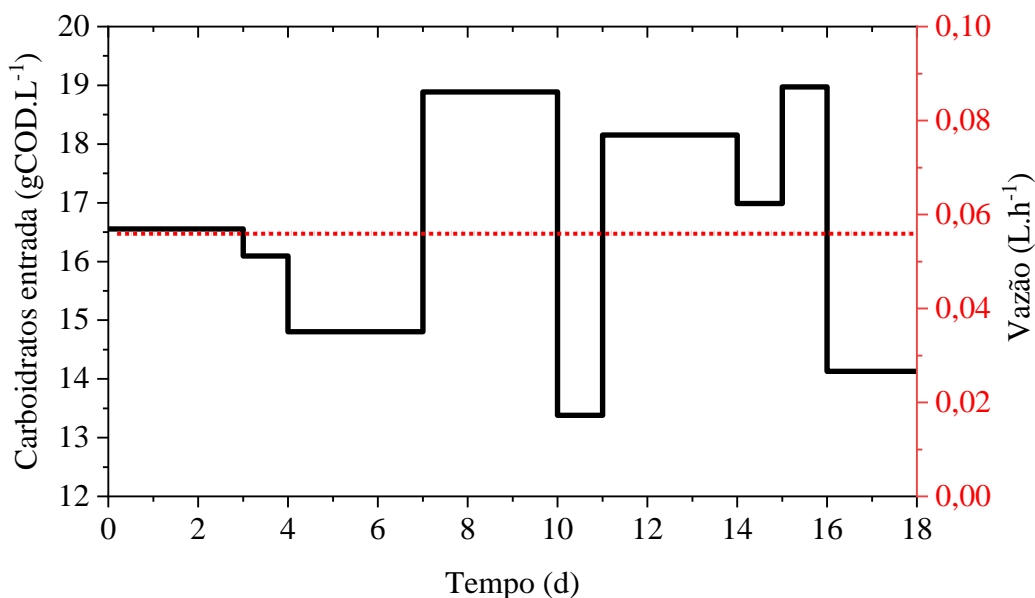
Atribuiu-se ao modelo uma camada de malha extremamente grosseira (*extremelly coarse mesh*). O próprio COMSOL Multiphysics® é capaz de atribuir malha a todos os espaços da geometria 3-D desenvolvida. Foram gerados elementos grandes e de formatos majoritariamente triangulares totalizando 3699 elementos. O *software* permite que o usuário faça modificações ao longo da malha caso haja interesse em aumentar o detalhamento de determinadas áreas do modelo. Em um primeiro momento decidiu-se manter as características da atual malha pois acredita-se que as reações globais descritas no modelo e o escoamento lento e sem grandes particularidades não exigem refinamento de malhas.

Definiu-se o meio no qual ocorreriam a resolução das equações do modelo como constituído por água e utilizou-se os parâmetros disponíveis na biblioteca do COMSOL Multiphysics® para este componente. Em seguida, deu-se início ao desenvolvimento da interface física, utilizando como base o modelo de Reações Químicas em Meio Poroso para Substâncias Diluídas. Nesta interface física foram incluídas as condições iniciais das concentrações de cada metabólito no leito do reator estruturado. Para o modelo baseado em Cont-MCMC-5k, considerou-se a biomassa inicial de 0,2 gDQO L⁻¹, e para o modelo baseado em 2X_ADM-CE/H2, 0,15 gDQO L⁻¹ e 0,05 gDQO L⁻¹ para os fermentadores primários e secundários, respectivamente.

Antes de se iniciar a atribuição das condições de contorno e as características físicas do modelo, introduziu-se nas abas de parâmetros e variáveis todos os valores de parâmetros utilizados em Matlab®. Os parâmetros determinados pelo método MCMC e todas as demais equações de reações bioquímicas e físicas. Por fim, foram inseridas as condições de vazão de

entrada constante de soro de leite reconstituído multiplicada por uma função do tipo *piecewise*, uma função de trechos, com as concentrações variáveis de carboidratos de entrada disponibilizadas por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019) (Figura 43).

Figura 43. Variação do afluente de carboidratos (—) utilizada no modelo em regime contínuo representado no *software* COMSOL Multiphysics® e a vazão de entrada (•••) empregada para manter o tempo de detenção hidráulico do sistema em 33 h



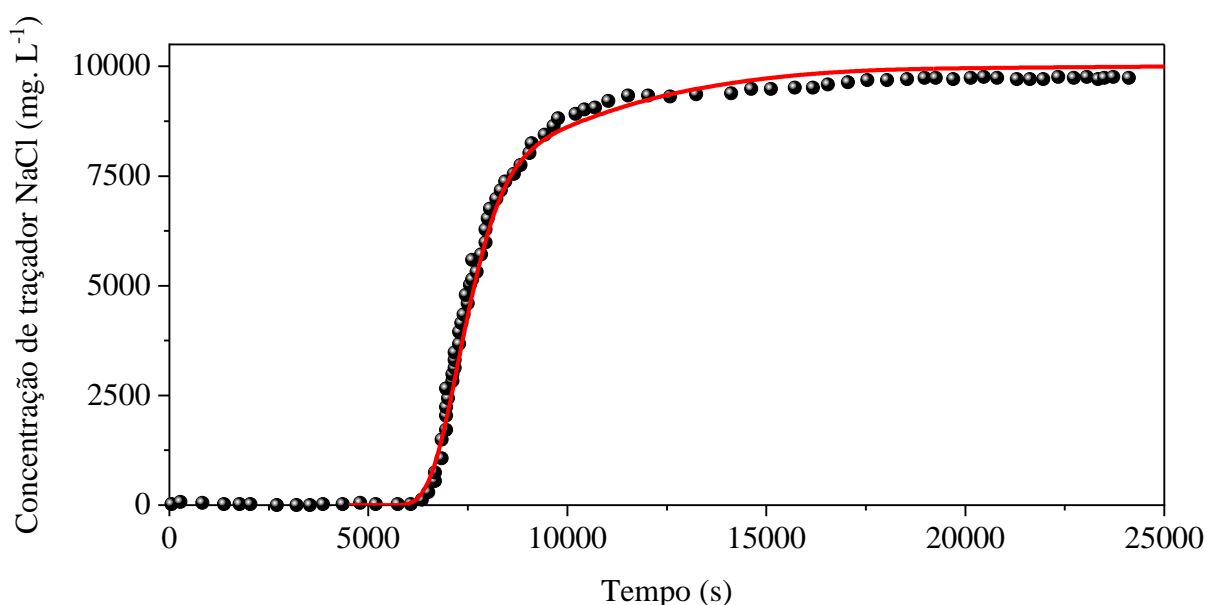
Fonte: o autor.

Diferentemente do modelo de Engenharia das Reações Químicas, o modelo de Reações Químicas em Meio Poroso para Substâncias Diluídas apresenta uma aba inicial, na qual devem ser listadas todas as espécies químicas que participarão de reações no modelo. Em seguida, deve-se selecionar os elementos disponíveis neste para determinar entradas (*inflow* para vazão e *inlet* para concentrações das espécies químicas), saídas (*outflow* para vazão e *outlet* para concentrações). Além disso, deve-se atribuir ao modelo os limites por onde o escoamento acontecerá (*wall*), os valores iniciais das espécies químicas (*initial values*) e as características do meio poroso (*porous matrix properties*), como permeabilidade e porosidade.

Em seguida configurou-se o modelo para representar uma curva tipo degrau da injeção de traçador NaCl. Blanco, Oliveira e Zaiat (2019) empregaram o mesmo reator utilizado por Peixoto (2012). Então configurou-se o modelo de reator para uma vazão de entrada média que possibilitasse a obtenção do valor aproximado de TDH médio obtido pelo autor (2,12 h). Outro parâmetro ajustado para as simulações hidrodinâmicas foi a difusividade do NaCl em água, adotando-se $5,313 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2 \text{ h}^{-1}$ (VITAGLIANO; LYONS, 1956). Seguiu-se para as

configurações dos métodos de resolução, tratando o modelo como dois modelos segregados, nos quais foram realizados a parte a hidrodinâmica de escoamento do modelo e a distribuição das concentrações de NaCl ao longo do reator. Por fim, captou-se com uma sonda virtual que realizava leitura média das concentrações de NaCl na saída do reator, e comparou-se os valores captados com os obtidos por Peixoto (2012) (Figura 44).

Figura 44. Resultados da simulação da curva de concentração de traçador NaCl (—) conduzidas no *software* COMSOL Multiphysics® e os resultados experimentais (●) obtidos por Peixoto (2012)



Fonte: o autor.

De acordo com a Figura 44, pode-se observar um ótimo ajuste dos dados simulados aos experimentais. Chama-se atenção para o início da curva vermelha na Figura 43, que se inicia após 5500 s. Somou-se a curva de tempo esta quantidade de segundos para que as curvas ficassem mais próximas pois Peixoto (2012) não declarou por quanto tempo o reator já estava em funcionamento até a introdução da solução de NaCl. Este procedimento não afeta a integridade dos dados de concentração, pois tratando-se de curvas de concentração tipo degrau para determinação de TDH, o mais importante é a inclinação da curva (LEVENSPIEL, 2000). Pela qualidade do ajuste dos dados simulados aos experimentais, valida-se a hidrodinâmica próxima ao fluxo pistonado do modelo 3-D de reator AnSTBR para posterior acoplamento aos modelos de cinética bioquímica e físico-químicas.

Com a etapa hidrodinâmica em funcionamento, atribuiu-se ao modelo uma região onde ocorrerá as reações (*reactions*), designando-se apenas o leito central do modelo, onde estaria o leito estruturado (Figura 42 ii). Neste módulo, as taxas de reação de cada espécie química do modelo devem ser preenchidas. As equações foram escritas no mesmo formato de código em Matlab®, com a diferença de que antes das equações de taxa bioquímicas (*rho*), utilizou-se o termo $\max(\text{eps}^2, \text{rho})$. Esta expressão garante que não sejam atribuídos valores negativos às equações de taxa, aumentando a tolerância absoluta dos mesmos (COMSOL, 2014).

Segundo Blanco, Oliveira e Zaiat (2019), o pH do reator operado em regime contínuo foi controlado pela adição de álcali de modo a mantê-lo entre acima de 5,0 fim de obter maiores rendimentos de H₂. Devido às limitações de cálculo do balanço de pH optou-se por não representar a adição destes álcalis, nem de incluir a inibição por pH nas reações. Esta simplificação permitiu que o modelo fosse resolvido, porém os erros decorrentes desta escolha não puderam ser quantificados.

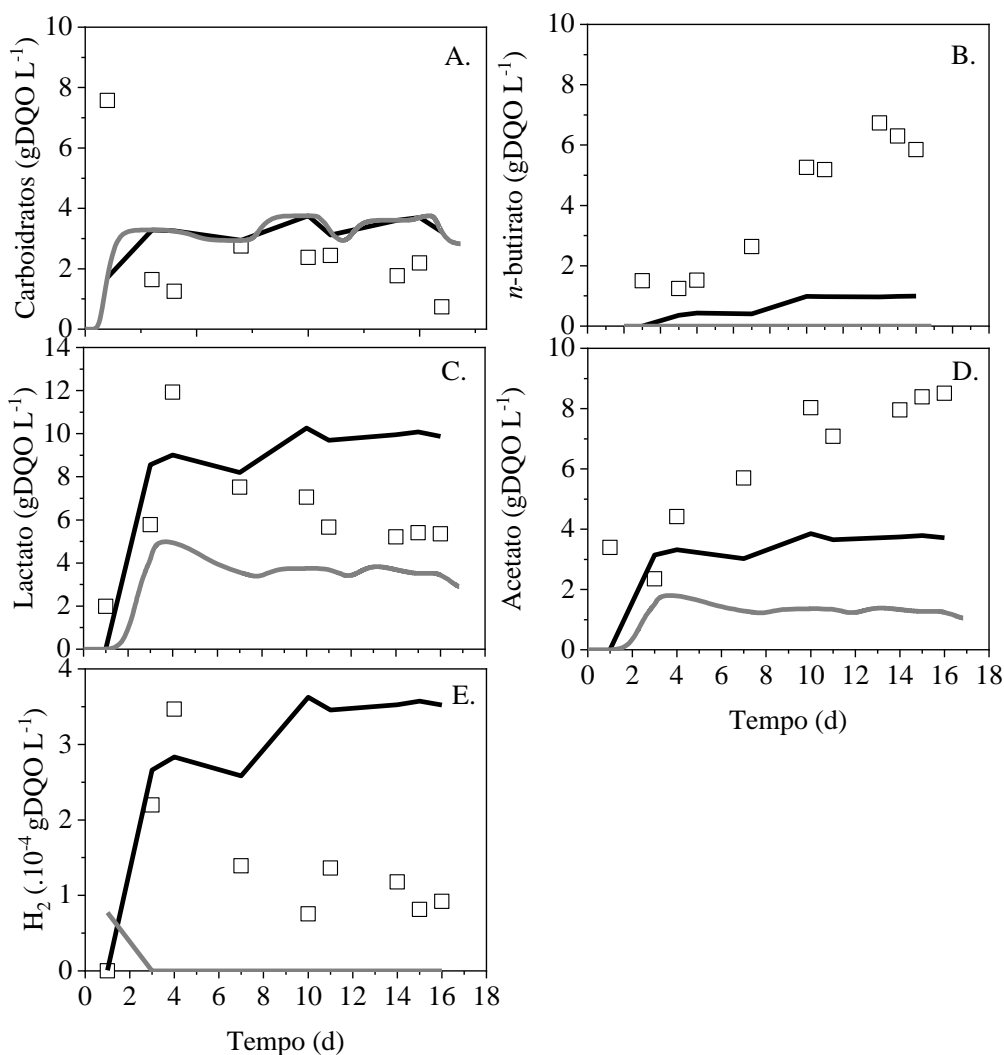
Configurou-se apenas o período de análises e o nível de tolerância desejados, 0 a 18 dias e 1.10^{-6} , respectivamente. O nível de tolerância deste *software* diz respeito ao tamanho dos passos que serão realizados no tempo assim que a resolução do modelo mostra convergência por meio de menores níveis de erro. Apesar de o COMSOL Multiphysics® permitir ao usuário que ele selecione o nível de tolerância, caso o erro durante a resolução das equações seja grande, o próprio *software* altera esse nível de tolerância (COMSOL, 2014).

A resolução do sistema de equações não-lineares bioquímicas somadas as equações de Navier-Stokes para descrever a fluidodinâmica do modelo mostraram um aumento expressivo no tempo de simulação deste modelo. As simulações de ambos modelos perduraram por aproximadamente 32 h para os modelos Cont-MCMC-5k e X_Inib, e em torno de 40 h para o modelo 2X-ADM-CE/H2. O modelo foi resolvido como dois problemas segregados, sendo que no primeiro foram resolvidas todas as equações referentes a fluido dinâmica e na segunda todas as equações derivadas do modelo ADM1. O formato de resolução segregado é tido como uma forma mais robusta de resolução de modelos, porém pelo fato de necessitar de menos memória de processamento pode tornar o processo de resolução mais lento. Normalmente, modelos envolvendo sistemas de equações não-lineares com mais de uma interface física, como a combinação de CFD com as equações bioquímicas propostas, tendem a ser resolvidos desta forma em vez de serem resolvidos como um sistema completamente acoplado (*fully coupled*) (SADINO-RIQUELME et al., 2018).

Para a resolução dos modelos segregados determinou-se o método implícito de resolução BDF (do inglês, *backward differentiation formula*, fórmula de diferenciação

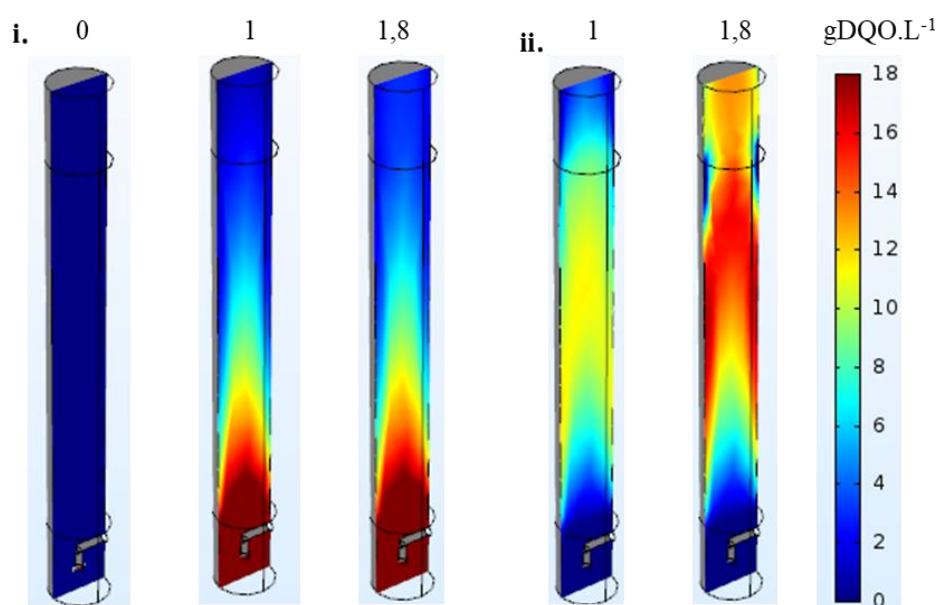
regressiva). Este método é baseado no método de Euler de diferenciação, no qual resolve-se um sistema de equações não lineares no tempo presente dando origem aos valores iniciais do período futuro por meio de passos. O BDF é um método que permite que tanto o passo, distância entre os períodos, quanto a ordem da equação objetivo sejam variáveis dentro de zonas de estabilidade ilimitadas. Ou seja, o método tira proveito da identificação de regiões onde pode-se reduzir a sensibilidade da resolução como uma forma de reduzir o tempo de cálculo (SARTORI, 2014). Os resultados das simulações do modelo desenvolvido em COMSOL Multiphysics® para o AnSTBR do consumo e síntese dos metabólitos são mostrados na Figura 45.

Figura 45. Resultados dos modelos 3-D de AnSTBR operado continuamente baseados nos modelos Cont-MCMC-5k (—) e 2X-ADM-CE/H2 (—)



O consumo de carboidratos de ambos modelos mostrou bom ajuste aos dados experimentais. Com exceção do ponto experimental da partida do reator no dia 1, ambos modelos apresentaram comportamento semelhante, mesmo aquele baseado em Cont-MCMC-5k que não possui etapa hidrolítica (Figura 45 A). Nos modelos em batelada observou-se que a inclusão de etapa hidrolítica nos modelos apresentava uma aceleração da curva de consumo de carboidratos, implicando em melhores ajustes aos dados experimentais entre os modelos que compartilhavam esta característica. Já em relação aos modelos de regime contínuo, o mesmo padrão não foi observado, pelo contrário, o modelo que não apresentava etapa hidrolítica mostrou um consumo mais rápido de carboidratos entre o dia 1 e 2 (Figura 45 A). A Figura 46 mostra o desenvolvimento dos perfis de hidrólise de carboidratos e consumo de açúcares.

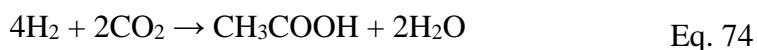
Figura 46. Perfil temporal dos dias 0, 1 e 1,8 e da distribuição espacial de **i.** hidrólise da lactose e **ii.** consumo de açúcares no modelo baseado em 2X-ADM-CE/H2 3-D de reator AnSTBR desenvolvido na plataforma COMSOL Multiphysics® operando sob TDH de 33 h



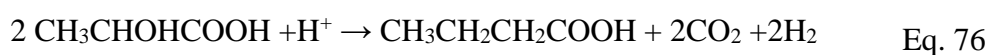
Pode-se observar na Figura 46 que o COMSOL Multiphysics® respeitou a condição de contorno para que as reações ocorressem apenas a partir da câmara de leito fixo. A hidrólise de carboidratos na Figura 45 **i** já não mostra diferenças entre as concentrações e carboidratos ao final de um dia ou ao final de 1,8 dia (43,2 h, passado o TDH proposto de 33 h) no topo do reator. Enquanto isso, o consumo dos monômeros de lactose mostram a ocorrência de altas taxas de conversão no eixo central do reator (cores mais voltadas ao laranja e amarelo) enquanto

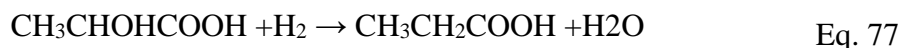
que nas bordas do reator, onde a velocidade de escoamento é menor, observa-se concentrações maiores de açúcar (cores vermelhas intensas).

Já a simulação dos metabólitos secundários acetato e lactato não foi capaz de se ajustar aos resultados experimentais (Figura 45 C e D). O modelo de estequiometria fixa empregado não prevê a ocorrência de outras rotas metabólicas que não as de fermentação hetero e homolática da lactose e o alongamento de cadeia de acetato para *n*-butirato. Enquanto as curvas de simulação de ambos metabólitos se expressaram de forma semelhante ao consumo de carboidratos, os dados experimentais mostram uma queda inicial na formação de lactato a partir do 3º dia e acréscimos da produção de acetato até o 16º dia. Claramente, o alongamento de cadeia não foi capaz de consumir totalmente o lactato como observado nas bateladas experimentais. No entanto, não se pode afirmar que este processo não ocorreu. Dada a tendência de queda de produção do lactato no meio, pode ser que tenha ocorrido uma alteração na composição de fermentadores primários no reator favorecendo o desenvolvimento de fermentadoras heteroláticas e outros acetogênicos. Somando a ocorrência do aumento das produções de acetato ao longo dos dias pode indicar ocorrência de homoacetogênese (Eq. 74) no meio, como bem observaram os autores Blanco, Oliveira e Zaiat (2019).



Menezes e Silva (2019) observaram a correlação entre o aumento do valor das razões entre acetato e *n*-butirato e a queda nos rendimentos de H₂ em reatores de leito fluidizado em TDH variados (24, 16 e 8 h) fermentando extrato líquido de cana-de-açúcar em meio mesofílico. As menores as razões entre acetato e *n*-butirato junto a queda de produção de H₂ foram associadas à formação de propionato no meio. Nos dados fornecidos por Blanco, Oliveira e Zaiat (2019), pelo menos 9% da DQO afluyente foi convertida em propionato. Este metabólito atua como um sequestrante de H₂ do meio, pois ao contrário do lactato que pode ser utilizado para o alongamento de cadeia promovendo a liberação de H₂ retido na molécula durante a fermentação primária, o propionato consome H₂ tanto na sua formação quanto durante processos de alongamento de cadeia que possa sofrer (AGLER et al., 2011) (Eq. 75 a 77).





A maioria dos modelos empregados na simulação de H_2 são baseados em estequiometria fixa. Esta consideração deixa de levar em conta parâmetros dinâmicos que influenciam diretamente nas reações de H_2 como, pH, pressões parciais de H_2 e as condições termodinâmicas. Além disso, em muitos casos, estes modelos são baseados no comportamento de bateladas experimentais. Nas quais o acúmulo de ácidos graxos voláteis e a própria competição entre microrganismos atuam como inibidores da síntese e consumo de H_2 no sistema, implicando em modelos menos representativos (SAADY, 2013). Montecchio, Yuan e Malpei (2018) consideraram em seu modelo de simulação baseado em ADM1 um formato de inibição por pressões parciais de H_2 , com intuito de associá-lo à ocorrência de homoacetogênese na fermentação de lactose. Neste modelo conseguiram prever a quantidade de H_2 que seria produzida durante a fermentação e aquela que seria consumida, estabelecendo uma relação de *turnover* (momento no qual a síntese passa a ser maior que o consumo, gerando resultados positivos). Altas razões de *turnover* e baixas relações entre microrganismos homoacetogênicos e fermentadores foram associadas pelos autores como um indicativo de que os microrganismos acetogênicos apresentam alta capacidade de alterar as condições do sistema em relação ao consumo de H_2 ou síntese de acetato. De forma semelhante, Blanco, Oliveira e Zaiat (2019) estimaram que a homoacetogênese teve participação em $69 \pm 5\%$ de todo H_2 consumido durante a etapa experimental, mas não foi possível estimar as populações de microrganismos para observar a relação citada acima.

Neste trabalho, ambos modelos não foram capazes de prever a síntese de H_2 da operação do AnSTBR. O modelo baseado em Cont-MCMC-5k superestimou a produção de H_2 por não levar em conta as rotas de consumo deste metabólito. Enquanto o modelo baseado em 2X-ADM-CE/ H_2 , após levar em conta os efeitos da inibição competitiva de seus fermentadores por açúcares, não foi capaz de sintetizar qualquer quantidade de H_2 (Figura 45 E). Para predição da formação de *n*-butirato ambos modelos se mostraram igualmente mal ajustados, sendo que apenas o modelo baseado em Cont-MCMC-5k que não apresenta inibição por açúcares apresentou pequenos rendimentos deste metabólito (Figura 45 B).

No entanto, baixos rendimentos de H_2 devido à ocorrência de homoacetogênese pode ser associado à síntese de ácidos graxos de maior valor agregado, como o *n*-butirato. Segundo Liu e colaboradores (2020), o consumo de lactato pelos microrganismos alongadores de cadeia estabelece uma relação sintrófica com as bactérias lácticas, deslocando o equilíbrio de reações

para a produção de mais ácido láctico. Com as fontes de doadores de elétrons supridas para a realização de alongamento de cadeia, acetato passa a ser consumido e *n*-butirato e H₂ sintetizados. Em ambiente favorável ao seu desenvolvimento, os microrganismos homoacetogênicos passam a consumir o H₂ produzido no alongamento de cadeia, sintetizando acetato, receptor de elétrons do alongamento de cadeia, efetivando mais uma relação no ecossistema microbológico.

6 CONCLUSÃO

As respostas obtidas na simulação dos modelos de bateladas da fermentação do soro de leite foram positivas. O modelo 2X_ADM-CE/H2, desenvolvido para considerar o alongamento de cadeia realizado por uma biomassa independente, foi o modelo que apresentou melhor ajuste aos dados experimentais após ter seus parâmetros estimados pelo método de Monte Carlo Cadeias de Markov. Com ressalvas a predição de crescimento das populações microbianas.

O método de Monte Carlo Cadeias de Markov mostrou ser robusto o suficiente para determinação dos parâmetros cinéticos deste trabalho. Mas ao se determinar parâmetros com forte correlação ou linearmente dependentes, o uso de limites para os valores aceitos para compor as Cadeias de Markov mostrou-se necessário para conferir maior velocidade ao método, facilitando a convergência do método.

A representação dos modelos desenvolvidos em Matlab® na plataforma COMSOL Multiphysics® também foi prejudicada pela limitação dos cálculos de balanço de pH, diminuindo a representatividade do modelo frente aos dados experimentais. Portanto, o reator AnSTBR operado em regime contínuo só pôde validar a fluidodinâmica computacional em relação aos dados experimentais. No entanto, quando acoplado às reações físico-químicas e bioquímicas dos modelos baseados em ADM1, o modelo apresentou limitações no cálculo do pH do sistema, bem como na obtenção de metabólitos secundários. Uma vez que algumas das possíveis rotas metabólicas estabelecidas durante a operação do AnSTBR não estavam previstas pelo modelo baseado nas bateladas experimentais.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar estudos cinéticos das etapas propostas de alongamento de cadeia de ácidos orgânicos de cadeia curta;
- criar uma biblioteca de dados experimentais para calibração de modelos de simulação;
- disponibilizar os modelos desenvolvidos nos diferentes *softwares* que venham a ser desenvolvidos;
- adequar modelos de estequiometria fixa para estequiometria variável e analisar prós e contras;
- verificar integração entre *softwares* de simulação como o COMSOL Livelink for Matlab;

REFERÊNCIAS

AGLER, M. T. et al. Waste to bioproduct conversion with undefined mixed cultures : the carboxylate platform. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 70–78, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.11.006>>.

AGLER, M. T. et al. Chain elongation with reactor microbiomes: Upgrading dilute ethanol to medium-chain carboxylates. **Energy and Environmental Science**, v. 5, n. 8, p. 8189–8192, 2012.

AHMAD, T. et al. Treatment and utilization of dairy industrial waste: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 88, n. December 2018, p. 361–372, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.003>>.

ANGENENT, L. T. et al. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 477–485, 2004.

ANGENENT, L. T. et al. Chain elongation with reactor microbiomes : open- culture biotechnology to produce biochemicals Extensive review Chain elongation with reactor microbiomes : open-culture biotechnology to produce biochemicals. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 2796–2810, p. 34, 2016.

ANTONOPOULOU, G. et al. Biohydrogen and Methane Production from Cheese Whey in a Two-Stage Anaerobic Process. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 47, p. 5227–5233, 2008. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>.

ANTONOPOULOU, G. et al. Modeling of fermentative hydrogen production from sweet sorghum extract based on modified ADM1. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, n. 1, p. 191–208, jan. 2012.

ASUNIS, F. et al. Control of fermentation duration and pH to orient biochemicals and biofuels production from cheese whey. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121722, 1 out. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852419309526>>. Acesso em: 25 jul. 2019.

AZARGOSHASB, H. et al. Three-phase CFD simulation coupled with population balance equations of anaerobic syntrophic acidogenesis and methanogenesis reactions in a continuous stirred bioreactor. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 27, p. 207–217, 25 jul. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1226086X15000027>>. Acesso em: 25 jul. 2019.

B-ARROYO, C. et al. An unstructured model for anaerobic treatment of raw cheese whey for volatile fatty acids production. **Energies**, v. 13, n. 7, 2020.

BATISTA, M. A.; CAMPOS, N. C. A.; SILVESTRE, M. P. C. Whey and protein derivatives: Applications in food products development, technological properties and functional effects on child health. **Cogent Food & Agriculture**, v. 4, n. 1, p. 1–13, 2018. Disponível em: <<https://www.cogentoa.com/article/10.1080/23311932.2018.1509687>>.

BATSTONE, D. J. et al. The IWA Anaerobic Digestion Model No 1 (ADM1). **Water Science & Technology**, v. 45, n. 10, p. 65–73, 2002.

BATSTONE, D. J. Modelling and control in anaerobic digestion: achievements and challenges. In: 13th World Congress on Anaerobic Digestion (AD 13), **Anais...**2013.

BATSTONE, D. J. et al. Mathematical modelling of anaerobic digestion processes: applications and future needs. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 595–613, 2015.

BENEMANN, J. Hydrogen biotechnology : v. 14, n. September, p. 1101–1103, 1996.

BLANCO, V. M. C.; OLIVEIRA, G. H. D.; ZAIAT, M. Dark fermentative biohydrogen production from synthetic cheese whey in an anaerobic structured-bed reactor: Performance evaluation and kinetic modeling. **Renewable Energy**, v. 139, p. 1310–1319, 11 mar. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.03.029>>.

BOX, G. E. P. et al. A Basis for the Selection of a Response Surface Design. v. 54, n. 287, p. 622–654, 2007.

BROOKS, S. et al. (ed.). **Handbook of Markov Chain Monte Carlo**. [s.l.] Chapman & Hall/CRC Handbooks of Modern Statistical Methods, 2011.

BROWN, L. C.; BERTHOUEX, P. Mac. **Statistics for Environmental Engineers**. 2. ed. [s.l.] CRC Press, 2002.

CANDRY, P. et al. Mildly acidic pH selects for chain elongation to caproic acid over alternative pathways during lactic acid fermentation. **Water Research**, v. 186, 2020.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Science of the Total Environment Cheese whey wastewater : Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v. 445–446, p. 385–396, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.038>>.

CASTELLÓ, E. et al. Feasibility of biohydrogen production from cheese whey using a UASB reactor: Links between microbial community and reactor performance. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 14, p. 5674–5682, 2009.

CASTELLÓ, E. et al. Possible causes for the instability in the H₂ production from

cheese whey in a CSTR. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 5, p. 2654–2665, 2018.

CASTILLO MARTINEZ, F. A. et al. Lactic acid properties, applications and production: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 70–83, 2013.

CAVALCANTE, W. de A. et al. Anaerobic fermentation for n-caproic acid production: A review. **Process Biochemistry**, v. 54, p. 106–119, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.12.024>>.

CHANDRA, R. et al. A biorefinery approach for dairy wastewater treatment and product recovery towards establishing a biorefinery complexity index. **Journal of Cleaner Production**, v. 183, p. 1184–1196, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.02.124>>.

CHATZIPASCHALI, A. A.; STAMATIS, A. G. Biotechnological utilization with a focus on anaerobic treatment of cheese whey: Current status and prospects. **Energies**, v. 5, n. 9, p. 3492–3525, 2012. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/energies>. Acesso em: 16 jul. 2019.

CHOJNACKA, A. et al. Comparative analysis of hydrogen-producing bacterial biofilms and granular sludge formed in continuous cultures of fermentative bacteria. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 21, p. 10057–10064, 2011.

CHRIST, O. et al. Mathematical modeling of the hydrolysis of anaerobic processes. **Water Science and Technology**, v. 41, n. 3, p. 61–65, 2000.

CHWIALKOWSKA, J. et al. Caproic acid production from acid whey via open culture fermentation – Evaluation of the role of electron donors and downstream processing. **Bioresource Technology**, v. 279, n. January, p. 74–83, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.086>>.

COELHO, M. M. H. et al. Potential assessment and kinetic modeling of carboxylic acids production using dairy wastewater as substrate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 156, n. January, p. 107502, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107502>>.

COMSOL. Introduction to COMSOL Multiphysics 5.0. **Manual**, p. 168, 2014. Disponível em: <<http://cdn.comsol.com/documentation/5.0.1.276/IntroductionToCOMSOLMultiphysics.pdf>>

CONTRERAS-DÁVILA, C. A. et al. Consecutive lactate formation and chain elongation to reduce exogenous chemicals input in repeated-batch food waste fermentation. **Water Research**, v. 169, 2020.

COSTELLO, D. J.; GREENFIELD, P. F.; LEE, P. L. Dynamic modelling of a single-stage high-rate anaerobic reactor—I. Model derivation. **Water Research**, v. 25, n. 7, p. 847–858, jul. 1991. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/004313549190166N>>. Acesso em: 19 ago. 2019.

COTA-NAVARRO, C. B. et al. Continuous hydrogen and methane production in a two-stage cheese whey fermentation system. **Water Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 367–374, 2011.

CRUZ, D. B. et al. Avaliação do comportamento hidrodinâmico de reator anaeróbio de manta de lodo e fluxo ascendente com diferentes configurações do sistema de distribuição do afluente utilizando fluidodinâmica computacional. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 21, n. 4, p. 721–730, 27 out. 2016. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-41522016000400721&lng=pt&nrm=iso&tlng=en)

[41522016000400721&lng=pt&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-41522016000400721&lng=pt&nrm=iso&tlng=en)>. Acesso em: 16 jul. 2019.

DANIELSSON, O. **Modeling and simulation of anaerobic manure digestion into biogas**. 2014. Chalmers University of Technology, Gothenburg, Suécia, 2014. Disponível em: <<http://publications.lib.chalmers.se/records/fulltext/211706/211706.pdf>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

DAVILA-VAZQUEZ, G. et al. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 19, p. 4989–4997, 2008.

DAVILA-VAZQUEZ, G. et al. Continuous biohydrogen production using cheese whey: Improving the hydrogen production rate. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 34, n. 10, p. 4296–4304, 2009.

DE GIOANNIS, G. et al. Biohydrogen production from dark fermentation of cheese whey: Influence of pH. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 36, p. 20930–20941, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.10.046>>.

DE GROOF, V. et al. Medium chain carboxylic acids from complex organic feedstocks by mixed culture fermentation. **Molecules**, v. 24, n. 3, p. 1–32, 2019.

DE SMIT, S. M. et al. Continuous n-valerate formation from propionate and methanol in an anaerobic chain elongation open-culture bioreactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 1–16, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13068-019-1468-x>>.

DELAFOSSÉ, A. et al. CFD-based compartment model for description of mixing in bioreactors. **Chemical Engineering Science**, v. 106, p. 76–85, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2013.11.033>>.

DIAMANTIS, V. I. et al. Two-stage CSTR-UASB digestion enables superior and alkali addition-free cheese whey treatment. **Biochemical Engineering Journal**, v. 84, p. 45–52, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.01.001>>.

DIEZ-GONZALEZ, F.; RUSSELL, J. B.; HUNTER, J. B. The role of an NAD-independent lactate dehydrogenase and acetate in the utilization of lactate by *Clostridium acetobutylicum* strain P262. **Archives of Microbiology**, v. 164, n. 1, p. 36–42, 1995.

DIXON, A. G.; NIJEMEISLAND, M. CFD as a design tool for fixed-bed reactors. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 40, n. 23, p. 5246–5254, 2001.

DONOSO-BRAVO, A. et al. **Model selection, identification and validation in anaerobic digestion: A review** **Water Research**, 1 nov. 2011. .

DONOSO-BRAVO, A. et al. Modelling of an anaerobic plug-flow reactor. Process analysis and evaluation approaches with non-ideal mixing considerations. **Bioresource Technology**, v. 260, p. 95–104, 1 jul. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852418304449>>. Acesso em: 31 jul. 2019.

DUBER, A. et al. Exploiting the real wastewater potential for resource recovery-: N - caproate production from acid whey. **Green Chemistry**, v. 20, n. 16, p. 3790–3803, 2018.

DUNCAN, S. H.; LOUIS, P.; FLINT, H. J. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5810–5817, out. 2004.

ELBESHISHY, E. et al. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, n. October 2015, p. 656–668, 1 nov. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032117307153>>. Acesso em: 15 jul. 2019.

EMBRAPA. LEITE oportunidades. **Revista embrapa**, p. 116, 2018. Disponível em: <www.embrapa.br/gado-de-leite>.

FERNANDO, S. et al. Biorefineries: Current status, challenges, and future direction. **Energy and Fuels**, v. 20, n. 4, p. 1727–1737, 2006.

FLORES-ALSINA, X. et al. Modelling phosphorus (P), sulfur (S) and iron (Fe) interactions for dynamic simulations of anaerobic digestion processes. **Water research**, v. 95, n. 1, p. 370–82, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27107338>>.

FU, W.; MATHEWS, A. P. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: Kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. **Biochemical Engineering**

Journal, v. 3, n. 3, p. 163–170, 1999.

FUESS, L. T. et al. Temporal dynamics and metabolic correlation between lactate-producing and hydrogen-producing bacteria in sugarcane vinasse dark fermentation: The key role of lactate. **Bioresource Technology**, v. 247, n. July 2017, p. 426–433, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.121>>.

GADHAMSHETTY, V. et al. Modeling dark fermentation for biohydrogen production: ADM1-based model vs. Gompertz model. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 2, p. 479–490, jan. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.11.007>>.

GEHRING, T. A. et al. Optimal pH set point for simultaneous production and pertraction of n -caproic acid: An experimental and simulation study. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, n. January, p. jctb.6486, 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jctb.6486>>.

GEWEKE, J. Evaluating the Accuracy of Sampling-Based Approaches to the Calculation of Posterior Moments. **Bayesian statistics, Oxford University Press**, p. 169–193, 1991. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/2352607>>. Acesso em: 2 maio. 2019.

GIRALDO-GOMEZ, E. Kinetics of anaerobic treatment: A critical review. **Critical Reviews in Environmental Control**, v. 21, n. 5–6, p. 411–490, 1991.

GROOTSCHOLTEN, T. I. M. et al. Improving medium chain fatty acid productivity using chain elongation by reducing the hydraulic retention time in an upflow anaerobic filter. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 735–738, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.114>>.

HAARIO, H. et al. DRAM: Efficient adaptive MCMC. **Statistics and Computing**, v. 16, n. 4, p. 339–354, 2006.

HAARIO, H.; SAKSMAN, E.; TAMMINEN, J. An adaptive Metropolis algorithm. **Bernoulli**, v. 7, n. 2, p. 223–242, 2001.

HASTINGS, W. K. Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. **Biometrika**, v. 57, n. 1, p. 97–109, 1970.

HILL, A. D. T. et al. A Dynamic Model for Simulation of Animal Waste Digestion. v. 49, n. 10, p. 2129–2143, 1977.

HINKEN, L. et al. Modified ADM1 for modelling an UASB reactor laboratory plant treating starch wastewater and synthetic substrate load tests. **Water Research**, v. 64, p. 82–93, 1 nov. 2014. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135414004904>>. Acesso em: 22 jul. 2019.

HMISSI, M.; HARMAND, J.; SHAYEB, H. Hydrodynamic Model of an Anaerobic Reactor. **IJCTA**, v. 9, n. 38, p. 213–221, 2016. Disponível em: <<http://www.serialsjournals.com/serialjournalmanager/pdf/1483445531.pdf>>.

HOELZLE, R. et al. Lactate vs butyrate production during mixed culture glucose fermentation driven by substrate availability as determined by metaproteomics. p. 1–19, 2020.

JANKOWSKA, E. et al. Conversion of organic waste into volatile fatty acids – The influence of process operating parameters. **Chemical Engineering Journal**, v. 345, n. January, p. 395–403, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.03.180>>.

JESPERSEN, N. S. **An Introduction to Markov Chain Monte Carlo**. [s.l.: s.n.]

KARPINSKA, A. M.; BRIDGEMAN, J. CFD-aided modelling of activated sludge systems - A critical review. **Water Research**, v. 88, p. 861–879, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2015.11.008>>.

KHANAL, S. K. **Anaerobic biotechnology for bioenergy production: principles and applications**. First edit ed. [s.l.] John Wiley and Sons Ltd, 2008.

KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. A generalized method for thermodynamic state analysis of environmental systems. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 1–54, 2010.

KUCEK, L. A.; NGUYEN, M.; ANGENENT, L. T. Conversion of L-lactate into n-caproate by a continuously fed reactor microbiome. **Water Research**, v. 93, p. 163–171, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.018>>.

LAINE, M. **MCMC toolbox for Matlab**. Disponível em: <<https://mjlaine.github.io/mcmcstat/>>. Acesso em: 2 ago. 2021.

LAURENT, J. et al. A protocol for the use of computational fluid dynamics as a supportive tool for wastewater treatment plant modelling. **Water Science and Technology**, v. 70, n. 10, p. 1575–1584, 2014.

LEVENSPIEL, O. **Engenharia das reações químicas**. [s.l.] Edgard Blucher, 2000.

LIU, B. et al. Competition Between Butyrate Fermenters and Chain-Elongating Bacteria Limits the Efficiency of Medium-Chain Carboxylate Production. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. March, p. 1–13, 2020.

LOGTENBERG, S. A.; NIJEMEISLAND, M.; DIXON, A. G. Computational fluid dynamics simulations of fluid flow and heat transfer at the wall-particle contact points in a fixed-bed reactor. **Chemical Engineering Science**, v. 54, p. 2433–2439, 1999.

LOPES, R. J. G.; QUINTA-FERREIRA, R. M. Multiphase CFD Modeling of Trickle-Bed Reactor Hydrodynamics. **World Congress on Engineering and Computer Science**, 2007.

MAGDALENA, J. A.; BALLESTEROS, M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C. Acidogenesis and chain elongation for bioproduct development. **Wastewater Treatment Residues as Resources for Biorefinery Products and Biofuels**, p. 391–414, 2020.

MANI, S.; SUNDARAM, J.; DAS, K. C. Process simulation and modeling: Anaerobic digestion of complex organic matter. **Biomass and Bioenergy**, v. 93, p. 158–167, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.07.018>>.

MATLAB. **fmincon - Find minimum of constrained nonlinear multivariable function**. Disponível em: <<https://www.mathworks.com/help/optim/ug/fmincon.html>>. Acesso em: 2 set. 2021.

MATSUMOTO, M.; NISHIMURA, Y. Hydrogen production by fermentation using acetic acid and lactic acid. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 3, p. 236–241, 2007.

MENDES, A. J. B.; VALDMAN, B.; SOUZA JÚNIOR, R. B. Uma revisão de modelagem matemática em bioprocessos . parte I: fundamentos básicos e classificação. **Ciência e Tecnologia**, n. July, p. 40–59, 2011.

MENEZES, C. A. de; SILVA, E. L. Hydrogen production from sugarcane juice in expanded granular sludge bed reactors under mesophilic conditions: The role of homoacetogenesis and lactic acid production. **Industrial Crops and Products**, v. 138, p. 111586, out. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669019305977>>. Acesso em: 29 jul. 2019.

MONTECCHIO, D.; YUAN, Y.; MALPEI, F. Hydrogen production dynamic during cheese whey Dark Fermentation: New insights from modelization. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 37, p. 17588–17601, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.07.146>>.

MOSEY, F. E. Mathematical modelling of the anaerobic digestion process: regulatory mechanisms for the formation of short-chain volatile acids from glucose. **Water Science and Technology**, v. 15, p. 209–232, 1983.

MÜNCH, E. V.; POLLARD, P. C. Measuring bacterial biomass-COD in wastewater containing particulate matter. **Water Research**, v. 31, n. 10, p. 2550–2556, 1997.

NAJAFPOUR, G. D. et al. Kinetic model for an up-flow anaerobic packed bed bioreactor: Dairy wastewater treatment. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 15, p.

3590–3596, 2009.

NAPOLI, F. et al. Continuous lactose fermentation by *Clostridium acetobutylicum* - Assessment of acidogenesis kinetics. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1608–1614, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.004>>.

NORMAK, A. et al. Improving ADM1 model to simulate anaerobic digestion start-up within inhibition phase based on cattle slurry. **Biomass and Bioenergy**, v. 80, p. 260–266, 1 set. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953415300088>>. Acesso em: 22 jul. 2019.

O-THONG, S. et al. **Medium chain fatty acids production by microbial chain elongation: Recent advances**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2020. v. 5

OECE/FAO. **Dairy and dairy products**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.fao.org/3/CA4076EN/CA4076EN_Chapter7_Dairy.pdf>.

PEIRIS, B. R. H. et al. ADM1 simulations of hydrogen production. **Water Science and Technology**, v. 53, n. 8, p. 129–137, 2006.

PEIXOTO, G. **Sistema fermentativo de duas fases para a produção de hidrogênio e metano a partir de esgoto sanitário combinado com águas residuárias industriais**. 2012. Universidade de São Paulo, 2012.

PENUMATHSA, B. K. V. et al. ADM1 can be applied to continuous bio-hydrogen production using a variable stoichiometry approach. **Water Research**, v. 42, n. 16, p. 4379–4385, 2008.

PERNA, V. et al. Hydrogen production in an upflow anaerobic packed bed reactor used to treat cheese whey. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 1, p. 54–62, 2013.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48–68, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>>.

REYES, I. P. et al. A coupling model for EGSB bioreactors: Hydrodynamics and anaerobic digestion processes. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 50, n. 3, p. 316–324, 1 mar. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0255270111000201>>. Acesso em: 28 ago. 2018.

REZAVAND, M. et al. A fully Lagrangian computational model for the integration of mixing and biochemical reactions in anaerobic digestion. **Computers and Fluids**, v. 181, p.

224–235, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.compfluid.2019.01.024>>.

RITTMANN, B. E.; MCCARTY, P. L. **Environmental Biotechnology: Principles and Applications McGraw-Hill series in water resources and environmental engineering**. [s.l: s.n.]

ROCHA, J. M.; GUERRA, A. On the valorization of lactose and its derivatives from cheese whey as a dairy industry by - product : an overview. **European Food Research and Technology**, v. 246, n. 11, p. 2161–2174, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00217-020-03580-2>>.

RODRÍGUEZ, J. et al. Variable stoichiometry with thermodynamic control in ADM1. **Water Science and Technology**, v. 54, n. 4, p. 101–110, 2006.

RODRÍGUEZ, J.; LEMA, J. M.; KLEEREBEZEM, R. Energy-based models for environmental biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 366–374, 2008.

RODRIGUEZ, J. R. **Modelling Anaerobic Mixed Culture Fermentations**. 2006. Universidade de Santiago de Compostela, 2006.

ROSÉN, C.; JEPPSSON, U. **Aspects on ADM1 Implementation within the BSM2 Framework**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.iea.lth.se/publications/Reports/LTH-IEA-7224.pdf>>. Acesso em: 25 set. 2018.

SAADY, N. M. C. Homoacetogenesis during hydrogen production by mixed cultures dark fermentation: Unresolved challenge. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 38, n. 30, p. 13172–13191, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.07.122>>.

SADINO-RIQUELME, C. et al. **Computational fluid dynamic (CFD) modelling in anaerobic digestion: General application and recent advances** **Critical Reviews in Environmental Science and Technology** Taylor and Francis Inc., , 2 jan. 2018. .

SAHLIN, K. **Estimating convergence of Markov chain Monte Carlo simulations**. 2011. University of Stockholm, 2011. Disponível em: <www.math.su.se>. Acesso em: 16 jul. 2019.

SARMA, S. J. et al. Hydrogen biorefinery: Potential utilization of the liquid waste from fermentative hydrogen production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 942–951, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.04.191>>.

SARTORI, M. L. **Métodos para resolução de EDOs stiff resultantes de modelos químicos atmosféricos**. 2014. Universidade de São Paulo, 2014.

SATPATHY, P. et al. Modelling anaerobic digestion in an industrial biogas digester: Application of lactate-including ADM1 model (Part II). **Journal of Environmental Science**

and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering, v. 51, n. 14, p. 1226–1232, 2016a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10934529.2016.1212559>>.

SATPATHY, P. et al. Modelling anaerobic digestion in a biogas reactor: ADM1 model development with lactate as an intermediate (Part I). **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 51, n. 14, p. 1216–1225, 2016b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10934529.2016.1212558>>.

SHAHBANDEH, M. **Annual cheese production worldwide from 2015 to 2020**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/1120911/cheese-production-worldwide>>.

SIKORA, A. et al. Lactic acid bacteria in hydrogen-producing consortia: on purpose or by coincidence? In: **Intech open**. [s.l.] InTech, 2013. 2p. 490–514.

SOLOMONEN, A. Monte Carlo Methods in Parameter Estimation of Nonlinear Models. **Technology**, p. 1–121, 2006.

SPIRITO, C. M. et al. Chain elongation in anaerobic reactor microbiomes to recover resources from waste. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 115–122, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2014.01.003>>.

STAMS, A. J. M.; PLUGGE, C. M. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 8, p. 568–577, 2009.

VENETSANEAS, N. et al. Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 15, p. 3713–3717, 1 ago. 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409000492>>. Acesso em: 21 fev. 2019.

VITAGLIANO, V.; LYONS, P. A. Diffusion Coefficients for Aqueous Solutions of Sodium Chloride and Barium Chloride. **Journal of the American Chemical Society**, v. 78, n. 8, p. 1549–1552, 1956.

VLYSSIDES, A. G. et al. Anaerobic digestion of cheese dairy wastewater following chemical oxidation. **Biosystems Engineering**, v. 113, n. 3, p. 253–258, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2012.09.001>>.

WANG, X. et al. Bioresource Technology A hydrodynamics – reaction kinetics coupled model for evaluating bioreactors derived from CFD simulation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 24, p. 9749–9757, 2010. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.115>>.

WEIMER, P. J.; MOEN, G. N. Quantitative analysis of growth and volatile fatty acid production by the anaerobic ruminal bacterium *Megasphaera elsdenii* T81. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 9, p. 4075–4081, 2013.

WICKLEIN, E. et al. Good modelling practice in applying computational fluid dynamics for WWTP modelling. **Water Science and Technology**, v. 73, n. 5, p. 969–982, 2016.

WU, B. CFD simulation of gas and non-Newtonian fluid two-phase flow in anaerobic digesters. **Water Research**, v. 44, n. 13, p. 3861–3874, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2010.04.043>>.

WU, B.; CHEN, S. CFD simulation of non-Newtonian fluid flow in anaerobic digesters. **Biotechnology and Bioengineering**, 2008.

WU, Q. et al. Concentrating lactate-carbon flow on medium chain carboxylic acids production by hydrogen supply. **Bioresource Technology**, v. 291, n. March, p. 121573, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121573>>.

XU, Z. ADM1 Parameter Calibration Method based on Partial Least Squares Regression Framework for Industrial-scale Anaerobic Digestion Modelling. n. December, 2019.

ZAUNMÜLLER, T. et al. Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 3, p. 421–429, 2006.

ANEXO 1 – Equações diferenciais ordinárias e algébricas desenvolvida no *software* Matlab®

```

function dy = ADM1_2X_ODE(t,y,p)

%Parâmetros cinéticos
%Hidrólise
k_hyd_ch    = p(01);

%Primeira Fermentação
k_m_su      = p(02);
K_S_su      = p(03);
Y_ce        = p(04);

%Segunda Fermentação
k_m_ce      = p(05);
K_S_ce      = p(06);
Y_su        = p(07);

%=====
%Parameter      Value              Unit
%....NITROGEN.BALANCE.PARAMETERS.....
N_bac         = 0.08/14;           %kmole N (kg COD)^-1
N_xc          = 0.0376/14;        %kmole N (kg COD)^-1
%....CARBON.BALANCE.PARAMETERS.....
C_ch          = 0.0313;           %kmole C (kg COD)^-1
C_su          = 0.0313;           %kmole C (kg COD)^-1
C_pro         = 0.0268;           %kmole C (kg COD)^-1
C_bu          = 0.025;            %kmole C (kg COD)^-1
C_ac          = 0.0313;           %kmole C (kg COD)^-1
C_bac         = 0.0313;           %kmole C (kg COD)^-1
C_h2          = 0.0;              %kmole C (kg COD)^-1
C_lac         = 0.0325;           %kmole C (kg COD)^-1

%COEFICIENTES ESTEQUIOMETRICOS BLANCO, OLIVEIRA, ZAIAT (2019)
f_h2_su       = 0.02;
f_ac_su       = 0.26;
f_lac_su      = 0.72;
f_bu_lac      = 1.12;
f_h2_lac      = 0.06;
f_ac_lac      = 0.19;

%=====
%Valores dos parâmetros físico-químicos
%=====
%Parametro      Valor              Unidade
R               = 0.083145;        %bar M^-1 K^-1
T_base         = 298.15;           %K
T_op           = 308.15;           %K
%.....
K_w            = 1e-14*exp(55900/(R*100)*(1/T_base - 1/T_op));%M
K_a_bu         = 10^-4.82;         %M
K_a_pro        = 10^-4.88;         %M

```

```

K_a_ac      = 10^-4.76;      %M
K_a_lac     = 10^-3.82;      %M
K_a_co2     = 10^-6.35*exp(76.46/R*(1/T_base-1/T_op));%M
K_a_IN      = 10^-9.25*exp(519.65/(R*(1/T_base-1/T_op)));%M
%.....
k_A_B_bu    = 1e10/24;      %M^-1 h^-1
k_A_B_pro   = 1e10/24;      %M^-1 h^-1
k_A_B_ac    = 1e10/24;      %M^-1 h^-1
k_A_B_co2   = 1e10/24;      %M^-1 h^-1
k_A_B_IN    = 1e10/24;      %M^-1 h^-1
k_A_B_lac   = 1e10/24;      %M^-1 h^-1
%.....
P_atm       = 1.013;        %bar
p_gas_h2o   = 0.0313*exp(5290*(1/T_base - 1/T_op));%bar
k_p         = 5e4/24;        %m^3 h^-1 bar^-1
k_L_a       = 200/24;        %h^-1
K_H_co2     = 0.035*exp(-19410/(R*100)*(1/T_base - 1/T_op));
              %M_liq bar^-1
K_H_h2      = 7.8e-4*exp(-4180/(R*100)*(1/T_base - 1/T_op));
              %M_liq bar^-1
%=====
%VALORES DE PARAMETROS FISICOS
%=====
%Parameter   Value          Unit
V_liq        = 0.002;        %m^3
V_gas        = 0.003;        %m^3
%=====
%VALORES DE PARAMETROS BIOQUIMICOS
%=====
%Parametro   Valor          Unidade
%.....
K_S_IN       = 1e-4;         %M
%.....
k_dec_X_su   = 0.02;         %d^-1
k_dec_X_ce   = 0.02;         %d^-1
%=====

%PARAMETROS DE ENTRADA
S_su         = y(1);
S_bu         = y(2);
S_pro        = y(3);
S_ac         = y(4);
S_h2         = y(5);
S_lac        = y(6);
S_IC         = y(7);
S_IN         = y(8);
S_I          = y(9);
X_I          = y(10);
S_cat        = y(11);
S_an         = y(12);
S_bum        = y(13);

```

```

S_prom      = y(14);
S_acm       = y(15);
S_hco3m     = y(16);
S_nh3       = y(17);
S_lacm      = y(18);
S_gas_h2    = y(19);
S_gas_co2   = y(20);
X_su        = y(21);
X_ce        = y(22);
X_ch        = y(23);

%=====
%CALCULO PRESSAO DOS GASES
%=====
P_gas_h2    = S_gas_h2 * R * T_op / 16;
P_gas_co2   = S_gas_co2 * R * T_op;
P_gas       = P_gas_h2 + P_gas_co2 + p_gas_h2o;
q_gas       = k_p * (P_gas-P_atm) * P_gas / P_atm;

%=====
%CALCULO POTENCIAL HIDROGENIONICO
%=====
S_nh4 = S_IN - S_nh3;
S_co2 = S_IC - S_hco3m;

Theta = S_cat + S_nh4 - S_hco3m - S_an - S_acm/64 - S_prom/112
- S_bum/160 - S_lacm/96.38;

Sh = -Theta/2 + sqrt(Theta^2 + 4*K_w)/2;

if(Sh <= 0)
Sh = 1e-12;
end

pH = -log10(Sh);

%pH inhibition
pH_UL_aa = 5.5; %
pH_LL_aa = 4; %

if(pH < pH_UL_aa)
I_pH_aa = exp(-3*((pH-pH_UL_aa)/(pH_UL_aa-pH_LL_aa))^2);
else
I_pH_aa = 1;
end

%=====
%Process inhibition
%=====
K_I_h2_lac = 1.4e-4;
I_IN_lim = 1 / (1 + K_S_IN / S_IN);

```

```

I_pH      = I_pH_aa * I_IN_lim;
I_h2_lac  = 1 / (1 + S_h2 / K_I_h2_lac);
I_lac_ph  = I_pH_lac * I_IN_lim;
I_lac_h2  = I_h2_lac * I_IN_lim;

%=====
Taxas dos processos bioquímicos
%=====
rho_hyd_ch = k_hyd_ch * X_ch;

rho_su     = k_m_su * (S_su / (K_S_su + S_su)) * X_su * I_pH ;

rho_ce     = k_m_ce * (S_lac / (K_S_ce + S_lac)) * X_ce * (S_lac / (
X_ch + S_lac +1e-6)) * I_pH

rho_dec_su  = k_dec_X_su * X_su;

rho_dec_ce  = k_dec_X_ce * X_ce;

rho_dec_tot = rho_dec_su + rho_dec_ce;

%=====
%ACID-BASE RATES
%=====
rho_A_bu    = k_A_B_bu * (S_bum * (K_a_bu + Sh) - K_a_bu * S_bu);
rho_A_ac    = k_A_B_ac * (S_acm * (K_a_ac + Sh) - K_a_ac * S_ac);
rho_A_co2   = k_A_B_co2 * (S_hco3m * (K_a_co2 + Sh) - K_a_co2 *
S_IC);
rho_A_IN    = k_A_B_IN * (S_nh3 * (K_a_IN + Sh) - K_a_IN * S_IN)
;
rho_A_lac   = k_A_B_lac * (S_lacm * (K_a_lac + Sh) - K_a_lac *
S_lac);

%=====
%Taxas de transferências de gases
%=====
rho_T_h2    = k_L_a * (S_h2-16 * K_H_h2 * P_gas_h2);
rho_T_co2   = k_L_a * (S_co2 - K_H_co2 * P_gas_co2);

%=====
%PROCESSOS (BALANÇO DE CARBONO)
%=====

s_su       = -C_su + (1-Y_su) * ( f_ac_su * C_ac + f_h2_su * C_h2
+ f_lac_su * C_lac ) + Y_su * C_bac;
s_bu       = -C_bu ;
s_ac       = -C_ac + (1-Y_ce) * f_ac_lac * C_lac;
s_h2       = -C_h2;
s_bac      = -C_bac;
s_lac      = -C_lac - (1-Y_ce) * f_ac_lac * C_ac...
              + (1-Y_ce) * f_h2_lac * C_h2...

```



```

+ (1-Y_ce) * f_bu_lac * C_bu...
+   Y_ce   * C_bac;

%=====
%Equações diferenciais
%=====

% MONÔMEROS DE LACTOSE
dy(1) = - rho_su + rho_hyd_ch; %
% ACIDO BUTIRICO TOTAL
dy(2) = + (1-Y_ce)*f_bu_lac * rho_ce;
% ACIDO PROPIONICO TOTAL
dy(3) = 0;
% ACIDO ACETICO TOTAL
dy(4) = + (1-Y_su) * f_ac_su * rho_su - f_ac_lac * rho_ce;

% HIDROGÊNIO MOLECULAR
dy(5) = + (1-Y_su) * f_h2_su * rho_su + (1-Y_ce) * f_h2_lac *
rho_ce - rho_T_h2; % remover termo rho_T_h2 para modelo sem
%transferência de massa

% ACIDO LACTICO TOTAL
dy(6) = + (1-Y_su) * f_lac_su * rho_su - rho_ce ;

%.....
%MATÉRIA SOLÚVEL - CARBONO E NITROGÊNIO INORGÂNICOS
dy(7) = - ( s_su * rho_su + s_lac * rho_ce + s_bac * rho_dec_tot
- rho_T_co2;
dy(8) = - Y_su * N_bac * rho_su - Y_ce * N_bac * rho_dec_ce +
(N_bac - N_xc) * rho_dec_tot;
dy(9) = 0;%Concentração de inértes
dy(10) = 0; %Parículas inértes
dy(11) = 0; %cations
dy(12) = 0; %anions

%.ÁCIDOS DISSOCIADOS
dy(13) = -rho_A_bu; %ácido butírico
dy(14) = 0; %ácido propiônico
dy(15) = -rho_A_ac; %ácido acético
dy(16) = -rho_A_co2; %ácido carbônico
dy(17) = -rho_A_IN; %amônia
dy(18) = -rho_A_lac; %ácido láctico

%.Transferência de massa para fase gasosa
dy(19) = -S_gas_h2*q_gas/V_gas + rho_T_h2*V_liq/V_gas;
dy(20) = -S_gas_co2*q_gas/V_gas + rho_T_co2*V_liq/V_gas;

%.BIOMASSA
dy(21) = q_in/V_liq*(X_su_in-X_su) + Y_su * rho_su -
rho_dec_su/24;

```

```
dy(22) = q_in/V_liq*(X_ce_in-X_ce) + Y_ce * rho_ce -  
rho_dec_ce/24;
```

```
%.HIDRÓLISE DE LACTOSE
```

```
dy(23) = - rho_hyd_ch;
```

```
dy = [dy(1); dy(2); dy(3); dy(4); dy(5); dy(6); dy(7); dy(8);  
dy(9); dy(10); dy(11); dy(12); dy(13); dy(14); dy(15); dy(16);  
dy(17); dy(18); dy(19); dy(20); dy(21); dy(22); dy(23)];
```

ANEXO 2 – Função SS desenvolvida no *software* Matlab® para minimização de erros

```

function ss = ADM1_2X_SS_mcmc(k,data)

% soma de quadrados
time      = data.ydata(:,1);
S_su_obs  = data.ydata(:,2);
S_lac_obs = data.ydata(:,3);
S_ac_obs  = data.ydata(:,4);
S_but_obs = data.ydata(:,5);
X_obs     = data.ydata(:,6);

y0      = data.y0;

options = odeset('RelTol', 1e-12, 'AbsTol', 1e-12);
[t,y] = ode15s(@ADM1_2X_ODE_mcmc,time,y0,options,k);
%      [t,y] = ode15s(@(t,y,k)
ADM1_sintrofismo_ODE_mcmc(t,y,k),time,y0,options,k);

S_su_model  = y(:,1);
S_but_model = y(:,2);
S_ac_model  = y(:,4);
S_lac_model = y(:,6);
X_model     = y(:,21);

A = sum((S_su_obs - S_su_model).^2);
B = sum((S_lac_obs - S_lac_model).^2);
C = sum((S_ac_obs - S_ac_model).^2);
D = sum((S_but_obs - S_but_model).^2);
E = sum((X_obs - X_model).^2);

ss = A+B+C+D+E

```

ANEXO 3 – Solucionador de equações diferenciais ordinárias, vetores de parâmetros iniciais e funções que chamam o algoritmo MCMC

```

clear model data parama options
load('Dados_Vivian')
load('spline_data')

% B-splined experimental data
data.ydata =[0.00    22.38    0.23    0.00    0.01    0.20    7.70
              3.06    20.30    0.28    0.08   -0.06    0.32    7.16
              6.13    17.20    0.51    0.19   -0.11    0.58    7.11
              9.19    13.76    0.89    0.34   -0.12    0.95    7.24
              12.26   10.64    1.40    0.52   -0.11    1.42    7.26
              15.32    8.53    2.04    0.72   -0.08    1.97    6.92
              18.39    8.09    2.77    0.94   -0.04    2.58    6.40
              21.45    9.02    3.57    1.19    0.02    3.23    5.96
              24.52    9.39    4.44    1.45    0.08    3.89    5.64
              27.58    7.37    5.34    1.72    0.15    4.55    5.42
              30.65    4.47    6.26    2.02    0.22    5.11    5.25
              33.71    2.65    7.18    2.34    0.28    5.47    5.13
              36.78    1.68    8.07    2.69    0.32    5.54    5.03
              39.84    1.18    8.93    3.09    0.33    5.27    4.95
              42.91    0.91    9.73    3.46    0.32    4.80    4.88
              45.97    0.77    10.47   3.72    0.27    4.44    4.82
              49.03    0.73    11.15   3.89    0.22    4.20    4.78
              52.10    0.72    11.75   4.03    0.15    4.08    4.75
              55.16    0.71    12.29   4.16    0.07    4.04    4.73
              58.23    0.70    12.74   4.27    0.00    4.07    4.72
              61.29    0.69    13.11   4.37   -0.06    4.15    4.72
              64.36    0.68    13.39   4.45   -0.11    4.25    4.73
              67.42    0.67    13.57   4.52   -0.14    4.35    4.75
              70.49    0.66    13.66   4.57   -0.14    4.44    4.78
              73.55    0.65    13.64   4.60   -0.11    4.50    4.81
              76.62    0.63    13.51   4.61   -0.04    4.49    4.86
              79.68    0.62    13.28   4.61    0.08    4.43    4.90
              82.75    0.61    12.96   4.58    0.24    4.34    4.96
              85.81    0.60    12.56   4.54    0.46    4.23    5.02
              88.87    0.59    12.08   4.49    0.73    4.10    5.08
              91.94    0.58    11.55   4.42    1.07    3.99    5.15
              95.00    0.56    10.96   4.34    1.46    3.91    5.22
              98.07    0.55    10.33   4.25    1.92    3.87    5.30
             101.13    0.54    9.68    4.16    2.45    3.89    5.37
             104.20    0.53    9.00    4.05    3.06    3.99    5.45
             107.26    0.52    8.32    3.94    3.74    4.17    5.53
             110.33    0.50    7.64    3.82    4.50    4.40    5.61
             113.39    0.49    6.97    3.70    5.35    4.60    5.69
             116.46    0.48    6.33    3.57    6.28    4.69    5.76
             119.52    0.47    5.72    3.45    7.29    4.61    5.84
             122.59    0.46    5.14    3.32    8.31    4.40    5.91
             125.65    0.44    4.60    3.20    9.25    4.13    5.98
             128.72    0.43    4.09    3.07   10.02    3.84    6.05
             131.78    0.42    3.61    2.95   10.55    3.62    6.11
             134.84    0.41    3.16    2.83   10.84    3.47    6.17
             137.91    0.40    2.74    2.71   10.92    3.37    6.22
             140.97    0.38    2.36    2.60   10.83    3.33    6.27
             144.04    0.37    2.00    2.49   10.61    3.33    6.32
             147.10    0.36    1.67    2.39   10.30    3.36    6.37
             150.17    0.35    1.37    2.30    9.94    3.41    6.41
             153.23    0.34    1.10    2.21    9.57    3.46    6.45

```

```

156.30 0.33 0.85 2.13 9.22 3.52 6.49
159.36 0.32 0.64 2.06 8.94 3.57 6.52
162.43 0.31 0.44 2.00 8.74 3.60 6.55
165.49 0.30 0.27 1.95 8.62 3.63 6.58
168.56 0.29 0.13 1.92 8.59 3.65 6.61
171.62 0.28 0.01 1.89 8.64 3.66 6.63
174.68 0.27 -0.09 1.88 8.79 3.68 6.65
177.75 0.26 -0.16 1.88 9.03 3.70 6.67
180.81 0.25 -0.21 1.89 9.37 3.73 6.69
183.88 0.24 -0.24 1.92 9.80 3.76 6.71
186.94 0.23 -0.25 1.97 10.34 3.81 6.72
190.01 0.22 -0.24 2.03 10.97 3.88 6.73
193.07 0.21 -0.22 2.10 11.66 3.95 6.75
196.14 0.20 -0.18 2.18 12.35 4.01 6.76
199.20 0.19 -0.14 2.25 12.98 4.05 6.76
202.27 0.19 -0.10 2.31 13.50 4.05 6.77];
x = data.ydata(:,1);

% Initial concentrations are saved in |data| to be used in sum
of
% squares function.
S_su0 = 0;
S_bu0 = 0.000;
S_pro0 = 0.000;
S_ac0 = 0.000;
S_h20 = 1.0e-9;
S_lac0 = 0.55;
S_IC0 = 0.15268;
S_IN0 = 0.13023;
S_I0 = 0.85;
X_I0 = 0.0001;
S_cat0 = 0.04;
S_an0 = 0.02;
S_bum0 = 0.0001;
S_prom0 = 0.0001;
S_acm0 = 0.0001;
S_hco3m0= 0.1428;
S_nh30 = 0.00409;
S_lacm0 = 0.0001;
h20 = 1e-5;
co20 = 1e-5;
X_sugar = 0.18 % Aqui entra concentração de fermentadores
primários
X_celon = 0.2 - X_sugar;
X_ch = 22.367;
data.y0 = [S_su0; S_bu0; S_pro0; S_ac0; S_h20; S_lac0; S_IC0;
S_IN0; S_I0;...
X_I0; S_cat0; S_an0; S_bum0; S_prom0; S_acm0;
S_hco3m0;S_nh30;...
S_lacm0; h20; co20; X_sugar; X_celon; X_ch;]; %

%%
% Refine the first guess for the parameters with |fmincon| and

```

```

% calculate residual variance as an estimate of the model
error variance.

%%          FMINCON
% initial guess
k_m_su      = 0.54747;
K_S_su      = 0.5;
k_m_ce      = 0.65;
K_S_ce      = 5;
Y_su        = 0.17;
Y_ce        = 0.11;%
k_hyd_ch    = 0.052295;

%vetor de valores iniciais
k00 = [k_hyd_ch, k_m_su, Y_su, k_m_ce, Y_ce]; % , X_su, X_ce

% restrições lineares
A = [];
b = [];
Aeq = []; %
beq = []; %

% limites
lb = [0, 0, 0, 0, 0];
ub = [1, 5, 0.5, 10, 0.5];

tic
[k0, ss0] =
fmincon(@ADM1_2X_SS_mcmc, k00, A, b, Aeq, beq, lb, ub, [], [], data);
toc

%%          MCMCRUN

params = {
%          name,          , init,          min,          max
    {'k_h_y_d_c_h'      , k0(01),          0,           1}
    {'k_m_s_u'          , k0(02),          0,          10}
    {'Y_s_u'            , k0(03),          0.10,        0.5}
    {'k_m_c_e'          , k0(04),          0,          10}
    {'Y_c_e'            , k0(05),          0.05,        0.5}
};

mse = ss0/(length(data.ydata)-4);
model.ssfun = @ADM1_2X_SS_mcmc;
model.sigma2 = mse;

options.nsimu = 5000; % Número de iterações cadeia de Markov
options.updatesigma = 1;

%%
[results, chain, s2chain] = mcmcrun(model, data, params, options);

```

```

%% MCMC plots
figure(1); clf
mcmplot(chain, [], results, 'chainpanel')
figure(2); clf
mcmplot(chain, [], results, 'pairs');
figure(3); clf
mcmplot(chain, [], results, 'denspanel', 1);
figure(4); clf
mcmplot(sqrt(s2chain), [], [], 'dens', 5)
title('error std')
%%
% Função |chainstats| lista estatísticas relacionadas as
estimativas de Monte Carlo e seus erros
chainstats(chain, results)
%%
mcmean = mean(chain);

% Resolver modelo de ODE nos seguintes tempos
tspan=[0.00, 14.21,
16.24,23.00,25.03,29.09,37.89,41.95,50.06,66.30,74.42, 85.24,
104.20,116.40,128.50,157.00,188.10,189.40,198.90,211.10,228.70
, 240.80, 260.50,278.70,286.20,303.80];
ic
options = odeset('RelTol', 1e-6, 'AbsTol', 1e-6);
[T,solution] = ode15s(@(t,y,k)
ADM1_2X_ODE_mcmc(t,y,k),tspan,data.y0,options,mcmean);
toc

%Simulation results vector
r.S_su      = solution(:,1);
r.S_bu      = solution(:,2);
r.S_pro     = solution(:,3);
r.S_ac      = solution(:,4);
r.S_h2      = solution(:,5);
r.S_lac     = solution(:,6);
r.S_IC      = solution(:,7);
r.S_IN      = solution(:,8);
r.S_I       = solution(:,9);
r.X_I       = solution(:,10);
r.S_cat     = solution(:,11);
r.S_an      = solution(:,12);
r.S_bum     = solution(:,13);
r.S_prom    = solution(:,14);
r.S_acm     = solution(:,15);
r.S_hco3m   = solution(:,16);
r.S_nh3     = solution(:,17);
r.S_lacm    = solution(:,18);
r.S_gas_h2  = solution(:,19);
r.S_gas_co2 = solution(:,20);
r.X_su      = solution(:,21);

```

```

r.X_ce      = solution(:,22);
r.X_ch      = solution(:,23);
r.T         = T; %save simulation time
%%

% Cálculo de pH

R           = 0.083145;
T_base     = 298.15; %K
T_op       = 308.15; %K
K_w        = 1e-14*exp(55900/(R*100)*(1/T_base - 1/T_op)); %M
Theta = solution(:,11) + solution(:,8) - solution(:,17) -
solution(:,16) - solution(:,15)/64 -solution(:,14)/112 -
solution(:,13)/160 ...
- solution(:,12) - solution(:,18)/96.38; %
Sh = -Theta/2 + sqrt(Theta.^2 + 4*K_w)/2;

if(Sh <= 0)
Sh = 1e-12;
end

pH_calc = -log10(Sh);

```