

ELIAS GABRIEL FERNANDES DE REZENDE

MODELAGEM MATEMÁTICA DA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS POR
CULTURAS MISTAS A PARTIR DE VINHAÇA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de
São Carlos, da Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre
em Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Rogers Ribeiro

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos, SP

2022

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).

F363m Fernandes de Rezende, Elias Gabriel
 Modelagem matemática da produção de
 polihidroxialcanoatos por culturas mistas a partir de
 vinhaça de cana-de-açúcar / Elias Gabriel Fernandes de
 Rezende; orientador Rogers Ribeiro. São Carlos, 2022.

 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, 2022.

 1. polihidroxialcanoatos. 2. vinhaça de
 cana-de-açúcar. 3. culturas mistas. 4. MCMC. 5.
 modelagem. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **ELIAS GABRIEL FERNANDES DE REZENDE**.

Título da dissertação: "Modelagem matemática da produção de polihidroxialcanoatos por culturas mistas a partir de vinhaça de cana-de-açúcar".

Data da defesa: 11/03/2022.

Comissão Julgadora

Resultado

Prof. Dr. **Rogers Ribeiro** (Orientador)

Aprovado

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

Prof. Dr. **Theo Syrto Octavio de Souza**

Aprovado

(Escola Politécnica/EP-USP)

Prof. Dr. **Julio Cesar de Souza Inacio Gonçalves**

Aprovado

(Universidade Federal do Triângulo Mineiro/UFTM)

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

Prof. Titular **Marcelo Zaiat**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

Aos meus pais, Luiz Mauro e Hélen e a minha irmã Luíza.
A todos os professores que tive a oportunidade de aprender.

Aos meus amigos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Luiz Mauro e Hélen, por tudo, pelo apoio em seguir estudando, pelo respeito, por sempre me ensinarem que o conhecimento e a educação são a base de tudo! Espero que um dia vocês sintam orgulho de mim da mesma maneira que tenho orgulho de ser filho de vocês! Vocês são meu maior exemplo! Amo muito vocês!!

A Luíza, minha irmã, pelo companheirismo e amizade durante esses anos!

Quero agradecer ao Professor Rogers pela paciência e orientação, por ter confiado em meu trabalho no início e durante todo este processo, por todo o conhecimento passado, pelo respeito e pelo apoio, sempre priorizando o que seria melhor pra mim! Muito obrigado!

Um agradecimento muito especial ao Matheus, grande amigo e companheiro desde 2013, que me atura aqui em São Carlos e ainda vai ter que me aturar por mais tempo. Muito obrigado pela companhia, pelas discussões e contribuições, sem seu olhar crítico este trabalho estaria mais pobre. Espero continuar tendo você como amigo e companheiro de pesquisa pelo resto da vida!

Aos professores que fizeram parte da minha educação, desde o ensino médio, muito obrigado pelos ensinamentos! Em especial a professora Mônica, professor Júlio e Geoffroy que abriram os caminhos da pesquisa pra mim na UFTM!

Quero agradecer a todos meus tios e tias (são muitos, kkkk), em especial a Tia Giza, minha madrinha e que sempre esteve ao meu lado durante toda minha vida. Não podia deixar de mencionar os tios Horó, Paulo e Regina, tenho certeza que estariam muito felizes por mim por estar trilhando este caminho e sempre buscando o conhecimento!

Ao GHDO, pela confiança e apoio durante a realização do trabalho! A Pâmela, pelas contribuições e conhecimento que você tem me passado, isso não tem preço! Ao senhor Will, que no pouco tempo que passou aqui em casa, conseguiu me ensinar sobre rotas metabólicas, pesca e churrasco! Ao Marco, pelo companheirismo durante as disciplinas!

Confesso que muitas coisas passaram pela minha cabeça quando fui parar para refletir sobre esses dois anos de mestrado. Sentimentos bons e ruins, mas acima de tudo, feliz com o resultado e com tudo que aprendi. Foram dois anos atípicos e um trabalho de mestrado mais ainda, feito inteiramente do meu quarto, sem contato físico com o laboratório e com as experiências que isso me traria. Por isso, tenho que reconhecer o esforço realizado por mim para poder chegar até aqui e me lembrar que é só o começo, e que muitas conquistas e dificuldades virão! Finalizo este mestrado com um gostinho de quero mais e com muita sede para continuar estudando e trilhando o caminho do conhecimento!

“Oh! Que saudades que tenho
Da aurora da minha vida,
Da minha infância querida
Que os anos não trazem mais!
Que amor, que sonhos, que flores,
Naquelas tardes fagueiras
À sombra das bananeiras,
Debaixo dos laranjais!...”

Meus oito anos - Casimiro de Abreu (1839 – 1860) – Poeta

“Já faz tempo, eu vi você na rua
Cabelo ao vento, gente jovem reunida
Na parede da memória
Esta lembrança é o quadro que dói mais

Minha dor é perceber
Que apesar de termos feito tudo, tudo o que fizemos
Ainda somos os mesmos, e vivemos
Ainda somos os mesmos, e vivemos
Como os nossos pais”

*Como nossos pais (1976) – Belchior (1946-2017) –
músico e compositor*

RESUMO

REZENDE, E.G.F. **Modelagem matemática da produção de polihidroxialcanoatos por culturas mistas a partir de vinhaça de cana-de-açúcar.** 2022. 148 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

Os polímeros microbianos são uma classe de materiais considerados uma alternativa aos polímeros derivados do petróleo, pois são biodegradáveis e produzidos a partir de matérias-primas renováveis. Os polihidroxialcanoatos (PHA) é uma família de polímeros microbianos que tem se destacado nos últimos anos. PHA são poliésteres sintetizados intracelularmente como fonte de energia e carbono por vários microrganismos. Atualmente, a produção e comercialização de PHA em grandes escalas é prejudicada pelo alto custo produtivo, que está associado ao uso de substratos bem definidos e culturas puras de microrganismos. Dessa maneira, os PHA têm atraído a atenção de pesquisadores no sentido de viabilizar um processo de produção economicamente viável e, eventualmente, aumentar a produção para minimizar os problemas ambientais causados pelo uso de plásticos derivados do petróleo. A opção mais promissora para isso é a combinação de consórcios microbianos e águas residuárias. Diversos estudos ao redor do mundo já foram conduzidos nesse sentido, incluindo experiências em escala piloto. Entretanto, estudos brasileiros que investigaram a produção de PHA aplicando consórcios microbianos e águas residuárias são escassos. Recentemente, esse cenário foi impulsionado por um trabalho, no qual foi avaliado o reaproveitamento de uma água residuária abundante no Brasil, a vinhaça de cana-de-açúcar, para produção de PHA. Os resultados encontrados foram promissores e mais pesquisas são necessárias para resolver os gargalos e viabilizar o processo de produção de PHA a partir de vinhaça de cana-de-açúcar. Nesse sentido, o presente trabalho visa a construção de modelos matemáticos que descrevam a produção de PHA a partir de vinhaça de cana-de-açúcar. Tais modelos podem ser usados para estimar e identificar parâmetros cinéticos e estequiométricos característicos do processo, auxiliando na elaboração de experimentos e previsão do efeito de variáveis operacionais. Os modelos desenvolvidos nesta pesquisa descrevem as etapas de seleção de espécies produtoras de PHA e de acumulação de PHA. O modelo de seleção descreve o processo ocorrendo em um reator de bateladas sequenciais (SBR) submetido a condições de *feast-famine* e fornecimento desacoplado de carbono e nitrogênio sendo capaz de simular dados experimentais em diferentes condições operacionais. O modelo de acumulação descreve o processo em um reator de batelada alimentada e considera que tanto o consumo de substrato e produção de PHA são processos que ocorrem sem inibição, além disso o modelo de acumulação também considera a evolução de biomassa dentro do reator. Todos os modelos construídos foram submetidos a uma análise de sensibilidade local relativa a parâmetros e variáveis sendo possível identificar os parâmetros mais influentes dos processos e diminuir o número de parâmetros a serem determinados. Para determinação dos parâmetros, foi aplicado o método de otimização de parâmetros de Monte Carlo com Cadeia de Markov (MCMC), que também permitiu validar estatisticamente os modelos. A utilização destas técnicas fez com que os modelos descrevessem de forma correta o processamento da vinhaça de cana-de-açúcar em PHA e permitiu analisar o impacto que operar o reator SBR de seleção sob diferentes relações DQO_v/Nitrogênio possui nos parâmetros livres dos modelos. Foi constatado que o consórcio microbiano selecionado sob maior relação DQO_v/Nitrogênio apresentou maior rendimento de PHA referente a ácidos orgânicos ($Y_{PHA/H.Org}$) (0.740 ± 0.017). Além disso, o consórcio microbiano selecionado sem suplementação externa de nitrogênio apresentou uma resposta de crescimento em detrimento a acumulação de PHA, reforçado pelo maior crescimento de biomassa e rendimento de biomassa referente a ácidos orgânicos ($Y_{X/H.Org}$) (0.248 ± 0.020) observados nas corridas de acumulação.

Palavras-chave: polihidroxialcanoato – vinhaça de cana-de-açúcar– culturas mistas – Box-Draper – MCMC

ABSTRACT

REZENDE, E.G.F. **Modeling polyhydroxyalkanoates production from sugarcane vinasse by mixed microbial cultures**. 2022. 148 p. Dissertation (Master's degree) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

Microbial polymers are a class of materials that are considered an alternative to petroleum-based polymers because they are biodegradable and produced from renewable raw materials. Polyhydroxyalkanoates (PHA) is a family of microbial polymers that has come to prominence in recent years. PHA are polyesters synthesized intracellularly as a source of energy and carbon by various microorganisms. Currently, large-scale production and commercialization of PHA is hampered by the high production cost, which is associated with the use of well-defined substrates and pure cultures of microorganisms. Thus, PHA have attracted the attention of researchers in order to enable an economically viable production process and, eventually, increase production to minimize the environmental problems caused by the use of petroleum-based plastics. The most promising option for this is the combination of microbial consortia and wastewater. Several studies around the world have already been conducted in this direction, including pilot-scale experiments. However, Brazilian studies investigating the production of PHA by applying microbial consortia and wastewater are scarce. Recently, this scenario was boosted by a study that evaluated the reuse of an abundant wastewater in Brazil, the sugarcane vinasse, for PHA production. The results were promising and more research is necessary to solve the bottlenecks and make the process of PHA production from sugarcane vinasse feasible. In this sense, the present work aims to build mathematical models that describe the production of PHA from sugarcane vinasse. These models can be used to estimate and identify kinetic and stoichiometric parameters characteristic of the process, helping in the design of experiments and predicting the effect of operational variables. The models developed in this research describe the stages of selection of PHA-producing species and PHA accumulation. The selection model describes the process taking place in a sequencing batch reactor (SBR) under feast-famine conditions and uncoupled nitrogen supply and is capable of simulating experimental data under different operating conditions. The accumulation model describes the process in a fed-batch reactor and considers both substrate consumption and PHA production to be processes that occur without inhibition, and the accumulation model also considers the evolution of biomass within the reactor. All the built models were submitted to a local sensitivity analysis concerning parameters and variables being possible to identify the most influential parameters of the processes and decrease the number of parameters to be determined. For this, the parameter optimization method of Monte Carlo with Markov Chain (MCMC) was applied, which also allowed to statistically validate the models. The use of these techniques made the models correctly describe the processing of sugarcane vinasse into PHA and allowed to analyze the impact that operating the selection SBR reactor under different COD_t/Nitrogen ratios has on the free parameters of the models. It was found that the microbial consortium selected under higher COD_t/Nitrogen ratio showed higher PHA yield related to organic acids ($Y_{PHA/H.Org}$) (0.740 ± 0.017). Furthermore, the microbial consortium selected without external nitrogen supplementation showed a growth response rather than PHA accumulation, reinforced by the higher biomass growth and biomass yield related to organic acids ($Y_{X/H.Org}$) (0.248 ± 0.020) observed in the accumulation runs.

Keywords: polyhydroxyalkanoates – sugarcane vinasse– mixed culture – Box-Draper – MCMC

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química geral de um monômero de PHA.	27
Figura 2 - Rotas metabólicas da síntese de PHA.	29
Figura 3 - Processo de produção de PHA por CMM em três estágios.....	33
Figura 4 - Rota metabólica de formação de PHB a partir de ácido acético.	40
Figura 5 - Esquema da operação dos reatores operados na etapa experimental.	61
Figura 6 – Sequência de passos empregados para a construção dos modelos de seleção e acumulação deste trabalho.	63
Figura 7 – Caracterização detalhada de um ciclo representativo do SBR de seleção da condição operacional II incluindo os resultados simulados pelo modelo e dados experimentais.....	76
Figura 8 - Previsão da incerteza do modelo de seleção para cada variável de estado com 50%, 90%, 95% e 99% de confiança. A linha contínua representa os resultados modelados e os quadrados representam os dados experimentais.....	77
Figura 9 - Validação direta do modelo de seleção. Figura (a): fase operacional I – DQOt/N 15; Figura (b): fase operacional III – DQOt/N 40; Figura (c): fase operacional IV – DQOt/N 80.....	80
Figura 10 - – Caracterização detalhada de uma corrida de acumulação em reator de batelada alimentada com biomassa coletada durante o período de estabilidade operacional da condição I, incluindo os resultados simulados pelo modelo e dados experimentais.	84
Figura 11 - Previsão da incerteza do modelo de acumulação para cada variável de estado com 50%, 90%, 95% e 99% de confiança. A linha contínua representa os resultados modelados e os quadrados representam os dados experimentais.....	85
Figura 12 - Validação direta do modelo de acumulação. Figura (a): fase operacional II; Figura (b): fase operacional III; Figura (c): fase operacional IV.	87
Figura 13 – Caracterização detalhada das corridas de acumulação em reator de batelada alimentada com biomassa coletada no SBR durante o período de estabilidade operacional incluindo os resultados simulados pelo modelo de acumulação melhorado e os dados experimentais para as condições (a) I, (b) II, (c) III e (d) IV.	91
Figura 14 - Previsão da incerteza do modelo de acumulação melhorado da condição operacional II para cada variável de estado com 50%, 90%, 95% e 99% de confiança. A linha contínua representa os resultados modelados e os quadrados representam os dados experimentais.....	92
Figura 15 - Previsão da incerteza do modelo de acumulação melhorado da condição operacional III para cada variável de estado com 50%, 90%, 95% e 99% de confiança. A linha contínua representa os resultados modelados e os quadrados representam os dados experimentais.....	93

Figura 16 - Previsão da incerteza do modelo de acumulação melhorado da condição operacional IV para cada variável de estado com 50%, 90%, 95% e 99% de confiança. A linha contínua representa os resultados modelados e os quadrados representam os dados experimentais.....94

Figura 17 - Caracterização detalhada da corrida de acumulação em reator de batelada alimentada com melaço de cana acidificado e biomassa selecionada no SBR durante o período de estabilidade operacional da condição I.98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Águas residuárias utilizadas para produção de PHA.	37
Tabela 2 - Modelo cinético de Tamis et al. (2014a) adaptado para processos <i>feast-famine</i> .	45
Tabela 3 - Características físico-químicas da vinhaça acidificada utilizada no SBR de seleção e nos ensaios de acumulação.	61
Tabela 4 - Características físico-químicas do melaço acidificado utilizado nos ensaios de acumulação.	62
Tabela 5 – Rotas metabólicas consideradas no modelo de seleção.	65
Tabela 6 – Resultados numéricos da análise de sensibilidade relativa local para parâmetros e variáveis para o modelo de seleção. Os valores em negrito representam os parâmetros mais influentes que foram calibrados e otimizados pelo método MCMC.	73
Tabela 7 -Parâmetros extraídos da literatura.	73
Tabela 8 - Parâmetros livres otimizados pela MCMC para 50.000 iterações para o modelo de seleção, assim como as informações estatísticas do método e resultados para os respectivos parâmetros presentes na literatura.	75
Tabela 9 – Parâmetros livres otimizados pelo MCMC para o modelo de seleção na condição operacional IV do SBR.	79
Tabela 10 - Resultados numéricos da análise de sensibilidade relativa local para parâmetros e variáveis para o modelo de acumulação. Os valores em negrito representam os parâmetros mais influentes que foram calibrados e otimizados pelo método MCMC.	81
Tabela 11 - Parâmetros livres otimizados pela MCMC para 10.000 iterações para o modelo de acumulação, assim como as informações estatísticas do método e resultados para os respectivos parâmetros presentes na literatura.	82
Tabela 12 - Resultados numéricos da análise de sensibilidade relativa local para parâmetros e variáveis para o modelo de acumulação melhorado. Os valores em negrito representam os parâmetros mais influentes que foram calibrados e otimizados pelo método MCMC.	89
Tabela 13 - Parâmetros livres otimizados pelo MCMC para o modelo de acumulação melhorado nas condições operacionais I, II, III e IV.	90
Tabela 14 - Parâmetros livres otimizados pelo MCMC com 10000 iterações para o modelo de acumulação melhorado na corrida de acumulação com biomassa coletada do SBR na condição operacional I usando melaço de cana acidificado, assim como informações estatísticas do método.	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AnPBR: reator anaeróbio de leito empacotado;

AnSTBR: reator anaeróbio de leito fixo estruturado;

ATP: adenosina trifosfato;

CH₄: metano;

CO₂: dióxido de carbono;

COV: carga orgânica volumétrica;

C/N: relação carbono por nitrogênio;

CMM: cultura mista microbiana;

DQO: demanda química de oxigênio;

DQOr: demanda química de oxigênio residual;

DQOs: demanda química de oxigênio solúvel;

DQOt: demanda química de oxigênio total;

FF: *feast-famine*;

GAO: *glycogen accumulating organisms* ;

H₂: hidrogênio;

H.Org: ácidos orgânicos;

H.Org/DQO: relação ácidos orgânicos por demanda química de oxigênio;

lcl-PHA: *long chain lenght polyhydroxyalkanoate*;

MCMC: *Monte Carlo Markov Chain*;

mcl-PHA: *medium chain lenght polyhydroxyalkanoate*;

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo;

NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato;

PAO: *polyphosphate accumulating organisms* ;

P/O: eficiência de fosforilação oxidativa;

PHA: polihidroxialcanoatos;

PHB: polihidroxibutirato;

PHBV: polihidroxibutirato-valerato;

pH: potencial hidrogeniônico;

PHH: polihidroxihexanoato;

SBR: reator de bateladas sequenciais;

scl-PHA: *short chain lenght polyhydroxyalkanoate*;

SRT: tempo de retenção celular;

SSV: sólidos suspensos voláteis;

SR: substrato residual;

TCA: ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs);

Xa: biomassa ativa;

Xr: biomassa residual;

LISTA DE SÍMBOLOS

- α : expoente do termo de inibição;
- $C_{H.Org}$: concentração de ácidos orgânicos;
- C_{PHA} : concentração de polihidroxicanoatos;
- C_S : concentração de substrato;
- C_{Sr} : concentração de substrato residual;
- C_X^0 : concentração inicial de biomassa;
- C_X : concentração de biomassa;
- C_{Xa} : concentração de biomassa ativa;
- DQO_t/Nitrogênio**: relação demanda química de oxigênio total por nitrogênio;
- f_{PHA} : conteúdo intracelular de polihidroxicanoatos;
- k_{PHA} : constante de degradação de polihidroxicanoatos;
- K**: constante de meia saturação de Monod;
- K_{DQOr} : constante de meia saturação de Monod referente a demanda química de oxigênio residual;
- $K_{H.Org}$: constante de meia saturação de Monod referente a ácidos orgânicos;
- K_S : constante de meia saturação de Monod referente a substrato;
- m_{DQOr} : coeficiente de manutenção celular referente a demanda química de oxigênio residual;
- $m_{H.Org}$: coeficiente de manutenção celular referente a ácidos orgânicos;
- m_S : coeficiente de manutenção celular referente a substrato;
- q_{DQOr} : velocidade de consumo de demanda química de oxigênio residual;
- $q_{H.Org}$: velocidade de consumo de ácidos orgânicos;
- q_{PHA} : velocidade de conversão de polihidroxicanoatos;
- q_S : velocidade de consumo de substrato;
- q_{Sr} : velocidade de consumo de substrato residual;
- q_{DQOr}^{max} : velocidade máxima de consumo de demanda química de oxigênio residual;
- $q_{H.Org}^{max}$: velocidade máxima de consumo de ácidos orgânicos;
- q_S^{max} : velocidade máxima de consumo de substrato;
- q_{Sr}^{max} : velocidade máxima de consumo de substrato residual;
- $Y_{PHA/H.Org}$: rendimento de polihidroxicanoatos referente a ácidos orgânicos;
- $Y_{PHA/S}$: rendimento de polihidroxicanoatos referente a substrato;
- $Y_{X/S}$: rendimento de biomassa referente a substrato;
- $Y_{Xa/DQOr}$: rendimento de biomassa ativa referente a demanda química de oxigênio residual;
- $Y_{Xa/H.Org}$: rendimento de biomassa ativa referente a ácidos orgânicos;

$Y_{Xa/PHA}$: rendimento de biomassa ativa referente a polihidroxialcanoatos;

$Y_{Xo/Sr}$: rendimento de biomassa não produtora de polihidroxialcanoatos referente a substrato residual;

$Y_{Xp/PHA}$: rendimento de biomassa produtora de polihidroxialcanoatos referente a polihidroxialcanoatos;

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	22
2	HIPÓTESE E OBJETIVO DE PESQUISA	25
3	REVISÃO DE LITERATURA	27
3.1	POLIHIDROXIALCANOATOS	27
3.2	PRODUÇÃO DE PHA A PARTIR DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS	32
3.3	MODELAGEM MATEMÁTICA DE PROCESSOS <i>FEAST-FAMINE (FF)</i>	39
3.4	MODELAGEM MATEMÁTICA DA ETAPA DE ACUMULAÇÃO	46
3.5	MÉTODOS PARA ESTIMATIVA DE PARÂMETROS E VALIDAÇÃO ESTATÍSTICA DO MODELO	48
3.5.1	Método de minimização de Box-Draper	48
3.5.2	Método de simulação de Monte Carlo e Cadeia de Markov	51
3.5.3	Método de convergência de Geweke.....	54
3.5.4	Análise de sensibilidade.....	55
4	MATERIAL E MÉTODOS E ETAPAS DE PESQUISA.....	59
4.1	DADOS EXPERIMENTAIS: SBR DE SELEÇÃO E ENSAIOS DE ACUMULAÇÃO	59
4.2	ETAPA DE MODELAGEM.....	63
4.2.1	Fase 1: Modelagem do reator SBR de seleção	63
4.2.2	Fase 2: Modelagem do reator de acumulação	66
4.3	ESTIMAÇÃO DOS PARÂMETROS LIVRES	68
4.4	IMPLEMENTAÇÃO DOS MODELOS	70
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1	MODELO DE SELEÇÃO.....	72
5.1.1	Análise de sensibilidade para o modelo de seleção.....	72
5.1.2	Calibração do modelo de seleção	73
5.1.3	Validação direta do modelo de seleção.....	78
5.2	MODELO DE ACUMULAÇÃO	81
5.2.1	Análise de sensibilidade para o modelo de acumulação	81
5.2.2	Calibração do modelo de acumulação.....	81
5.2.3	Validação direta do modelo de acumulação	86
5.2.4	Melhorias no modelo de acumulação para descrever as condições operacionais II, III e IV.	88
5.3	VALIDAÇÃO CRUZADA DO MODELO DE ACUMULAÇÃO	97
6	CONCLUSÕES	99

7	RECOMENDAÇÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	101
	REFERÊNCIAS	102
	APÊNDICES.....	112

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os polihidroxialcanoatos (PHA) são uma família de poliésteres de base biológica sintetizada intracelularmente, como um composto de carbono e armazenamento de energia, por uma variedade de microrganismos. São considerados uma alternativa aos plásticos à base de petróleo porque são biodegradáveis e produzidos a partir de recursos renováveis. (BRAUNEGG; LEFEBVRE; GENSER, 1998; REDDY et al., 2003). Atualmente, os PHA são produzidas industrialmente por culturas puras que podem acumular até 90% de seu peso de células secas (KOLLER, 2018). Em um processo de cultura pura, substratos com alta pureza e condições estéreis são necessários para evitar a contaminação cruzada com espécies não acumuladoras de PHA, resultando em altos custos de produção em comparação com plásticos à base de petróleo (RAZA; ABID; BANAT, 2018). Uma opção promissora para reduzir os custos de produção é o uso de culturas não axênicas, como aquelas encontradas em lodo ativado, e resíduos orgânicos ou águas residuárias como matéria-prima. A aplicação de resíduos sólidos e águas residuárias para produzir PHA oferece o potencial para recuperar recursos valiosos a partir de resíduos orgânicos (KLEEREBEZEM; VAN LOOSDRECHT, 2007). A produção de PHA a partir de resíduos orgânicos e águas residuárias é fundamentada em um princípio ecológico de seleção, no qual os microrganismos são cultivados em um ambiente seletivo, compreendendo presença alternada (*feast*) e ausência (*famine*) de substrato externo, e é referida como um processo de *feast-famine*. Estas condições dinâmicas levam à seleção de microrganismos que utilizam o armazenamento de PHA como estratégia para prosperar (JOHNSON et al., 2009). O processo de produção de PHA com base em resíduos compreende três etapas: (1) pré-tratamento acidogênico para converter a demanda química de oxigênio biodegradável (COD) em substratos adequados para a produção de PHA, tais como ácidos orgânicos (H.Org); (2) o efluente do primeiro reator é usado para estabelecer uma cultura capaz de acumular PHA, aplicando condições de *feast-famine* em um reator de bateladas sequenciais (SBR); e (3) a cultura altamente enriquecida é submetida a ciclos de acumulação em um reator de batelada alimentada para produzir PHA (KLEEREBEZEM; VAN LOOSDRECHT, 2007; REIS et al., 2003; TAMIS et al., 2014a).

A natureza das águas residuárias e sua composição são fatores fundamentais que influenciam o processo de *feast-famine*, afetando a composição da cultura microbiana mista (MMC) e, conseqüentemente, seu comportamento cinético e conteúdo final de PHA (ALBUQUERQUE; TORRES; REIS, 2010; JIANG et al., 2011a). A vinhaça de cana de açúcar

é uma água residuária com potencial para ser utilizada como substrato para a produção de PHA em um processo de três etapas, pois tem um alto teor de matéria orgânica que pode ser facilmente convertida em ácidos orgânicos (ENG SÁNCHEZ et al., 2021). Atualmente, a vinhaça de cana de açúcar, que é produzida após destilação para obter etanol em refinarias de cana de açúcar, é aplicada em lavouras de cana de açúcar como fertilizante. Apesar de ser amplamente difundida, esta prática apresenta riscos como a salinização do solo, contaminação das águas subterrâneas e lixiviação de metais pesados. Além disso, a fertirrigação de culturas com vinhaça bruta de cana-de-açúcar significa desperdiçar o potencial para a recuperação de energia e materiais de valor agregado (Fuess et al., 2017). Nos últimos anos, a digestão anaeróbia da vinhaça de cana tem sido amplamente estudada para a recuperação de biometano (KIYUNA; FUESS; ZAIAT, 2017) e biohidrogênio (FUESS et al., 2018; FUESS; ZAIAT; DO NASCIMENTO, 2019). De Oliveira et al. (2019) avaliaram a vinhaça de cana como um substrato para a produção de PHA por MMC. No referido trabalho, foi avaliado o efeito da taxa de carga orgânica aplicada (OLR) sobre um SBR submetido a um regime de *feast-famine* e alimentado com vinhaça acidificada de cana de açúcar. A vinhaça de cana de açúcar mostrou ser um substrato adequado para estabelecer uma MMC com uma significativa capacidade de armazenamento de PHA.

Para entender, otimizar e aumentar a produção de PHA a partir de vinhaça de cana de açúcar modelos matemáticos são ferramentas úteis. Os modelos podem ser usados para descrever o comportamento do processo, estimando parâmetros cinéticos e estequiométricos que permitem a previsão do efeito das variáveis operacionais. Vários modelos foram desenvolvidos para descrever, compreender, projetar e otimizar a produção de PHA por culturas mistas (CHEN et al., 2016; JIANG et al., 2011a; JOHNSON; KLEEREBEZEM; VAN LOOSDRECHT, 2009; PARDELHA et al., 2014; TAMIS et al., 2014a). Todos os modelos mencionados foram capazes de descrever o processo de *feast-famine*, gerando resultados similares aos dados experimentais. Os resultados dos modelos (gerados a partir de parâmetros estimados) são normalmente comparados aos dados experimentais para estimar os parâmetros. Entretanto, a simples comparação dos resultados do modelo e dos dados experimentais pode levar a interpretações errôneas porque pode haver infinitas combinações de valores de parâmetros que podem ter o mesmo ajuste. A fim de evitar interpretações errôneas dos resultados do modelo, recomenda-se a implementação de métodos para aumentar a confiança dos parâmetros estimados usando análise estatística, tais como métodos de regressão e correlação (ALBERT; CALLIES; TOUSSAINT, 2022; COOLEY, 1979; TANG; ZHUANG, 2009). Outra maneira de aumentar a confiança dos parâmetros é a análise de sensibilidade, uma

técnica aplicada para auxiliar a calibração de modelos matemáticos com dados experimentais, quantificando a influência dos parâmetros sobre a saída do modelo. Assim, os parâmetros podem ser classificados e aqueles com menor influência na saída do modelo podem ser assumidos como fixos com valores da literatura, aumentando a confiança dos parâmetros que estão sendo calibrados. Além disso, análises de sensibilidade têm sido usadas em conjunto com métodos de inferência Bayesianos, tais como o método de Monte Carlo com Cadeia de Markov (MCMC) (COUTO et al., 2020; DONOSO-BRAVO et al., 2011; PIANOSI et al., 2016). MCMC é uma ferramenta poderosa a ser usada na modelagem matemática, pois fornece o erro associado a cada parâmetro e informações estatísticas para avaliar a Cadeia de Markov gerada, aumentando a confiança na estimativa do parâmetro (LAINE, 2008; SOLONEN, 2006).

Portanto, o objetivo deste trabalho é desenvolver modelos matemáticos para descrever as etapas de seleção e acúmulo do processo de produção da MMC PHA a partir da vinhaça de cana de açúcar. O modelo para a etapa de seleção considerou que o enriquecimento dos microrganismos produtores de PHA era realizado em um SBR operado sob um regime de *feast-famine* e alimentação desacoplada de carbono/nitrogênio. O modelo da fase de acúmulo considerava que o crescimento da biomassa ocorria simultaneamente à produção de PHA, e ambos foram supostos a ocorrer sem inibição. Uma análise de sensibilidade local relativa foi aplicada aos modelos para classificar a influência dos parâmetros sobre as variáveis de saída do modelo. A calibração dos modelos foi realizada aplicando o método de minimização de Box Draper e o método MCMC para estimativa de parâmetros. Os modelos desenvolvidos foram validados estatisticamente e submetidos à validação direta e cruzada sob diferentes condições experimentais.

2 HIPÓTESE E OBJETIVO DE PESQUISA

A hipótese central deste trabalho consiste em “**modelo baseado em Tamis et al. (2014) é capaz de descrever a produção de polihidroxicanoatos por culturas mistas a partir de vinhaça de cana-de-açúcar**” assim o objetivo geral é “**obter um modelo capaz de descrever o processo de produção de polihidroxicanoatos por culturas mistas a partir de vinhaça de cana-de-açúcar**”.

Visando atender a hipótese central, traça-se as seguintes sub-hipóteses com os respectivos objetivos específicos:

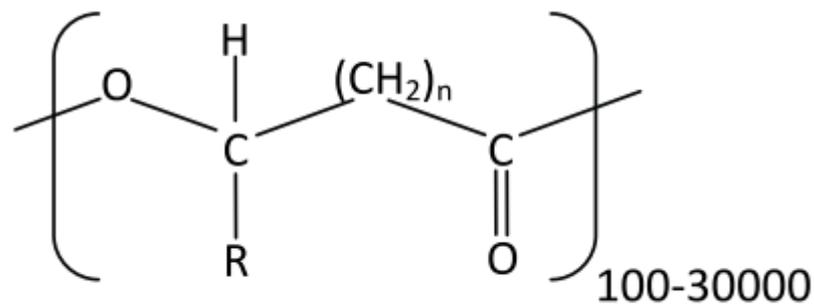
- **Sub-hipótese 1:** modelo baseado em Tamis et al. (2014) adaptado é capaz de descrever a etapa de acumulação de PHA por culturas mistas alimentadas com vinhaça de cana-de-açúcar acidificada.
 - **Objetivo específico 1:** obter um modelo adaptado de Tamis et al. (2014) para a etapa de acumulação de PHA por culturas mistas alimentadas com vinhaça de cana-de-açúcar acidificada.
- **Sub-hipótese 2:** métodos de estimativa e otimização de parâmetros aplicados ao modelo de Tamis et al. (2014) torna os resultados fidedignos.
 - **Objetivo específico 2:** minimizar e otimizar a quantidade de parâmetros livres do modelo usando o método de minimização de Box-Draper e o método de simulação de Monte Carlo e Cadeia de Markov, respectivamente;
 - **Objetivo específico 3:** Realizar a validação direta e cruzada dos modelos e determinar estatisticamente sua confiabilidade.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 POLIHIDROXIALCANOATOS

PHA é um poliéster naturalmente produzido por diferentes tipos de bactérias como um material de reserva energética. A Figura 1 apresenta a estrutura geral dos PHA. O tamanho da cadeia principal define sua classificação, podendo ser classificados como: PHA de cadeia curta (do inglês *short-chain length PHA* – *scl-PHA*; 3 a 5 átomos de carbono); PHA de cadeia média (do inglês *medium-chain length PHA* – *mcl*; 6 a 14 átomos de carbono); PHA de cadeia longa (do inglês *long-chain length PHA* – *lcl-PHA*; 15 ou mais átomos de carbono) (TAN et al., 2014). Cada monômero possui um grupo funcional *R* que determina qual PHA é formado, sendo o mais comum o homopolímero poli-3-hidroxi butirato (PHB). Adicionalmente, a estrutura do PHA pode ser formada por mais de um tipo de monômero, sendo o mais comum o copolímero polihidroxi butirato-hidroxi valerato (PHBV). As propriedades dos PHA são influenciadas pelo tamanho da cadeia, tipo de ramificação *R* e composição monomérica do polímero. No geral, PHA cadeia curta apresentam propriedades termoplásticas, enquanto PHA de cadeia média apresentam propriedades elastoméricas (JIANG, 2011).

Figura 1 - Estrutura química geral de um monômero de PHA.



Fonte: Adaptado de Johnson (2009).

Exemplo: $n=1$, $R=CH_3$ é poli-3-hidroxi butirato; $n=1$, $R=CH_2-CH_3$ é poli-3-hidroxi valerato.

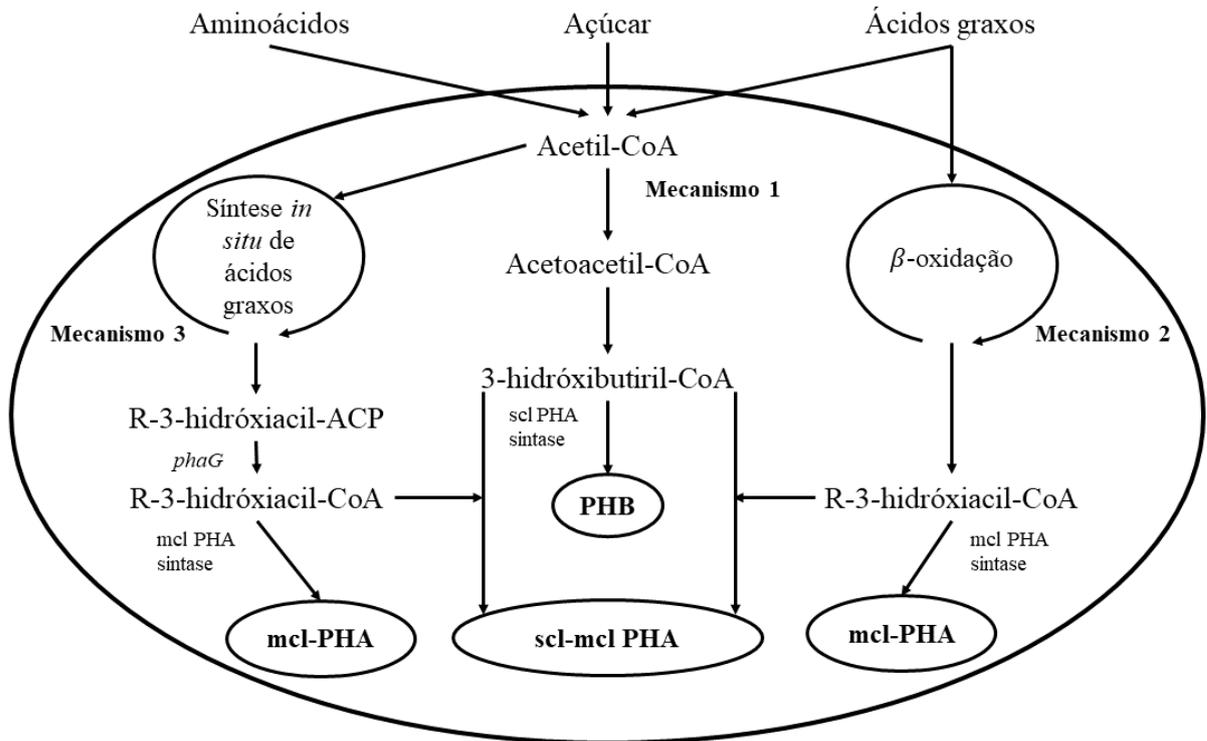
Segundo Chen et. al. (2015), há três mecanismos reportados na literatura que descrevem a síntese de PHA, ilustrados na Figura 2.

- i. **Mecanismo 1:** ilustra a síntese de scl-PHA, a qual dois acetil-CoA gerados a partir de açúcar, ácidos graxos ou aminoácidos, são sucessivamente convertidos pelas enzimas acetoacetil-CoA redutase e β -cetotialase a acetoacetil-CoA e 3-hidróxibutiril-CoA, respectivamente. Por fim, a enzima scl PHA sintase polimeriza as moléculas de 3-hidróxibutiril-CoA a PHB. Este mecanismo é tipicamente representado pela cepa *Ralstonia eutropha* (também conhecida por *Cupriavidus necator*) contendo a enzima scl PHA sintase (PhaC), específica para substratos com três a cinco carbonos;
- ii. **Mecanismo 2:** ilustra a utilização de produtos intermediários do ciclo da β -oxidação para a síntese de mcl-PHA usando ácidos graxos como fonte de carbono. Primeiro, ácidos graxos são convertidos a enoil-CoA no mecanismo de β -oxidação. Subsequentemente, enoil-CoA é transformado pela enzima R-3-hidróxiacil-CoA hidratase a R-3-hidróxiacil-CoA, o qual é o precursor para a polimerização de mcl-PHA, que é catalisada pela enzima mcl PHA sintase. Este caminho é tipicamente encontrado nas cepas *Pseudomonas putida*, *P. oleovorans* e *P. aeruginosa*;
- iii. **Mecanismo 3:** envolve a síntese *in situ* de ácidos graxos que fornece R-3-hidróxiacil-ACP para a síntese de PHA. A enzima chave, denominada 3-hidróxiacil proteína-CoA transferase (PhaG), transforma 3-hidróxiacil-ACP a 3-hidróxiacil-CoA para a síntese de PHA.

A produção de PHA foi desenvolvida a partir da observação de que, na natureza, algumas bactérias armazenam PHA, como fonte de carbono e energia, quando são submetidas a condições de excesso de substrato, para que possam sobreviver a períodos de indisponibilidade de substrato. A partir de diferentes estudos, dois tipos de metabolismo foram identificados e reportados: 1) produção de PHA, em ambiente anaeróbico, por microrganismos acumuladores de fosfato e microrganismos acumuladores de glicogênio, e subsequente conversão a glicogênio, polifosfato e novas células, em ambiente aeróbico (SMOLDERS; MEIJ; LOOSDRECHT, 1994); 2) produção de PHA, em ambiente aeróbico, por microrganismos que são submetidos a períodos de excesso de substrato e indisponibilidade de substrato (*feast-famine*) (BEUN et al., 2002). Estes dois tipos de microrganismos podem ser selecionados e

enriquecidos em reatores, aplicando-se condições específicas ao sistema, para a produção de PHA (JOHNSON et al., 2009; WELLES et al., 2014).

Figura 2 - Rotas metabólicas da síntese de PHA.



Fonte: adaptado de Chen et. al. (2015).

Materiais feitos de PHA, quando submetidos a processos de compostagem, são completamente oxidados a água e dióxido de carbono, sendo estes, os materiais básicos para a regeneração de carboidratos através da fotossíntese pelas plantas. Isto demonstra que, ao contrário dos polímeros derivados do petróleo, PHA estão inseridos no ciclo natural do carbono. PHA são usados como materiais de embalagem, em produtos para as indústrias agropecuária e farmacêutica e em aplicações médicas. Segundo Koller et al. (2010), as características mais vantajosas dos PHA são:

- i. **Biodegradabilidade:** Diferente dos plásticos convencionais, os PHA não contribuem para o aumento da disposição de resíduos nos solos, devido a sua biodegradabilidade;

- ii. **Natureza biológica e independência de combustíveis fósseis:** PHA são produzidos a partir de matérias-primas renováveis e são independentes da disponibilidade de petróleo, por exemplo, como substrato. Além disso, considerando o caso em que a energia necessária para produção de PHA seja gerada a partir de fontes renováveis, a independência dos recursos fósseis é válida para todo o processo;
- iii. **Emissão de dióxido de carbono:** O dióxido de carbono que é emitido como produto final da oxidação dos PHA, é originário da matéria-prima renovável utilizada como substrato para sua formação. A fixação do dióxido de carbono pelas plantas através da fotossíntese gera novas fontes de carbono renováveis, que podem ser utilizadas para produção de PHA. Dessa maneira, os fluxos de carbono da síntese e degradação de PHA são balanceados, consequentemente PHA não contribuem para o avanço do aquecimento global;
- iv. **Biocompatibilidade:** PHA são utilizados no campo da medicina devido a sua biocompatibilidade com o corpo humano, apresentando uma larga vantagem em relação aos plásticos convencionais. Esta característica pode ser explicada pela presença do ácido (R)-3-hidroxi butirato no sangue e tecido humano.

Desde a década de 1980, a comunidade científica vem se esforçando no sentido de desenvolver a produção industrial de PHA por culturas puras. Embora exista uma gama de tipos de PHA, somente os polímeros PHB, PHBV e o copolímero de PHB e polihidroxihexanoato (PHH), são produzidos em larga escala. No geral, a produção de PHA por culturas puras é realizada em batelada ou batelada alimentada. Os microrganismos são pré-cultivados, em um meio de cultura axênico, com um substrato específico, para o aumento da densidade celular. Quando a densidade celular desejada é alcançada, substrato é alimentado as células em um ambiente que possua condições limitantes para crescimento (escassez de nitrogênio ou fósforo, por exemplo), para que se atinja o máximo conteúdo intracelular de PHA (CHEN, 2009). O PHA produzido por culturas puras possui um custo elevado de produção, devido aos custos com o uso de substratos específicos e com os processos de extração e purificação do polímero produzido, e a necessidade de condições estéreis de operação. Consequentemente, o preço de mercado do PHA é maior, quando comparado com os polímeros derivados do petróleo, o que

faz com o que a produção de PHA em escalas comparáveis aos polímeros petroquímicos e seu uso seja limitado a poucas aplicações (JIANG, 2011).

Devido aos altos custos produtivos decorrentes do uso de culturas puras em processos biológicos, a aplicação do conceito de culturas mistas microbianas (CMM) torna-se relevante. Esta tecnologia visa o emprego de culturas mistas indefinidas, selecionadas a partir da adoção de princípios ecológicos específicos. CMM são largamente aplicadas na área de tratamento de efluentes, por exemplo, em processos de remoção de fósforo e processos de remoção de nitrogênio (KLEEREBEZEM; VAN LOOSDRECHT, 2007). O uso de CMM para a produção de PHA permite que o processo possa ser operado sob condições não estéreis, eliminando o custo energético de equipamentos de esterilização. Além disso, os riscos de contaminação e de degeneração genética de cepas modificadas geneticamente, não existem quando CMM são utilizadas, pois a seleção de uma CMM com uma característica específica pode ser alcançada manipulando-se as condições operacionais dos processos. Uma outra vantagem do uso de CMM em detrimento de culturas puras para produção de PHA é a possibilidade de se utilizar resíduos como substrato para as culturas, uma vez que é estimado que 40% do custo total de produção de PHA é atribuído à matéria-prima necessária (substrato). Dessa maneira, o uso de resíduos como substrato para as culturas elimina uma parcela significativa do custo total de produção de PHA.

A seleção de microrganismos que possuem a capacidade de acumulação de PHA em grandes quantidades é o fator chave para o bom desempenho do processo de produção de PHA por CMM. Para isso, duas estratégias são encontradas na literatura, com relação a seleção de microrganismos a partir de um inóculo proveniente de reatores de lodos ativados: 1) seleção sob alternância de condições anaeróbias e aeróbias; e 2) seleção sob alternância de disponibilidade de substrato (*feast*) e ausência de substrato (*famine*). Ambas as estratégias utilizam princípios ecológicos de seleção, aplicando-se continuamente condições dinâmicas de operação, que favoreçam o armazenamento de PHA em uma fase e degradação do PHA armazenado em outra fase (JOHNSON, 2009).

Na primeira estratégia, por exemplo, substrato contendo acetato como única fonte de carbono é fornecido a um reator em fase anaeróbia. Bactérias especializadas tais como, as acumuladoras de fosfato (PAO – do inglês *polyphosphate accumulating organisms*) e acumuladoras de glicogênio (GAO – do inglês *glycogen accumulating organisms*) são capazes de consumir o acetato, mas não conseguem se multiplicar a partir dele sem a presença de oxigênio como acceptor final de elétrons. No entanto, essas bactérias são capazes de converter acetato em PHA. A energia (ATP) e o poder de redução (NADH e NADPH), necessários para

a conversão de acetato em PHA por essas bactérias são fornecidos por meio da degradação interna do glicogênio e do polifosfato armazenados. Após o consumo de todo o substrato, inicia-se a fase aeróbia na qual o PHA armazenado internamente é usado pelas bactérias PAO e GAO para crescimento e reabastecimento de polifosfato e glicogênio, respectivamente. Este processo é continuamente repetido com descarte de biomassa ao final de cada ciclo anaeróbio-aeróbio, resultando em uma pressão de seleção para os organismos que melhor se adaptam a estas condições operacionais (REIS et al., 2003).

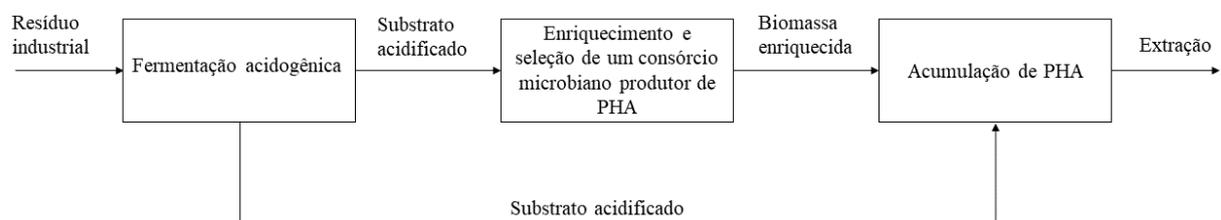
Na segunda estratégia de seleção de organismos acumuladores de PHA, substrato contendo acetato como única fonte de carbono, por exemplo, é fornecido a um reator em fase aeróbia. Durante a fase de *feast* as bactérias presentes no reator podem crescer e/ou armazenar PHA. Após o consumo de todo o substrato, inicia-se uma fase de indisponibilidade de substrato, isto é, *famine*, na qual as bactérias que armazenaram PHA na fase de *feast* são capazes de consumir o PHA armazenado para crescimento, enquanto as bactérias que não armazenam PHA não possuem nenhum mecanismo de sobrevivência durante o período de *famine*. Se esse processo é continuamente repetido, juntamente com o descarte do excesso de biomassa ao final de cada ciclo *feast-famine*, os microrganismos que possuem capacidade de acumular PHA serão selecionados e enriquecidos, uma vez que consomem a fonte de carbono mais rapidamente e continuam se multiplicando durante a fase de *famine*. Dessa maneira, terão uma vantagem competitiva em relação aos microrganismos não acumuladores de PHA. A competição em sistemas *feast-famine* está relacionada com a velocidade de consumo de substrato, em detrimento a velocidade de crescimento celular. Se as bactérias produtoras de PHA consomem o substrato e armazenam como PHA mais rapidamente, elas asseguram a maior quantidade de substrato e produzem novas células durante a fase de *famine* (JOHNSON et al., 2009). No geral, culturas selecionadas utilizando ciclos *feast-famine*, apresentam conteúdos intracelulares de PHA maiores, quando comparados com culturas selecionadas por ciclos anaeróbio-aeróbio (JOHNSON et al., 2009; REIS et al., 2003).

3.2 PRODUÇÃO DE PHA A PARTIR DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS

A estratégia de produção de PHA por CMM é aplicada, principalmente, com o objetivo de utilizar resíduos industriais como substrato para o processo. O processo de três etapas (Figura 3) é o mais adequado quando são utilizados CMM e resíduos para a produção de PHA. A primeira etapa pode ser definida como a de pré-tratamento do substrato para as etapas seguintes. Resíduos industriais orgânicos, compostos majoritariamente de carboidratos, são submetidos a

fermentação anaeróbia por um consórcio microbiano acidogênico, para a produção de ácidos orgânicos (DIONISI et al., 2004). Substratos ricos em carboidratos são raramente utilizados diretamente para a produção de PHA por CMM, devido ao fato de que os organismos produtores de PHA acumulam glicogênio quando são alimentados com carboidratos (REDDY et al., 2003). No entanto, os ácidos orgânicos figuram-se como os precursores de PHA nesses sistemas. A conversão de ácidos orgânicos tais como, lático, acético, butírico, propiônico, valérico, capróico, entre outros, em PHA requer poucos passos metabólicos, resultando em altas velocidades de consumo (DIRCKS et al., 2001). A presença de componentes orgânicos que não sejam ácidos orgânicos, como carboidratos e glicerol, favorece populações microbianas que armazenam outras substâncias de reserva, reduzindo o rendimento de PHA. Dessa maneira, a concentração de ácidos orgânicos no substrato utilizado é um fator determinante para seleção de um consórcio microbiano acumulador de PHA (MARANG et al., 2013). Para essa estratégia de produção, a etapa de fermentação acidogênica pode ser realizada sob diferentes condições e parâmetros, a escolha do reator, do substrato fermentativo e dos parâmetros operacionais devem ocorrer de tal forma que maximize a produção de ácidos orgânicos.

Figura 3 - Processo de produção de PHA por CMM em três estágios.



Fonte: elaborado pelo autor.

O segundo estágio (Figura 3) é a etapa de seleção e enriquecimento de um consórcio microbiano produtor de PHA. Para isso, são aplicadas condições operacionais específicas com a finalidade de promover uma pressão seletiva para organismos produtores de PHA, por exemplo, ciclos *feast-famine*. Reactores de bateladas sequenciais (SBR) são os mais adequados para se aplicar os ciclos *feast-famine* de uma maneira contínua. Geralmente cada ciclo *feast-famine* de um SBR consiste de 3 fases: 1) curto período de alimentação do reator com substrato fresco; 2) longo período de reação; e 3) curto período de descarte de biomassa e sobrenadante. O principal objetivo do segundo estágio é a obtenção de um consórcio microbiano enriquecido com organismos com uma capacidade de armazenamento alta e estável de PHA, o que resulta em uma composição monomérica final estável (JIANG, 2011). Após um período de tempo, o qual houve a seleção e enriquecimento de um consórcio microbiano produtor de PHA, através

da imposição contínua de ciclos *feast-famine*, o reator de enriquecimento e seleção passa a ser um reator para produção de biomassa.

No terceiro estágio (Figura 3), a biomassa coletada ao final de cada ciclo será submetida a um processo de acumulação para a produção de PHA. Para isso, a biomassa é alimentada com substrato acidificado produzido no primeiro estágio, em condições limitantes de crescimento, para a máxima acumulação intracelular de PHA. Geralmente, a etapa de acumulação é realizada em reatores de batelada alimentada, os quais o substrato é oferecido a biomassa através de pulsos. Após a biomassa atingir a máxima acumulação de PHA, ela é submetida a processos de extração e purificação, para a recuperação do polímero produzido.

Após a etapa de acumulação, a biomassa é separada da fase líquida por centrifugação, filtração ou sedimentação, com subsequente recuperação de PHA. Para isso, vários métodos são reportados na literatura, majoritariamente baseados na ruptura da célula bacteriana e remoção da camada proteica que envolve os grânulos de PHA, ou a partir de extração por solventes específicos, que possuem a capacidade de penetrar a célula bacteriana (MANNINA et al., 2020). Industrialmente, o recorrente uso de grandes quantidades de solvente e o excesso de energia necessária, para a recuperação de PHA, prejudica a viabilidade econômica do processo e vai de encontro com aspectos sustentáveis de produção industrial. Segundo Koller e Niebelschütz (2013), o processo de extração de PHA é influenciado por vários fatores:

- i. O tipo de microrganismo envolvido no processo, diferentes cepas apresentam diferentes fragilidades da parede celular;
- ii. Tipo de PHA, com relação a sua classificação (*scl-PHA*, *mcl-PHA* e *lcl-PHA*);
- iii. Quantidade intracelular de PHA;
- iv. A pureza final requerida para o processo, que é determinada pela aplicação do polímero;
- v. Eventual presença de produtos químicos para recuperação de PHA, tais como, solventes;
- vi. Impacto do processo de extração na massa molecular final do PHA.

Um dos desafios do processo de extração de PHA de CMM, quando comparados com culturas puras, é desenvolver um processo de baixo custo e ambientalmente correto, que consiga extrair um polímero com alto peso molecular e um grau de pureza elevado. Os métodos mais estudados para extração de PHA na literatura são: i) extração por solventes; ii) digestão da biomassa; iii) ruptura mecânica. Geralmente, independentemente do tipo de processo de extração, a biomassa passa por um pré-tratamento, entre eles aquecimento, pré-tratamento mecânico ou uso de alcalinizantes e oxidantes, com o objetivo de facilitar a quebra da parede celular dos microrganismos, auxiliando o processo de extração (MANNINA et al., 2020). O processo de extração de PHA das células, estão entre os fatores que mais afetam o custo total de produção de PHA. Atualmente, o método mais usado em escala industrial é o de extração por solventes, que é um processo efetivo quando aplicados a culturas puras, embora não seja a opção mais sustentável e econômica (CHEN, 2010).

Temperatura, tempo de retenção celular (SRT), relação carbono/nitrogênio (C/N), carga orgânica volumétrica (COV), composição do substrato e pH são parâmetros operacionais que influenciam a segunda e terceira etapas do processo em três estágios de produção de PHA (DIAS et al., 2006). O SRT impõe uma pressão de seleção baseada na velocidade de crescimento dos microrganismos no sistema. Bactérias que crescem mais rapidamente, utilizam a maioria do substrato consumido para crescimento, em detrimento a acumulação de PHA. Portanto, longos períodos de SRT (>10 dias) são aplicados para a seleção de CMM acumuladoras de PHA (ALBUQUERQUE et al., 2007; BENGTTSSON; WERKER; WELANDER, 2008; LEMOS; SERAFIM; REIS, 2006; SERAFIM et al., 2004). Os resultados encontrados por estes trabalhos sugerem que, em maiores SRT, durante a fase de *feast* uma maior quantidade de substrato foi utilizada para síntese de PHA. No entanto, resultados diferentes foram encontrados por Chua et al. (2003), que constataram uma maior capacidade de armazenamento das culturas selecionadas com SRT de três dias, quando comparadas com as culturas selecionadas com um SRT de dez dias. Além disso, culturas selecionadas com longos períodos de SRT, geralmente, possuem uma maior quantidade de biomassa inerte e uma menor velocidade de crescimento, o que diminuiria a produtividade de PHA ao final do processo e a produtividade volumétrica de biomassa do segundo estágio.

A relação C/N também impacta no processo de seleção e enriquecimento de CMM produtoras de PHA. Lemos, Serafim e Reis (2006) e Serafim et al. (2004) obtiveram consórcios microbianos com uma capacidade alta de armazenamento de PHA (65% em g PHA g SSV⁻¹), selecionados e enriquecidos sob limitação de nitrogênio, para restringir o crescimento celular. No entanto, Albuquerque et al. (2007) e Johnson, Kleerebezem e Van Loosdrecht (2010)

sugerem que a limitação de nitrogênio não favorece o enriquecimento para culturas selecionadas por longos períodos. Johnson, Kleerebezem e Van Loosdrecht (2010), observaram que os microrganismos aumentaram a velocidade de consumo de amônia quando submetidas a condições limitantes de nitrogênio, indicando um direcionamento do substrato consumido para crescimento. Além disso, sob condições limitantes de nitrogênio, o PHA consumido durante a fase de *famine* é direcionado somente para manutenção celular (geralmente negligenciável). Conseqüentemente, os microrganismos com capacidade de armazenamento de PHA não possuem uma vantagem competitiva em relação aqueles que não armazenam PHA. Ao contrário da etapa de enriquecimento, na etapa de acumulação, a relação C/N é mantida em valores altos (>100), para inibição do crescimento celular. Johnson, Kleerebezem e Van Loosdrecht (2010) avaliaram uma relação C/N de 8 até ∞ mol/mol durante experimentos de acumulação e reportaram um favorecimento da acumulação de PHA nos experimentos que foram conduzidos com limitação de nitrogênio.

O tipo de resíduo orgânico, utilizado como substrato, é um fator chave para o sucesso do processo da Figura 3. Resíduos industriais, que foram estudados como substrato para produção de PHA, e suas respectivas indústrias estão apresentados na Tabela 1. Dentre as inúmeras possibilidades de resíduos industriais, efluentes agroindustriais ricos em carboidratos e passíveis de acidificação são candidatos ideais a substrato para a produção de PHA por CMM (SOLAIMAN et al., 2006). Idealmente, a planta de produção de PHA deve ser integrada a linhas de produção já existentes, com a finalidade de diminuir custos com transporte e evitar problemas, tais como a indisponibilidade do substrato. Além disso, deve-se levar em conta a disponibilidade de energia e de produtos químicos que podem ser aplicados ao processo de produção de PHA, dentro das indústrias. Nesse sentido, uma biorrefinaria, apresenta-se como promissora opção para a integração com a produção de PHA por CMM a partir de águas residuárias. Uma biorrefinaria é uma indústria, na qual ocorre o processamento de uma matéria-prima de base biológica, em produtos de alto valor agregado como energia, biocombustíveis e produtos químicos. Adicionalmente, o processamento de matéria-prima de base biológica em uma biorrefinaria, gera grandes quantidades de efluentes, que podem ser utilizados como substrato para a produção de PHA (DE DONNO NOVELLI; MORENO SAYAVEDRA; RENE, 2021; SNELL; PEOPLES, 2009).

Tabela 1 - Águas residuárias utilizadas para produção de PHA.

Indústria	Água residuária	Referência
Estação de tratamento de efluentes	resíduo sólido de lodo ativado, lodo primário, efluente líquido doméstico	(AMULYA et al., 2016; BASSET et al., 2016; MORETTO et al., 2020; TU; ZHANG; WANG, 2019; WIJEYEKOON et al., 2018)
Estação de tratamento de resíduos sólidos	fração orgânica do resíduo sólido urbano, lixiviado da fração orgânica do resíduo sólido orgânico	(BASSET et al., 2016; MORETTO et al., 2020; WIJEYEKOON et al., 2018)
Bioenergia (H ₂)	efluentes de processos fermentativos	(KUMAR et al., 2019)
Laticínios	soro de queijo, soro de leite, efluente da indústria de sorvetes e de leite	(GOUVEIA et al., 2017; MANNINA et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2017)
Indústria do açúcar	melaço de beterraba, vinhaça de cana-de-açúcar	(ANTERRIEU et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2019)

Fonte: adaptado de De Donno Novelli, Moreno Sayavedra e Rene (2021)

No cenário brasileiro, a vinhaça de cana-de-açúcar destaca-se como um candidato promissor para produção de PHA por CMM. A vinhaça compreende a principal água residuária do processo produtivo do etanol, gerada na etapa de destilação a uma média de 13 litros por litro de etanol. O etanol brasileiro é majoritariamente produzido a partir de cana-de-açúcar, em biorrefinarias, nas quais também são produzidos açúcar e energia, proveniente da queima do bagaço (FUESS, 2017). Em termos gerais, a vinhaça apresenta elevado conteúdo orgânico, bem como concentrações significativas de potássio e sulfato, características ácidas e corrosivas, as quais resultam de processos relacionados ao preparo da matéria-prima para a fermentação (por exemplo, adição de ácido sulfúrico para controle de pH e prevenção da floculação de leveduras). A elevada concentração de matéria orgânica presente na vinhaça resulta da presença de açúcares residuais, compostos orgânicos intermediários da fermentação (por exemplo, ácidos orgânicos e glicerol) e frações residuais de etanol não recuperadas na etapa de destilação (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011; WILKIE; RIEDESEL; OWENS, 2000).

O manejo adequado da vinhaça é um dos principais desafios das biorrefinarias de cana-de-açúcar. No setor sucroalcooleiro brasileiro, praticamente toda a vinhaça gerada nas

destilarias é destinada a fertirrigação das lavouras, visando o reciclo de água e nutrientes. Apesar desta prática possibilitar benefícios em curto prazo, a contínua aplicação de vinhaça na lavoura tem potencial para gerar inúmeros impactos adversos ao solo, recursos hídricos e produtividade na lavoura. Considerando-se as opções tecnológicas ao tratamento da vinhaça, a digestão anaeróbia apresenta vantagens em relação a outras tecnologias de tratamento, tais como processos físico-químicos (por exemplo, coagulação e floculação). A principal vantagem é a possibilidade de se acoplar a redução da carga poluidora com a produção de energia através da geração de biogás (FUESS, 2017).

Resumidamente, um processo anaeróbio consiste de 4 etapas principais: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese. Na hidrólise e acidogênese, bactérias hidrolíticas e acidogênicas transformam compostos de cadeia longa (carboidratos, proteínas e lipídeos) em compostos de cadeia curta, produzindo ácidos orgânicos, álcoois, CO_2 e H_2 . Na acetogênese, bactérias acetogênicas convertem ácidos orgânicos e álcoois em ácido acético, H_2 e CO_2 . Estes compostos são utilizados pelas arqueias metanogênicas na produção de metano (metanogênese). As arqueias metanogênicas hidrogenotróficas convertem H_2 e CO_2 em metano (CH_4), enquanto que as arqueias metanogênicas acetoclásticas convertem ácido acético em metano (FUESS, 2017). A digestão anaeróbia da vinhaça de cana-de-açúcar é bem estabelecida na literatura em trabalhos que avaliaram a produção de metano (FUESS et al., 2017), e em trabalhos que avaliaram a acidogênese para produção de H_2 (FUESS et al., 2016).

De Oliveira et al. (2019) investigaram a potencialidade da vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de PHA por CMM. A etapa acidogênica, foi realizada em reator anaeróbio de leito fixo estruturado (AnSTBR) termofílico (70°C), o qual produziu um substrato acidificado, que foi utilizado para a seleção e enriquecimento em um SBR. O SBR foi operado sob condições de *feast-famine*, com ciclos de oito horas, o qual foi avaliado o efeito da carga orgânica volumétrica (COV) aplicada ao reator SBR. A cultura selecionada produziu um copolímero PHBV, com uma composição monomérica média de 81,5% mol do monômero 3-hidroxibutirato, e 18,5% mol do monômero 3-hidroxivalerato. Foi observado um aumento da produção de biomassa e do conteúdo intracelular de PHA com o aumento da COV, adicionalmente, o conteúdo do monômero 3-hidroxivalerato também apresentou um aumento com o aumento da COV aplicada ao sistema. A etapa de seleção e enriquecimento, neste trabalho, foi operada sob limitação de nitrogênio (relação C/N igual a 280), e não houve suplementação nutricional, o que pode ser vantajoso de um ponto de vista econômico, pois elimina custos com produtos químicos, por outro lado prejudica a produção volumétrica de biomassa, impactando na produção final de PHA. Além disso, ciclos *feast-famine* operados sob

condição de limitação de nitrogênio, não favorecem a seleção de organismos produtores de PHA em longos períodos de operação. Experimentos de acumulação não foram realizados, no entanto os autores destacam que o maior conteúdo intracelular de PHA atingido ao final da fase de *feast* ($0,49\text{g PHA g SSV}^{-1}$) é comparável com estudos realizados com melaço de cana-de-açúcar, outro resíduo gerado pela indústria sucroalcooleira.

3.3 MODELAGEM MATEMÁTICA DE PROCESSOS *FEAST-FAMINE* (FF)

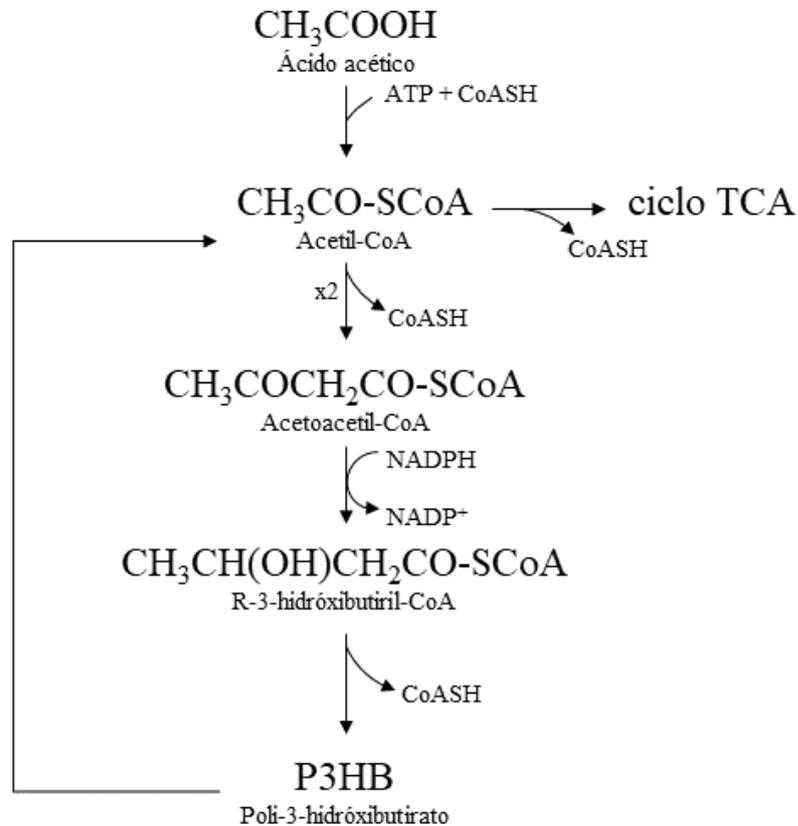
A principal característica de modelos matemáticos metabólicos é que eles devem reproduzir as reações bioquímicas que ocorrem durante o metabolismo celular. Estes modelos abrangem uma gama muito ampla: desde casos mais simples, com duas ou três reações enzimáticas, até casos mais complexos os quais centenas de reações metabólicas podem estar agrupadas e interconectadas. Em modelos complexos, os mecanismos reguladores envolvidos no metabolismo celular devem ser incluídos, no entanto, esses mecanismos, geralmente não são completamente elucidados. Portanto, o estabelecimento de modelos mecanicistas que descrevem o metabolismo celular e/ou o ciclo de vida das células não são possíveis atualmente. É por isso que todos os modelos metabólicos contêm simplificações, por exemplo, reações aglomeradas, mecanismos reguladores simplificados e equações cinéticas simplificadas (NOVAK et al., 2015).

É possível encontrar na literatura modelos capazes de descrever adequadamente o processo de FF (BEUN et al., 2000, 2002; DIAS et al., 2005, 2008; JIANG et al., 2011a; JOHNSON; KLEEREBEZEM; VAN LOOSDRECHT, 2009; LEEUWEN et al., 1997; MARANG; VAN LOOSDRECHT; KLEEREBEZEM, 2015; PARDELHA et al., 2014). Estes modelos são, em sua maioria, baseados no metabolismo e na cinética descritas por Leeuwen et al. (1997), que foram baseadas na transformação de ácido acético em PHB por uma cultura pura de *Paracoccus pantotrophus*, ilustrada na Figura 4.

Segundo Leeuwen et al. (1997), durante a fase de *feast* substrato é consumido pelas células com custo energético de adenosina trifosfato (ATP). Uma fração é oxidado a dióxido de carbono (CO_2) para a geração de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e subsequentemente ATP através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (ciclo de Krebs). A maior parte é convertido a acetoacetyl-CoA e posteriormente a 3-hidróxibutiril-CoA que é polimerizado para formar PHB. Posteriormente, durante a fase de *famine*, o PHB produzido é consumido para geração de energia e carbono para produção de novas células. Os autores observaram que a acumulação de PHB é dependente da velocidade de crescimento dos

organismos antes do momento do pulso de substrato. Dessa maneira, o balanço de massa para PHB foi relacionado com a diferença entre a velocidade de consumo de substrato (ácido acético) e a quantidade de substrato requerido para crescimento celular na presença de substrato externo (ácido acético). Assim, foi formulado um modelo metabólico estruturado que descreve adequadamente a cinética observada durante a formação e consumo de PHB.

Figura 4 - Rota metabólica de formação de PHB a partir de ácido acético.



Fonte: Adaptado de Leeuwen et al. (1997).

Com relação a cinética do processo de FF, a maioria dos modelos considera conjuntos separados de equações para descrever a fase de *feast* e a fase *famine*. Durante a fase de *feast*, a velocidade específica de consumo de substrato é bem descrita pela cinética de Monod, e a velocidade de produção de PHA é estequiometricamente vinculada com o consumo de substrato. Alguns modelos adotam um fator de inibição em condições de alto teor de PHA dentro da célula, que pode ocorrer, por exemplo, no processo de acumulação (JIANG et al., 2011a; LEEUWEN et al., 1997). Durante a fase de *famine*, alguns modelos descrevem a

degradação de PHA por uma equação de Monod (DIAS et al., 2005; GUJER et al., 1999) ou por outras equações que dependem, principalmente, do conteúdo intracelular de PHA (BEUN et al., 2000, 2002). Outro modelo considerado para a degradação de PHA é o modelo de partícula encolhendo (do inglês, *shrinking-particle model*), que é usado para descrever situações em que partículas sólidas estão sendo consumidas (JOHNSON; KLEEREBEZEM; VAN LOOSDRECHT, 2009; MURNLEITNER et al., 1997).

Beun et al. (2002) adaptaram o modelo proposto por Leeuwen et al. (1997) para o caso em que são usadas culturas mistas microbianas, visando obter informações sobre a dinâmica de armazenamento de polímeros em sistemas de lodo ativado de plantas de tratamento de efluentes. A cinética de produção e degradação de PHB foi estudada para uma cultura mista de lodo ativado, alimentada com acetato em reator de batelada sequencial. Os autores observaram que durante a fase de *feast* a relação entre a velocidade de produção de PHB pela velocidade de consumo de acetato foi constante, independentemente da velocidade de crescimento de biomassa e da velocidade de consumo de acetato. Dessa maneira, a degradação do PHB armazenado pelas células foi descrita por uma cinética de primeira ordem relacionada com o conteúdo de PHB das células (f_{PHB}). A degradação do PHB formado mostrou-se independentemente do tipo de aceptor de elétrons presente no sistema e do tempo de retenção celular do sistema. As expressões cinéticas desenvolvidas, no geral, podem ser usadas para descrever a produção e degradação de PHB em sistemas de tratamento de efluentes.

Dias et al. (2005) desenvolveram um modelo metabólico simples baseado em Leeuwen et al. (1997) para produção de PHA por uma cultura mista a partir de acetato. Após isso, Dias et al. (2008) desenvolveram um modelo metabólico para a produção de PHBV a partir de misturas de ácidos acético e propiônico. Balanços materiais e energéticos foram estabelecidos com base em rotas metabólicas previamente elucidadas e as equações desenvolvidas para os rendimentos teóricos (relacionados com o crescimento celular e produção de PHA) são dependentes da eficiência de fosforilação oxidativa (P/O) das células. O modelo foi validado com dados experimentais coletados em um reator de bateladas sequenciais operado sob condições de FF e alimentado com acetato ou propionato como fonte de carbono. A P/O das células foi influenciada pelo tipo de cultura selecionada e também pelo tipo de substrato alimentado a cada cultura, o qual valores maiores de P/O foram observados para acetato em comparação com propionato. Além disso, as culturas enriquecidas com acetato obtiveram um rendimento de PHA maior, quando comparados com as culturas enriquecidas com propionato.

Johnson, Kleerebezem e Van Loosdrecht (2009) desenvolveram um modelo para produção de PHB por um consórcio microbiano em reatores de bateladas sequenciais e reatores

de batelada alimentada. Os autores implementaram o seguinte procedimento para a construção do modelo:

- i. Análise de parâmetros de monitoramento suficientes, que incluem medidas de gases de escape;
- ii. Correções dos efeitos advindos da retirada (amostragem) e adição de líquidos ao sistema;
- iii. Cálculo das velocidades de consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono;
- iv. Balanço das conversões medidas;
- v. Avaliação das medidas obtidas por um modelo metabólico.

Durante a fase de *feast*, processo foi caracterizado pelo consumo de acetato (inibido pela concentração de PHB), crescimento de biomassa, manutenção celular, produção de PHB (inibida pela concentração de PHB), geração de dióxido de carbono e consumo de oxigênio e amônia. A fase *famine* foi caracterizada pelo consumo de PHB, manutenção celular, crescimento de biomassa, geração de dióxido de carbono e consumo de oxigênio e amônia. O modelo foi capaz de descrever adequadamente o consumo de amônia e acetato e o armazenamento de PHB pelas células.

Jiang et al. (2011a) investigaram a influência da composição do substrato alimentado a uma cultura mista dominada por *Plasticicumulans acidivorans* na produção de PHA. Os experimentos foram conduzidos com acetato, propionato, e misturas de acetato e propionato. Os autores observaram uma relação direta entre a composição monomérica do polímero produzido com a composição do substrato. A presença de propionato induziu a produção de polihidroxicvalerato (PHV) enquanto que acetato induziu a produção de polihidroxibutirato (PHB). Um modelo metabólico foi construído com base no modelo apresentado por Dias et al. (2008), com as seguintes modificações:

- i. As reações metabólicas ativas durante a fase de *famine* foram incluídas;

- ii. Síntese de biomassa de acetil-CoA e propionil-CoA foram consideradas separadamente;
- iii. O coeficiente de manutenção celular foi considerado como um parâmetro livre no modelo cinético enquanto que a eficiência de fosforilação oxidativa (P/O) foi fixada;
- iv. O ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs) foi considerado inativo quando propionato foi usado como única fonte de carbono.

Segundo os autores, as velocidades de consumo de acetato e propionato são diretamente influenciadas pela concentração dos mesmos no substrato alimentado a cultura. Dessa maneira, a dinâmica de consumo simultâneo de acetato e propionato foi descrita como função da composição da mistura acetato-propionato. Assim, o modelo descrito pode ser usado como ferramenta para prever a composição monomérica final do polímero formado em sistemas alimentados com misturas de acetato e propionato.

Com o objetivo de desenvolver um modelo matemático geral que consiga prever o comportamento de sistemas submetidos a FF, Tamis et al. (2014a) propuseram uma estrutura simples e unificada de um modelo matemático, a partir do qual podem ser feitas modificações para adequação a diferentes condições experimentais. Esta estrutura foi o primeiro relato na literatura de um modelo matemático para processos FF descrito por um único conjunto de equações. Para isso foi considerado que a conversão de substrato é descrita pela cinética de Monod de acordo com a Equação 3.1:

$$q_S = q_S^{max} \frac{C_S}{C_S + K_S} \quad (3.1)$$

Em que: q_S é a velocidade específica de consumo de substrato; q_S^{max} é velocidade máxima específica de consumo de substrato; C_S é a concentração de substrato; K_S é a constante de meia saturação.

A velocidade de conversão de PHA foi calculada subtraindo a velocidade de degradação da velocidade de produção de PHA, segundo a Equação 3.2:

$$q_{PHA} = Y_{PHA/S} \cdot q_S - k \cdot \left(\frac{C_X^0}{C_X} \right)^{1/3} \cdot (f_{PHA})^{2/3} \quad (3.2)$$

Em que: q_{PHA} é a velocidade de conversão de PHA; $Y_{PHA/S}$ é o rendimento de PHA referente a substrato; k é a constante de degradação de PHA; C_X^0 é a concentração inicial de biomassa; C_X é a concentração de biomassa; f_{PHA} é a quantidade de PHA por quantidade de biomassa;

A taxa de crescimento de biomassa é dada pela subtração da velocidade de conversão de PHA (Equação 3.2) da velocidade de conversão de substrato (Equação 3.1) menos a taxa de manutenção celular, de acordo com a Equação 3.3:

$$\mu = Y_{X/PHA} \cdot k \cdot \left(\frac{C_X^0}{C_X} \right)^{1/3} \cdot (f_{PHA})^{2/3} - Y_{X/S} \cdot m_S \quad (3.3)$$

Em que: μ é taxa de crescimento celular; $Y_{X/PHA}$ é o rendimento de biomassa referente a PHA; $Y_{X/S}$ é o rendimento de biomassa referente a substrato; m_S é o fator de manutenção celular;

Vale destacar que as Equações 3.1, 3.2 e 3.3 representam a conversão de um substrato simples em PHA por uma cultura pura. Na Tabela 2 está apresentado as reações e equações cinéticas adaptadas do modelo de Tamis et al. (2014a) que representam a condição de conversão de um substrato misto (resíduo) em PHA por um consórcio microbiano sob regime de FF.

Segundo Tamis et al. (2014a), quando substratos mistos são utilizados, é adequado diferencia-lo entre componentes que favorecem o estabelecimento de culturas produtoras de PHA (H.Org) e os componentes que favorecem o crescimento de culturas não produtoras de PHA, tais como carboidratos, lipídios e proteínas, aqui referidos como substrato residual (Sr). A velocidade de consumo destes substratos é descrita pela cinética de Monod.

A velocidade de conversão de PHA (q_{PHA}) é estequiometricamente vinculada ao consumo de H.Org menos a velocidade de degradação de PHA. No modelo de Tamis et al. (2014a) a degradação de PHA é função de uma constante de degradação (k_{PHA}), que leva em conta a geometria do grânulo de PHA, a concentração de biomassa produtora dentro do sistema (C_{Xp}) e da relação de quantidade de PHA por quantidade de biomassa produtora.

Tabela 2 - Modelo cinético de Tamis et al. (2014a) adaptado para processos *feast-famine*.

Reação	Equação
Velocidade de consumo de H.Org	$q_{H.Org} = q_{H.Org}^{max} \frac{C_{H.Org}}{C_{H.Org} + K_{H.Org}}$
Velocidade de conversão de PHA	$q_{PHA} = Y_{PHA/H.Org} \cdot q_{H.Org} - k_{PHA} \cdot \left(\frac{C_{X_p}^0}{C_{X_p}}\right)^{1/3} \cdot \left(\frac{C_{PHA}}{C_{X_p}}\right)^{2/3}$
Velocidade de consumo de substrato residual	$q_{Sr} = q_{Sr}^{max} \frac{C_{Sr}}{C_{Sr} + K_{Sr}}$
Crescimento de biomassa produtora de PHA	$\mu_p = Y_{X_p/PHA} \cdot k \cdot \left(\frac{C_{X_p}^0}{C_{X_p}}\right)^{1/3} \cdot \left(\frac{C_{PHA}}{C_{X_p}}\right)^{2/3} - Y_{X_p/H.Org} \cdot m_{H.Org}$
Crescimento de biomassa não produtora de PHA	$\mu_o = Y_{X_o/Sr} \cdot q_{Sr} - Y_{X_o/Sr} \cdot m_{Sr}$

Fonte: adaptado de Tamis et al. (2014a).

Siglas: $C_{H.Org}$ (concentração de ácidos orgânicos), C_{Sr} (concentração de substrato residual), C_{PHA} (concentração de polihidroxialcanoatos), C_{X_p} (concentração de biomassa produtora de PHA), X_o (biomassa não produtora de PHA), $q_{H.Org}$ (velocidade de consumo de H.Org), $q_{H.Org}^{max}$ (velocidade máxima de consumo de H.Org), $K_{H.Org}$ (constante de meia saturação de H.Org), q_{PHA} (velocidade de acumulação de PHA), $Y_{PHA/H.Org}$ (rendimento de PHA referente a H.Org), k_{PHA} (constante de degradação de PHA), $C_{X_p}^0$ (concentração inicial de biomassa produtora de PHA), q_{Sr} (velocidade de consumo de substrato residual), q_{Sr}^{max} (velocidade máxima de consumo de substrato residual), K_{Sr} (constante de meia saturação de substrato residual), μ_p (velocidade de crescimento de biomassa produtora de PHA), $Y_{X_p/PHA}$ (rendimento de biomassa produtora de PHA referente a PHA), $Y_{X_p/H.Org}$ (rendimento de biomassa produtora de PHA referente a H.Org), $m_{H.Org}$ (coeficiente de manutenção celular referente ao consumo de H.Org), μ_o (velocidade de crescimento de biomassa não produtora de PHA), $Y_{X_o/Sr}$ (rendimento de biomassa não produtora de PHA referente a substrato residual), m_{Sr} (coeficiente de manutenção celular referente ao consumo de substrato residual).

Tamis et al. (2014a) sugerem que classificar a biomassa entre produtoras (X_p) e não produtoras (X_o) é adequado quando substratos e culturas mistas são utilizados. Além disso, os autores consideram que o substrato preferencial de X_p são os ácidos orgânicos, e o substrato preferencial de X_o é todo o conteúdo orgânico presente no substrato que não seja ácidos orgânicos (Sr). Portanto, a velocidade de crescimento de X_p é resultante da diferença entre o consumo de H.Org ($q_{H.Org}$) menos a produção de PHA (q_{PHA}) e o fator de manutenção celular

($m_{H.Org}$). Por fim, a velocidade de crescimento de X_o é relacionada com o consumo de substrato residual menos o fator de manutenção celular (m_{Sr}).

O modelo desenvolvido por Tamis et al. (2014a) foi capaz de descrever sistemas de FF alimentados com substratos simples (acetato) (JIANG et al., 2011b; TAMIS et al., 2014a) e com efluentes reais como: efluente acidificado de uma indústria de doces (TAMIS et al., 2014b) e efluente acidificado de uma fábrica de papel (TAMIS et al., 2018). Neste trabalho, o modelo de Tamis et al. (2014a), será utilizado para descrever a etapa de enriquecimento e seleção em SBR operado sob *feast-famine*. O detalhamento do modelo construído é apresentado na seção Materiais e Métodos.

3.4 MODELAGEM MATEMÁTICA DA ETAPA DE ACUMULAÇÃO

A etapa de acumulação compreende o estágio de produção de PHA, ilustrado na Figura 3, e pode ser comparada com uma fase de *feast* prolongada, preferencialmente na ausência de um nutriente essencial para o crescimento celular. É uma etapa crucial para o processo de produção, pois determina a produtividade final do processo e o conteúdo intracelular de PHA.

Um modelo matemático da etapa de acumulação pode ser usado para prever e otimizar experimentos, com o objetivo de aprimoramento da produção de PHA. Vários trabalhos descrevem a cinética de produção em condições de alto teor de PHA (DIAS et al., 2005, 2008; JOHNSON; KLEEREBEZEM; VAN LOOSDRECHT, 2009; LEEUWEN et al., 1997). Porém, segundo Tamis et al. (2014a), dois grandes problemas são identificados nesses modelos: i) o mecanismo de finalização da síntese de PHA é desconhecido; e ii) a formação de produtos secundários é desconsiderada.

Atualmente, o fim da acumulação de PHA, isto é, o momento que a bactéria atinge o máximo conteúdo intracelular, é imprevisível (TAMIS et al., 2014a). Os estudos sugerem que a velocidade de síntese de PHA caia à medida que o conteúdo intracelular de PHA aumenta. Dessa maneira, os modelos descrevem a síntese de PHA durante os ensaios de acumulação segundo a Equação 3.4 (TAMIS et al., 2014a), que considera o conteúdo intracelular de PHA um fator de inibição (DIAS et al., 2005, 2008; JOHNSON; KLEEREBEZEM; VAN LOOSDRECHT, 2009; LEEUWEN et al., 1997).

$$q_{PHA} = q_{PHA}^{max} \frac{C_S}{C_S + K_S} \left(1 - \left(\frac{f_{PHA}}{f_{PHA}^{max}} \right)^\alpha \right) \quad (3.4)$$

Em que: q_{PHA} é a velocidade de acumulação de PHA; q_{PHA}^{max} é a velocidade máxima de acumulação de PHA; C_S é a concentração de substrato; K_S é a constante de meia saturação; f_{PHA} é o conteúdo intracelular de PHA; f_{PHA}^{max} é o máximo conteúdo intracelular; α é expoente do termo de inibição.

De acordo com Tamis et al. (2014a), o parâmetro de máximo conteúdo intracelular (f_{PHA}^{max}), apresenta valores similares para culturas enriquecidas com a mesma espécie, porém, o expoente do termo de inibição (α) apresenta uma grande variabilidade para culturas similares (BEUN et al., 2000; JIANG et al., 2011c; JOHNSON et al., 2010; JOHNSON; KLEEREBEZEM; VAN LOOSDRECHT, 2010b). Outra estratégia é atribuir o fim da síntese de PHA a depleção de substrato do meio, no entanto, o fim da acumulação de PHA na presença de substrato disponível já foi observada (JOHNSON; KLEEREBEZEM; VAN LOOSDRECHT, 2010b).

Outro problema dos modelos de acumulação, mencionado anteriormente, é a desconsideração da formação de produtos secundários. Nos modelos, a velocidade específica de consumo de substrato em altos teores de PHA é calculada como a resultante do crescimento, síntese de PHA e manutenção. A velocidade específica de consumo de substrato observada, porém, não diminui na mesma medida que o modelo prevê, com base na taxa de síntese de PHA e crescimento. Essa lacuna, pode ser atribuída a excreção de produtos secundários, provenientes do mecanismo de síntese de PHA, no meio, implicando em uma subestimação da velocidade específica de consumo de substrato nos modelos atuais. A Equação 3.5 pode ser usada para calcular a formação de produtos secundários, subtraindo o uso de substrato para biomassa, PHA e manutenção, da velocidade de consumo de substrato (TAMIS et al., 2014a).

$$q_{Pi} = Y_{Pi,S} \left(q_S - \frac{\mu^{feast}}{Y_{X,S}^{feast}} - \frac{q_{PHA}^{feast}}{Y_{PHA,S}^{feast}} - m_S \right) \quad (3.5)$$

Em que: q_{Pi} é a velocidade de formação de produtos secundários; $Y_{Pi,S}$ é o rendimento de produtos secundários referente ao substrato; q_S é a velocidade de consumo de substrato; μ^{feast} é crescimento celular durante a fase de *feast*; $Y_{X,S}^{feast}$ é o rendimento de biomassa referente a substrato durante a fase de *feast*; q_{PHA}^{feast} é a velocidade de acumulação de PHA durante a fase de *feast*; $Y_{PHA,S}^{feast}$ é o rendimento de PHA referente a substrato durante a fase de *feast*; m_S é o coeficiente de manutenção em substrato.

Até o momento, estudos que elucidam o mecanismo de terminação da síntese de PHA e a formação de produtos secundários são raros e um modelo que prevê o momento, o qual a síntese de PHA se encerra, não está disponível na literatura. Um mecanismo que pode explicar o comportamento das células em altos teores de PHA compreende a limitação do volume celular como principal fator que limita o máximo teor de PHA intracelular. Depois de certo ponto, a célula atinge um limite interno de PHA, para manter seu funcionamento e estrutura intactos. A partir deste ponto, a célula mantém sua capacidade de consumo de substrato e crescimento, mas não a síntese de PHA. Consequentemente, substratos consumidos podem ser excretados para o meio na forma de precursores de PHA, tais como o hidroxibutirato (CARLSON; WLASCHIN; SRIENC, 2005; DURNER; WITHOLT; EGLI, 2000). Foi observado que a densidade do PHA diminui com o aumento do tamanho da cadeia lateral, e que o máximo conteúdo intracelular é maior para scl-PHA, quando comparados com mcl-PHA, sugerindo que o espaço disponível intracelularmente é um fator limitante (LEE et al., 2011; TERADA; MARCHESSAULT, 1999).

No presente trabalho será utilizada uma versão do modelo de Tamis et al. (2014a), para a modelagem da etapa de acumulação. O modelo de um SBR operado sob *feast-famine*, será adaptado, excluindo das equações, apresentadas na Tabela 2, as contribuições referentes as reações que ocorrem na etapa de *famine*. O detalhamento do modelo construído é apresentado na seção Materiais e Métodos.

3.5 MÉTODOS PARA ESTIMATIVA DE PARÂMETROS E VALIDAÇÃO ESTATÍSTICA DO MODELO

A literatura apresenta diferentes métodos de estimativa de parâmetros e validação estatística de modelos. Nos próximos tópicos serão abordados métodos encontrados na literatura para estimativa de parâmetros em modelos não lineares, que é objeto de estudo deste trabalho.

3.5.1 Método de minimização de Box-Draper

O método de Box-Draper é aplicado para estimar a máxima verossimilhança de parâmetros de um modelo, a partir da minimização do determinante da matriz de variância e covariância dos resíduos. Este critério é um método de regressão não linear em que o processo

de estimação é independente da escala e das transformações lineares das observações (COUTO, 2021).

O método de Box-Draper apresenta vantagens em relação a outros métodos utilizados para estimativa de parâmetros em modelos de reações químicas e bioquímicas. Por exemplo, Mehrvar et. al. (2000) aplicaram o método de Box-Draper para a estimativa de parâmetros em modelos de reações fotocatalíticas, em detrimento do método das velocidades iniciais, usualmente utilizado para tais modelos. O modelo de velocidades iniciais, apresenta sérias desvantagens quando aplicado a modelos dinâmicos de reações fotocatalíticas, tais como, o erro envolvido na estimativa da velocidade inicial. Além disso, este método não é adequado para sistemas com muitos componentes, os quais alguns intermediários ou produtos podem estar inicialmente presentes em concentrações nulas. A vantagem da análise de regressão não linear (Box-Draper), segundo os autores, é que todos os dados coletados ao longo do experimento são utilizados para estimar os parâmetros do modelo, o que leva a resultados mais confiáveis.

Em outro trabalho, Chen Hsu e Berthouex (2006) utilizaram o método de Box-Draper para estimar os parâmetros de um modelo que descreve a degradação cinética de clorofenol em sistemas anaeróbios. O modelo era composto por seis variáveis respostas e nove parâmetros livres, e foi capaz de ajustar os dados experimentais adequadamente em um intervalo de confiança de 95%. Conceição e Portugal (2012), compararam por meio de simulações de Monte Carlo a performance do método de Box-Draper, com outros dois métodos de estimativa de parâmetros em modelos não lineares com respostas múltiplas. Os autores destacaram que os resultados obtidos não foram satisfatórios, mas que o método de Box-Draper não apresentou desvantagem, quando comparado com o método de Huber, considerado um método mais robusto de estimativa de parâmetros em modelos não lineares (WANG et al., 2007).

A matriz de Box-Draper, é construída como a soma das funções quadradas e a covariância entre as respostas e tem a seguinte forma para um exemplo de três respostas mensuradas (BROWN; MAC BERTHOUEX, 2002):

$$\min|V| = \begin{vmatrix} \sum(y_A - \hat{y}_A)^2 & \sum(y_A - \hat{y}_A)(y_B - \hat{y}_B) & \sum(y_A - \hat{y}_A)(y_C - \hat{y}_C) \\ \sum(y_A - \hat{y}_A)(y_B - \hat{y}_B) & \sum(y_B - \hat{y}_B)^2 & \sum(y_B - \hat{y}_B)(y_C - \hat{y}_C) \\ \sum(y_A - \hat{y}_A)(y_C - \hat{y}_C) & \sum(y_B - \hat{y}_B)(y_C - \hat{y}_C) & \sum(y_C - \hat{y}_C)^2 \end{vmatrix}$$

Em que: \sum indica que a diferença entre os termos deve ser somada; y_A , y_B e y_C são as respostas medidas; \hat{y}_A , \hat{y}_B e \hat{y}_C são as respostas resultantes da simulação.

Na matriz V , os elementos da diagonal principal representam a soma dos quadrados dos resíduos para cada uma das respostas. Os termos fora da diagonal principal representam a correlação das diferenças das respostas. A minimização do determinante de V fornece a melhor estimativa do parâmetro. Se os resíduos das respostas forem independentes uns dos outros, os valores esperados para os termos fora da diagonal principal será zero e a estimação dos parâmetros é simplificada para (BROWN; MAC BERTHOUEX, 2002):

$$\min \sum (y_A - \hat{y}_A)^2 + (y_B - \hat{y}_B)^2 + (y_C - \hat{y}_C)^2 \quad (3.6)$$

Segundo Box et al. (1973), para a correta aplicação do método é necessário verificar se existe dependência linear entre os dados e entre os valores esperados das respostas. No caso de dependência linear entre os dados, eles podem ser estimados usando relações estequiométricas, porém os autores destacam que devem ser mensurados independentemente. Já a dependência linear entre os valores esperados das respostas acontece quando uma equação do modelo é uma combinação linear de outra equação do modelo. A consequência para estes casos é a singularidade da matriz V , o que acarreta problemas durante a simulação. Para evitar estes problemas, pode-se verificar a adequação do modelo plotando os resíduos (erros) contra os valores previstos e contra as variáveis independentes. Geralmente, as inadequações geradas pelo gráfico podem revelar pistas sobre como o modelo pode ser melhorado.

A região de confiança dada pelo método de Box-Draper para o modelo é dada pela Equação 3.7:

$$|V|_{1-\alpha} = |V|_{min} \exp\left(\frac{X_{p,1-\alpha}^2}{n}\right) \quad (3.7)$$

Em que: p é o número de parâmetros estimados; n é o número de observações; X^2 é o valor Chi-quadrado para $v = n - p$ graus de liberdade.

O método de Box-Draper não fornece informações estatísticas acerca dos parâmetros estimados. Dessa maneira, os valores dos parâmetros obtidos pela minimização do determinante de V podem ser usados como suposição inicial de métodos de otimização, como o método de simulação de Monte Carlo com Cadeia de Markov (COUTO et al., 2019).

3.5.2 Método de simulação de Monte Carlo e Cadeia de Markov

Em modelos matemáticos, geralmente, há a presença de parâmetros desconhecidos que devem ser estimados a partir de dados experimentais. Após o ajuste dos valores simulados com os dados experimentais, o modelo pode ser usado para estudar o fenômeno em questão. Uma outra aplicação do modelo ajustado é a otimização do processo, o qual o objetivo é encontrar as condições operacionais otimizadas, seguindo critérios determinados. Um dos problemas encontrados durante a otimização é que os parâmetros estimados são, na maioria das vezes, não confiáveis, pois são estimados a partir de dados experimentais insuficientes. Uma das soluções, é a aplicação de modelos de inferência Bayesiana para análise estatística de parâmetros estimados em modelos não lineares. Nesta abordagem, é possível evitar aproximações lineares na análise de incertezas dos parâmetros (SOLONEN; HAARIO, 2012).

A simulação de Monte Carlo e Cadeia de Markov (MCMC – *Monte Carlo Markov Chain*) é uma técnica Bayesiana de inferência estatística que objetiva a estimação das características que uma distribuição de amostra deve apresentar e seus respectivos valores, em uma simulação iterativa. Esta técnica é aplicada em casos onde os parâmetros e as respostas medidas possuem uma complexa interdependência entre si (COUTO, 2021).

Zhang et. al. (2017) estudaram métodos bayesianos (MCMC) para identificação de estratégias no mercado de efluentes. Os autores concluíram que, quando comparado a métodos convencionais de otimização, o MCMC, apresenta vantagens em lidar com múltiplas incertezas associadas com a aleatoriedade do mercado de efluentes e em refletir as incertezas existentes no comportamento do transporte de nutrientes, afim de melhorar a precisão da previsão da qualidade da água, e em apoiar a tomada de decisões, promovendo alternativas diversificadas, nas estratégias do mercado de efluentes.

No MCMC é produzida uma sequência de valores os quais não são independentes entre si, ao contrário, seguem um processo estocástico chamado de Cadeia de Markov. Suponha uma série de variáveis aleatórias, $(X^{(0)}, X^{(1)}, \dots)$, ela é uma Cadeia de Markov se o valor de $X^{(n+1)}$ depender somente de seu estado antecessor $X^{(n)}$. Matematicamente isso é representado pela Equação 3.8 (COUTO, 2021; LAINE, 2008; SOLONEN, 2006).

$$P(X_n \in A | X_0, \dots, X_{n-1}) = P(X_n \in A | X_{n-1}) \quad (3.8)$$

O algoritmo usado para o MCMC, gera um caminho aleatório θ , que converge para uma distribuição estacionária $\pi(\theta|D)$. Por exemplo, na distribuição $\theta^i (i = 1, \dots, n)$, com n amostras,

de $\pi(\theta|D)$, a integração estimada pelo método de Monte Carlo é dada pela Equação 3.9 (COUTO, 2021; QIAN; STOW; BORSUK, 2003). Dessa maneira, o MCMC é um método de amostragem de valores a partir das distribuições posteriores, realizando inferências sobre θ na forma de amostras de médias e por meio de histogramas e estimativas de densidade (LAINE, 2008).

$$E(g(\alpha|D)) \approx \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n g(\theta^i) \quad (3.9)$$

Segundo Mesa et al. (2016), para se atingir uma única distribuição de equilíbrio no MCMC, a Cadeia de Markov deve ser aperiódica para evitar que caia em um *looping* infinito, irredutível, ou seja, é possível alcançar qualquer estado da cadeia partindo de um estado inicial em um número finito de iterações, e homogênea, isto é, as transições de probabilidade de um estado para outro deve ser invariável.

O MCMC gera uma cadeia de valores, os quais cada um pode depender do seu valor anterior na sequência. Por exemplo, um caminho aleatório no MCMC avança na cadeia propondo e, aceitando ou rejeitando novos valores, por meio de uma proposta de distribuição centrada na posição atual da cadeia. Assim, os valores da sequência, possuem uma correlação entre si. Por causa disso, a amostra das médias, usadas para estimar os valores posteriores correspondentes, possuem um erro devido ao procedimento de amostragem (LAINE, 2008).

No método MCMC, o caminho aleatório da distribuição é criado usando amostradores aleatórios, tais como amostradores de Gibbs e de Metropolis-Hastings, que realizam a amostragem de densidades de probabilidade. Neste trabalho foi usado o algoritmo DRAM (*Delayed Rejection Adaptive Metropolis*) desenvolvido por Haario et al. (2006), que é uma adaptação do algoritmo Metropolis-Hastings (MH) (COUTO, 2021).

O algoritmo MH é, atualmente, o amostrador mais geral para a simulação MCMC. Sua forma mais simples é de fácil implementação e possui diversas generalizações e casos especiais para diversas aplicações. No MH, uma sequência de estados $\theta^0, \theta^1, \dots, \theta^N$ é gerada para convergir para uma distribuição estacionária $\pi(\theta)$. Assim, a cadeia em um estado θ , irá gerar um novo estado θ' de uma nova distribuição $q(\theta' | \cdot)$. Essa nova distribuição depende apenas do seu atual estado, sendo que as informações sobre os estados anteriores são descartadas. O novo estado θ' é aceito de acordo com a Equação 3.10 (LAINE, 2008).

$$\alpha(\theta, \theta') = \min\left(1, \frac{\pi(\theta')q(\theta'|\theta)}{\pi(\theta)q(\theta|\theta')}\right) \quad (3.10)$$

O algoritmo MH é dado pelos seguintes passos (LAINE, 2008):

1. Inicie do estado θ^0 e selecione a distribuição de interesse q ;
2. A cada passo, o qual seu valor atual é θ^{i-1} , proponha um candidato para novo estado θ' a partir da distribuição $q(\theta^{i-1} | \cdot)$;
3. O novo valor θ' é aceito se $\pi(\theta')q(\theta'|\theta) > \pi(\theta)q(\theta|\theta')$;
4. Se o estado θ' for aceito, sua probabilidade será dada pela Equação 3.8;
5. Se o estado θ' for rejeitado, a cadeia permanece no seu valor atual θ^{i-1} ;
6. Repita o algoritmo a partir do passo ii até que valores suficientes sejam gerados.

A escolha da distribuição de interesse q , a qual os novos valores para a cadeia são gerados, pode ser, em alguns casos, bastante arbitrária, no entanto a escolha de uma distribuição que mais se aproxime da distribuição de interesse, pode acelerar a convergência da cadeia. Dessa maneira, quanto mais a distribuição proposta q , se aproximar da distribuição de interesse $\pi(\theta)$, melhor a cadeia será construída (LAINE, 2008).

No algoritmo DRAM, que é uma adaptação do MH, a distribuição é ajustada pelo histórico dos estados já aceitos, no caso dos estados rejeitados é feita a adaptação destes locais. De acordo com Mesa et al. (2016), o algoritmo DRAM inclui os seguintes procedimentos:

1. O contador inicia no valor θ^0 e no primeiro estágio de covariância ($C_{(i)} = C_0$). Selecione o tamanho do passo (s), o fator de regularização de covariância k , o período inicial de adaptação (n_0), e o último estágio para a covariância ($C_{(i)}, i = 1, \dots, N$), sendo N o número de iterações;

2. O *looping* é feito até que se aceite um novo valor, ou até atingir o número N de iterações. Um novo valor (θ') é proposto a partir de uma distribuição Gaussiana centrada no valor atual ($N\theta_{(i-1)}, C_{(k)}$) ou um novo valor é aceito pela probabilidade de aceitação do estágio (k);
3. O novo estado será ($\theta_i = \theta'$) ou ($\theta_i = \theta_{i-1}$), dependendo se o valor for aceito ou não;
4. Após um período inicial de simulação ($i \geq n_0$), a proposta principal da covariância necessita ser adaptada usando a nova cadeia gerada até o momento ($C_{(1)} = \text{cov}(\theta_0 \dots \theta_i)s + Ik$). Calcule o novo estágio proposto para $C_{(1)}$;
5. As iterações a partir do item 2 desse algoritmo são realizadas até que sejam gerados valores suficientes.

Malve et al. (2007), aplicaram o MCMC com o algoritmo DRAM, para estimar os parâmetros de um modelo não linear, que descreve o comportamento de organismos dos grupos fitoplâncton zooplâncton presentes em um lago. Os autores destacaram que a metodologia utilizada é muito útil em diversas aplicações. Pois, assegura resultados precisos e mais significativos, quando comparado a métodos estatísticos comumente utilizados no campo das ciências ambientais.

Após a finalização da simulação de Monte Carlo com Cadeia de Markov, é necessário avaliar se a cadeia gerada é estável, ou seja, se a variabilidade dos dados é pequena durante a simulação, caso contrário, os valores dos parâmetros encontrados e seus respectivos erros estão incorretos. Assim, adota-se juntamente com o MCMC um método de convergência estatística, que será descrito na próxima seção.

3.5.3 Método de convergência de Geweke

O teste de Geweke é um método de convergência estatística que se baseia em séries temporais, em que o intervalo de tempo divide os dados em conjuntos de tamanhos n_A e n_B e para cada um destes conjuntos é calculada a média da amostra. Este método também é chamado de teste Z e converge para uma Gaussiana de distribuição normal, segundo a Equação 3.11 (GEWEKE, 1992):

$$Z = \frac{t_A - t_B}{\sqrt{\text{Var}(t_A) + \text{Var}(t_B)}} \quad (3.11)$$

Em que: $t_A - t_B$ é a diferença entre os tempos; $\sqrt{\text{Var}(t_A) + \text{Var}(t_B)}$ é a raiz quadrada da variância dos tempos.

A convergência do método é analisada pelo valor de Z. Caso os valores de Z sejam grandes, os resultados divergem ao longo do tempo, indicando que o modelo não se adequa corretamente aos dados. No entanto, valores de Z próximos a 1 indicam uma boa convergência (GEWEKE, 1992).

3.5.4 Análise de sensibilidade

A análise de sensibilidade é um método para determinar os fatores mais influentes em um modelo, compreendendo o estudo do efeito que a variação de um parâmetro de entrada pode ocasionar na saída. Quando uma pequena variação num parâmetro altera drasticamente um parâmetro de saída do modelo, o mesmo é muito sensível a este parâmetro. Dessa maneira, é possível identificar os parâmetros mais importantes, e conduzir, de forma controlada, experimentos e investigações com o uso de um modelo matemático (HAMBY, 1994).

A análise de sensibilidade de um modelo é conduzida pela necessidade de determinar: [i] quais parâmetros precisam ser focados durante a pesquisa para reduzir as incertezas dos resultados; [ii] quais parâmetros são insignificantes e podem ser eliminados do modelo; [iii] quais parâmetros de entrada contribuem mais para variabilidade da saída do modelo; [iv] quais parâmetros tem mais correlação com a saída do modelo; [v] como uma variação nos valores de entrada dos parâmetros, influencia o todo o processo (HAMBY, 1994).

Geralmente, os passos a serem seguidos para a realização da análise de sensibilidade são: (a) definir qual o modelo e suas variáveis dependentes e independentes; (b) definir as funções de densidade de probabilidade para cada parâmetro de entrada; (c) gerar uma matriz apropriada de entrada através de um método de amostragem aleatória; por fim, (d) determinar a importância e as relações entre cada um dos parâmetros de entrada e saída (COUTO, 2021; HAMBY, 1994).

O resultado final da análise de sensibilidade gera uma lista dos parâmetros de entrada, elencados segundo sua influência na saída do modelo. Há diferentes formas de se realizar a análise de sensibilidade, uma delas, é a aplicação de técnicas de derivação parcial, que também

são chamados de métodos diretos. Esta abordagem é pautada na derivação parcial do modelo em sua forma agregada, e o coeficiente de sensibilidade de um parâmetro é dado pela relação entre uma mudança na entrada pela mudança provocada na saída, enquanto o restante dos parâmetros permanece constantes. Por exemplo, quando se tem uma equação algébrica explícita que descreve a relação entre variáveis independentes e dependentes, o coeficiente de sensibilidade (δ_i), para uma variável independente Y pode ser calculado a partir da derivada parcial da variável dependente em relação a variável independente, de acordo com a Equação 3.12, a qual o termo X_i/Y é introduzido para normalizar o coeficiente, removendo o efeito das unidades.

$$\delta_i = \frac{X_i}{Y} \left[\frac{\partial Y}{\partial X_i} \right] \quad (3.12)$$

Segundo Hamby (1994), os modelos são sensíveis aos parâmetros de duas maneiras distintas:

- i. Pela variabilidade, ou incerteza, de um parâmetro de entrada ter uma grande contribuição para a variabilidade de saída total;
- ii. Os resultados do modelo podem estar intrinsecamente correlacionados, de modo que pequenas mudanças no valor de entrada resultarão em significativas alterações na saída.

É possível encontrar na literatura diversos trabalhos que utilizam métodos de análise de sensibilidade, aplicadas a produção de PHA, como uma ferramenta para analisar a viabilidade econômica do processo de produção (CHOI; LEE, 1999; FERNÁNDEZ-DACOSTA et al., 2015; LEONG et al., 2017; WANG et al., 2021). Wang et. al. (2018), realizaram a análise de sensibilidade absoluta-relativa, para investigar quais parâmetros mais influenciavam cada processo descrito pelo modelo, que compreendia a competição entre o consumo de diferentes ácidos orgânicos durante a fase de *feast*.

Neste trabalho, será realizada uma análise de sensibilidade local relativa a parâmetros e variáveis, com o objetivo de determinar a influência nas variáveis de saída a partir de uma alteração dos parâmetros de entrada, descrita pela Equação 3.13 (COUTO, 2021): A Equação 3.13 foi construída de acordo com a Equação 3.12 e representa o comportamento das variáveis

de saída do modelo, quando uma pequena variação ocorre nos valores dos parâmetros analisados, enquanto mantém os demais parâmetros constantes.

$$\frac{\partial y_i}{\partial \theta_j} \frac{\theta_j}{y_i} = \frac{\theta_j}{y_i} \left[\frac{y(\theta_j + \varepsilon \theta_j) - y(\theta_j)}{\varepsilon \theta_j} \right] \quad (3.13)$$

Em que: y_i refere-se a todas as variáveis i ; θ_j refere-se a todos os parâmetros j ; ε representa a variação dada ao parâmetro e é igual a 1.10^{-5} .

4 MATERIAL E MÉTODOS E ETAPAS DE PESQUISA

4.1 DADOS EXPERIMENTAIS: SBR DE SELEÇÃO E ENSAIOS DE ACUMULAÇÃO

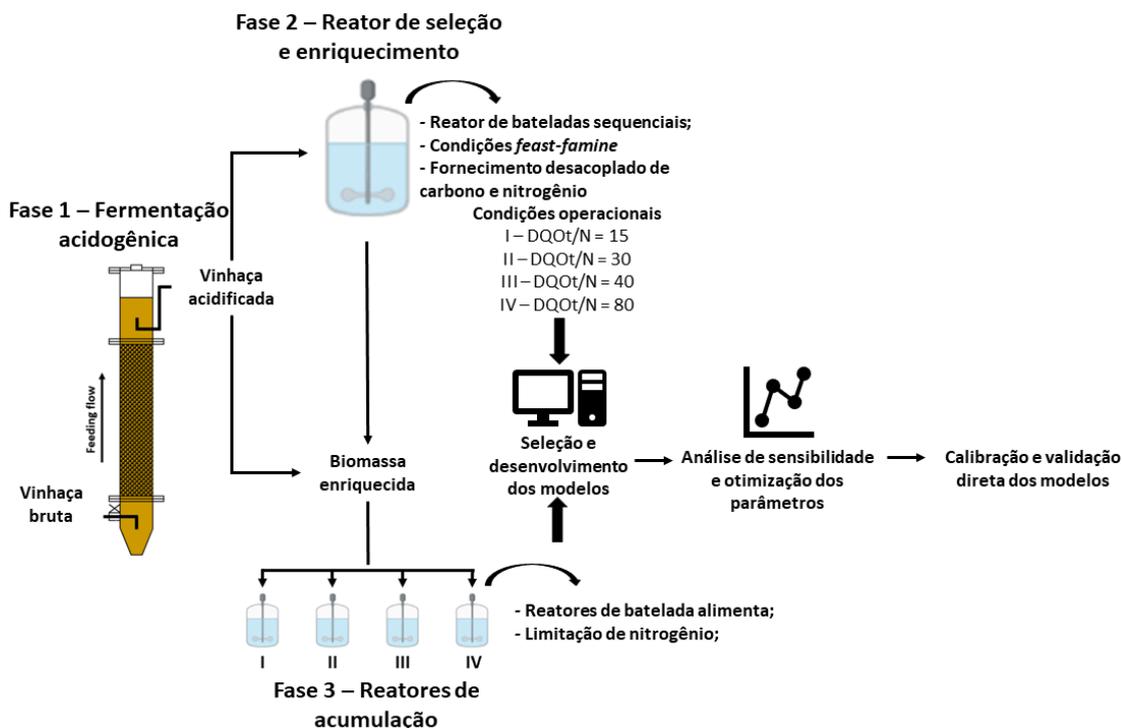
Os dados experimentais utilizados para calibração e validação dos modelos construídos foram coletados a partir do aparato experimental apresentado na Figura 5. A produção de PHA por CMM foi realizada em reatores em escala de bancada, em três estágios consecutivos. No estágio acidogênico (Fase 1), a vinhaça de cana-de-açúcar foi processada em um reator anaeróbico de leito empacotado termofílico (55°C) (AnPBR) para ser utilizada como substrato (vinhaça acidificada) no estágio de seleção e, posteriormente, no estágio de acúmulo. A caracterização da vinhaça acidificada é apresentada na Tabela 3. A etapa de seleção das espécies acumuladoras de PHA (Fase 2) foi realizada em um SBR de acrílico agitado mecanicamente, com 2 L de volume total e 1,4 L de volume útil. A temperatura foi mantida em condições mesofílicas, 30,0±1,9°C. O SBR foi operado com ciclos de 8 horas consistindo de 5 minutos de alimentação, 470 minutos de reação e 5 minutos de descarga. A relação de troca de volume foi definida em 1/3, resultando em um tempo de retenção hidráulica (HRT) equivalente a 24 h. A agitação mecânica e aeração foram mantidas durante todo o ciclo, mantendo-se o tempo de retenção de lodo (SRT) e o HRT iguais durante a operação. A COV foi fixada em 5,0 kg DQO_t m⁻³ d⁻¹. O SBR foi avaliado em quatro condições operacionais (I, II, III e IV) nas quais a relação DQO_t/N foi a variável principal. Diferentes relações DQO_t/N de 15, 30 e 40 para as condições operacionais I, II e III, respectivamente, foram obtidas através de uma dosagem externa de solução nutritiva após 3 h do início de cada ciclo, a fim de desacoplar a fase de *feast* da disponibilidade de nutrientes (OLIVEIRA et al., 2017). Na condição operacional IV, não houve suplementação externa de nitrogênio e a relação DQO_t/N foi de 80. Alil-tiourea (20 mg L⁻¹) foi adicionado ao SBR para inibir a nitrificação. O SBR foi monitorado através de amostras de final de ciclo para biomassa (medida como sólidos suspensos voláteis), DQO e pH de acordo com os *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA; AWWA; WEF, 2005). O PHA foi analisado de acordo com Braunegg et al. (1978) e os ácidos orgânicos voláteis foram analisados de acordo com Adorno et al. (2014). O ácido láctico foi analisado de acordo com Taylor (1996). O SBR foi operado até que a estabilidade operacional fosse observada e perfis temporais foram avaliados para caracterizar a evolução dos ciclos do SBR em cada condição. A capacidade de acumulação da biomassa selecionada em cada condição operacional do SBR foi avaliada através de ensaios de acumulação realizados com biomassa coletada no final da fase de *feast* durante os períodos de estabilidade operacional.

Os ensaios de acumulação (Fase 3) foram realizados em reatores de batelada alimentada com 500 mL de volume total e 250 mL de volume útil. A concentração inicial de biomassa foi mantida em 1 gSSV L^{-1} em todas as quatro condições. Os reatores foram alimentados com vinhaça acidificada, produzida no AnPBR, através de seis pulsos distribuídos ao longo das 8 h do teste. A determinação do momento do pulso foi possível pelo monitoramento contínuo da concentração de oxigênio dissolvido (OD), o que permitiu a identificação da exaustão do substrato. Os testes de acumulação foram caracterizados por amostras coletadas antes de cada pulso e os parâmetros monitorados foram DQO, PHA, H.Org e biomassa. O volume de cada pulso foi determinado mantendo uma proporção de 2 gDQO_t por g de biomassa ativa ($2 \text{ gDQO}_t \text{ g X}^{-1}$). O volume amostrado e o volume do pulso foram mantidos iguais e constantes durante os experimentos.

Para avaliar a aplicabilidade do modelo de acumulação desenvolvido foi realizada uma validação cruzada. Para isso, foram utilizados dados experimentais de acumulação com melaço de cana acidificado realizado com as biomassas selecionadas no SBR. As mesmas condições experimentais usadas nas corridas de acumulação com vinhaça acidificada foram mantidas nos experimentos com melaço acidificado, exceto pelas características do substrato fornecido. O melaço foi acidificado em um reator anaeróbico de leito estruturado (AnSTBR) em escala de bancada operado em condições termofílicas ($55 \text{ }^\circ\text{C}$). A caracterização do melaço de cana acidificado é apresentada Tabela 4.

A Figura 5 ilustra o esquema da operação dos reatores adotado na etapa experimental. Esta etapa teve como objetivo avaliar o efeito da relação $\text{DQO}_t/\text{Nitrogênio}$ sobre o enriquecimento de biomassa acumuladora de PHA (Fase 1) e sobre o desempenho dos ensaios de acumulação (Fase 2). O reator SBR foi operado sob quatro fases operacionais (I, II, III e IV) e COV de $5,0 \text{ kg DQO} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d}^{-1}$. A relação $\text{DQO}_t/\text{Nitrogênio}$ era alcançada por meio de uma dosagem de nutrientes realizada 3 h após o início de cada ciclo, com o objetivo de desacoplar a fase de *feast* da disponibilidade de nutrientes, visando aumentar a pressão de seleção de um consórcio microbiano capaz de acumular PHA. A biomassa obtida durante o período de estabilidade para cada condição estudada foi utilizada nos ensaios de acumulação de PHA.

Figura 5 - Esquema da operação dos reatores operados na etapa experimental.



Fonte: do autor.

Tabela 3 - Características físico-químicas da vinhaça acidificada utilizada no SBR de seleção e nos ensaios de acumulação.

Parâmetro	Concentração
pH	6,04 [gDQO·L ⁻¹]
DQO_t	22,70 [gDQO·L ⁻¹]
DQO_s	21,00 [gDQO·L ⁻¹]
Ácido acético	1,85 [gDQO·L ⁻¹]
Ácido propiônico	1,71 [gDQO·L ⁻¹]
Ácido láctico	0,02 [gDQO·L ⁻¹]
Ácido butírico	4,48 [gDQO·L ⁻¹]
Ácido valérico	2,67 [gDQO·L ⁻¹]
Ácido capróico	4,49 [gDQO·L ⁻¹]
Biomassa residual	0,003 [gDQO·L ⁻¹]
$DQO_t/Nitrogênio$	80
$H.Org/DQO_s$	72 (%)

Fonte: Adaptado de projeto FAPESP nº: 2016/01253-8.

Siglas: DQO_t (demanda química de oxigênio total), $H.Org$ (ácidos orgânicos), DQO_s (demanda química de oxigênio solúvel); L (litro).

Tabela 4 - Características físico-químicas do melão acidificado utilizado nos ensaios de acumulação.

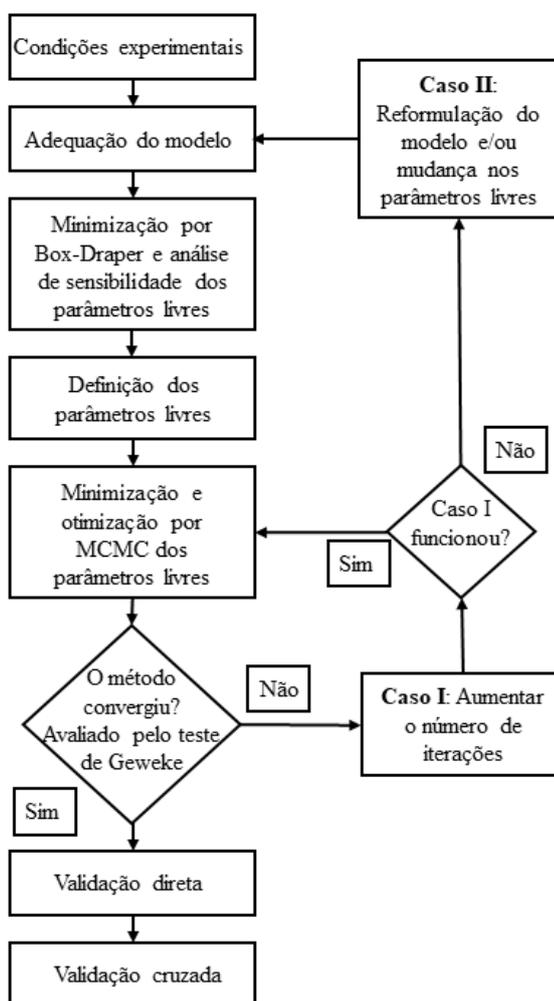
Parâmetro	Concentração
pH	4.87 [gDQO L ⁻¹]
<i>DQO.t</i>	42.60 [gDQO L ⁻¹]
<i>DQO_s</i>	41.10 [gDQO L ⁻¹]
Ácido acético	2.56 [gDQO L ⁻¹]
Ácido propiônico	-
Ácido láctico	19.13 [gDQO L ⁻¹]
Ácido butírico	4.08 [gDQO L ⁻¹]
Ácido valérico	-
Ácido capríco	0.46 [gDQO L ⁻¹]
Biomassa residual	-
<i>DQO.t/Nitrogênio</i>	227
<i>H.Org/DQO_s</i>	64 (%)

Os fatores de conversão dos compostos orgânicos em equivalentes de DQO utilizados foram: Ácido acético: 1,07 gDQO·g⁻¹; ácido propiônico: 1,51 gDQO·g⁻¹; ácido láctico : 1,07 gDQO·g⁻¹; ácido butírico 1,81 gDQO·g⁻¹; ácido valérico: 2,19 gDQO·g⁻¹; ácido capríco: 2,20 gDQO·g⁻¹; polihidroxicanoato: 1,70 gDQO·g⁻¹; biomassa residual: 1,42 gDQO·g_{xr}⁻¹ (BECCARI et al., 2009; TAMIS et al., 2014b).

4.2 ETAPA DE MODELAGEM

Por se tratar de processos com características diferentes a etapa de modelagem foi dividida entre a modelagem do reator SBR de enriquecimento (Fase 1) e os ensaios de acumulação (Fase 2) com vinhaça acidificada. Tanto o modelo de seleção quanto o modelo de acumulação foram desenvolvidos seguindo a sequência de passos da Figura 6.

Figura 6 – Sequência de passos empregados para a construção dos modelos de seleção e acumulação deste trabalho.



Fonte: adaptado de Couto et. al. (2019).

4.2.1 Fase 1: Modelagem do reator SBR de seleção

Neste trabalho, para caracterizar a etapa de seleção no SBR, um modelo matemático foi desenvolvido, baseado em Tamis et al. (2014a).

A concentração de biomassa ativa foi calculada pela diferença entre a concentração total de biomassa e a concentração de PHA. O modelo SBR considerou dois tipos de biomassa: i) $[X_p]$ biomassa que produz PHA a partir do consumo de H.Org e usa o PHA armazenado para crescimento; ii) $[X_o]$ biomassa não produtora de PHA que utiliza substrato residual (DQO_r) para crescimento. Os dados experimentais não diferenciam os dois tipos de biomassa, assim, neste caso a biomassa ativa foi considerada ser a soma dos dois tipos de biomassa, de acordo com a Equação 4.1.

$$X_a = X_p + X_o \quad (4.1)$$

Em que: X_a é a biomassa ativa no sistema $[\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1}]$; X_p é a biomassa produtora de PHA $[\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1}]$; X_o é a biomassa não produtora de PHA $[\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1}]$.

Na

Tabela 5 estão apresentadas as rotas metabólicas consideradas na modelagem do SBR de seleção: a reação 1 considera o consumo de H.Org para produzir PHA, a reação 2 considera a degradação de PHA para crescimento de biomassa produtora de PHA e a reação 3 considera a degradação de substrato residual para crescimento direto de biomassa não produtora de PHA. A matéria orgânica medida como $DQO_{H.org}$ foi calculada como a soma da DQO equivalente a cada ácido orgânico presente na vinhaça acidificada, de acordo com a Equação 4.2:

$$DQO_{H.Org} = DQO_{H.Ac} + DQO_{H.Pr} + DQO_{H.But} + DQO_{H.Val} + DQO_{H.Cap} + DQO_{H.Lac} \quad (4.2)$$

Em que: $DQO_{H.Ac}$, $DQO_{H.Pr}$, $DQO_{H.But}$, $DQO_{H.Val}$, $DQO_{H.Cap}$ e $DQO_{H.Lac}$ são as frações de DQO dos ácidos acético, propiônico, butírico, valérico capróico e láctico, respectivamente $[\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1}]$.

O substrato residual (DQO_r) foi considerado como substrato para crescimento da biomassa não produtora de PHA (X_o) e foi calculado de acordo com a Equação 4.3:

$$DQO_r = DQO_s - DQO_{H.org} \quad (4.3)$$

Em que: DQO_s representa a fração solúvel da DQO $[\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1}]$; $DQO_{H.org}$ representa a fração da DQO de ácidos orgânicos $[\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1}]$; DQO_r representa a fração residual da DQO $[\text{gDQO} \cdot \text{L}^{-1}]$.

Tabela 5 – Rotas metabólicas consideradas no modelo de seleção.

	Reação
1. Consumo de H.Org	$H.Org \rightarrow Y_{PHA/H.Org} PHA + (1 - Y_{PHA/H.Org}) CO_2$
2. Consumo de PHA	$PHA \rightarrow Y_{X/PHA} X_p + (1 - Y_{X/PHA}) CO_2$
3. Consumo de DQO _r	$DQO_r \rightarrow Y_{X/DQO_r} X_o + (1 - Y_{X/DQO_r}) CO_2$

Fonte: Adaptado de Tamis et. al. (2014b).

Siglas: *H.Org* (ácidos orgânicos); *PHA* (polihidróxialcanoatos); *DQO_r* (demanda química de oxigênio residual); *CO₂* (dióxido de carbono); $Y_{PHA/H.Org}$ (rendimento de PHA referente a H.Org); $Y_{X/PHA}$ (rendimento de biomassa referente a PHA); Y_{X/DQO_r} (rendimento de biomassa referente a DQO_r); X_p (biomassa produtora de PHA); X_o (biomassa não produtora de PHA).

O consumo de H.Org (Equação 4.4) e DQO_r (Equação 4.5) foram baseados na cinética descrita pelo modelo de Monod. A velocidade de produção de PHA (Equação 4.6) foi relacionada com o consumo de H.Org e a degradação de PHA seguiu o modelo de Tamis et. al. (2014a). A velocidade de crescimento de biomassa ativa (X_a) (Equação 4.7) considerou uma parcela advinda da degradação de PHA e outra relacionada com o consumo de DQO_r. Os fatores de manutenção celular foram considerados nulos, pelo fato do sistema operar em um SRT de somente 1 dia (TAMIS et al., 2014b).

$$q_{H.Org} = q_{H.Org}^{max} \frac{C_{H.Org}}{C_{H.Org} + K_{H.Org}} \quad (4.4)$$

$$q_{PHA} = Y_{PHA/H.Org} \cdot q_{H.Org} - k_{PHA} \cdot \left(\frac{C_{X_a}^0}{C_{X_a}}\right)^{1/3} \cdot \left(\frac{C_{PHA}}{C_{X_a}}\right)^{2/3} \quad (4.5)$$

$$q_{DQO_r} = q_{DQO_r}^{max} \frac{C_{DQO_r}}{C_{DQO_r} + K_{DQO_r}} \quad (4.6)$$

$$\mu = Y_{X_a/PHA} \cdot k \cdot \left(\frac{C_{X_a}^0}{C_{X_a}}\right)^{1/3} \cdot \left(\frac{C_{PHA}}{C_{X_a}}\right)^{2/3} + Y_{X_a/DQO_r} \cdot q_{DQO_r} \quad (4.7)$$

Em que: $q_{H.Org}$ é a velocidade específica de consumo de H.Org [$gDQO_{H.Org} gDQO_X^{-1} h^{-1}$], $q_{H.Org}^{max}$ é a velocidade máxima específica de consumo de H.Org [$gDQO_{H.Org} gDQO_X^{-1} h^{-1}$], $C_{H.Org}$ é a concentração de H.Org [$gDQO_{H.Org} L^{-1}$], $K_{H.Org}$ é a constante de meia saturação para H.Org [$gDQO_{H.Org} L^{-1}$], q_{PHA} é a velocidade específica de produção de PHA considerando as fases de *feast* e *famine* [$gDQO_{PHA} gDQP_X^{-1} h^{-1}$], $Y_{PHA/H.Org}$ é o rendimento de PHA em H.Org [$gDQO_{PHA} gDQO_{H.Org}^{-1}$], k_{PHA} constante de degradação específica de PHA [$gDQO_{PHA}^{1/3} gDQO_X^{-1/3} h^{-1}$], C_X^0 é a concentração inicial de biomassa ativa [$gDQO_X L^{-1}$], C_X é

a concentração de biomassa ativa [$\text{gDQO}_X \text{ L}^{-1}$], C_{PHA} é a concentração de PHA [$\text{gDQO}_{PHA} \text{ L}^{-1}$], q_{COD_r} é a velocidade específica de consumo de DQO_r [$\text{gDQO}_r \text{ gDQO}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$], $q_{DQO_r}^{max}$ é a velocidade máxima de consumo de DQO_r [$\text{gDQO}_r \text{ gDQO}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$], C_{DQO_r} é a concentração de DQO_r [$\text{gDQO}_r \text{ L}^{-1}$], K_{DQO_r} é a constante de meia saturação de DQO_r [$\text{gDQO}_r \text{ L}^{-1}$], μ é velocidade de crescimento específico de biomassa ativas [h^{-1}], $Y_{X/PHA}$ é o rendimento de biomassa ativa em PHA [$\text{gDQO}_X \text{ gDQO}_{PHA}^{-1}$] and Y_{X/DQO_r} é o rendimento de biomassa ativa em DQO_r [$\text{gDQO}_X \text{ gDQO}_r^{-1}$].

A concentração de substratos ($C_{H.Org}$ e C_{DQO_r}), biomassa ativa (C_{X_a}) e PHA (C_{PHA}) pelo tempo foram calculados pelas Equações 4.8-11, respectivamente.

$$\frac{dC_{H.Org}}{dt} = -q_{H.Org} \cdot C_{X_a} \quad (4.8)$$

$$\frac{dC_{DQO_r}}{dt} = -q_{DQO_r} \cdot C_{X_a} \quad (4.9)$$

$$\frac{dC_{X_a}}{dt} = \mu \cdot C_{X_a} \quad (4.10)$$

$$\frac{dC_{PHA}}{dt} = q_{PHA} \cdot C_{X_a} \quad (4.11)$$

Os parâmetros livres do modelo são: velocidade máxima específica de consumo de substrato ($q_{H.Org}^{max}$, $q_{DQO_r}^{max}$), constante de degradação específica de PHA (k_{PHA}), rendimento de PHA referente a H. Org ($Y_{PHA/H.Org}$), rendimento de X_a referente a PHA ($Y_{X_a/PHA}$), rendimento de X_a referente a DQO_r (Y_{X_a/DQO_r}) e os parâmetros de meia saturação ($K_{H.Org}$, K_{DQO_r}). Para calibração do modelo, uma calibração preliminar foi realizada para todas as condições do SBR e o melhor ajuste foi obtido para a condição operacional II. Portanto, os dados experimentais da condição operacional II foram utilizados para calibração e otimização dos parâmetros e, posteriormente, aplicados para validação direta do modelo de seleção.

4.2.2 Fase 2: Modelagem do reator de acumulação

O modelo estruturado para o SBR de seleção foi adaptado para representar a etapa de acumulação de PHA. Pelo fato da biomassa nos ensaios de acumulação não passar por períodos

de *famine*, ou seja, sempre há disponibilidade de substrato, foi desconsiderada as parcelas referentes ao consumo de PHA tanto na velocidade de acumulação de PHA (Equação 4.11), como na velocidade de crescimento de biomassa ativa (Equação 4.10). As Equações 4.8 e 4.9 não foram alteradas. Vários estudos disponíveis na literatura relataram uma diminuição na taxa de acúmulo de PHA com o aumento do conteúdo intracelular de PHA. Assim, os modelos disponíveis para o estágio de acumulação de PHA em reatores de batelada alimentada geralmente descrevem a produção de PHA nesses sistemas sendo inibida pelo conteúdo intracelular de PHA (JOHNSON; KLEEREBEZEM; VAN LOOSDRECHT, 2009; TAMIS et al., 2014a; WERKER et al., 2022). Essa inibição é usualmente dependente do conteúdo intracelular máximo de PHA da biomassa (f_{PHA}^{max}) e de uma constante de inibição, usualmente representada pela letra grega alfa (α). Entretanto, a constante α tende a variar significativamente sob condições experimentais similares, tornando sua aplicação inviável (TAMIS et al., 2014a). Portanto, no presente trabalho, foi escolhido não utilizar esse termo de inibição e considerar a produção de PHA um processo dependente somente do consumo de substrato. Uma tendência similar também foi relatada para o consumo de substrato nestes sistemas, entretanto, a inibição é causada pela alta concentração de substrato e pode ser modelada utilizando um modelo cinético de consumo de substrato com inibição (WERKER et al., 2022). No presente trabalho, tanto a produção de PHA quanto o consumo de substrato no modelo de acumulação foram modelados sem considerar fatores de inibição. Além disso, devido as condições de inibição do crescimento celular normalmente utilizadas nas corridas de acumulação, o crescimento de biomassa ativa é desconsiderado nos modelos de acumulação. Porém, crescimento foi observado em todas as corridas de acumulação e, portanto, considerada no modelo de acumulação.

A concentração de substratos ($C_{H.Org}$ e C_{DQOr}), biomassa ativa (C_{Xa}) e PHA (C_{PHA}) pelo tempo foram calculados pelas Equações 4.8-11, respectivamente.

Assim como no modelo de seleção, uma calibração preliminar foi realizada para todas as condições dos ensaios de acumulação e o melhor ajuste foi obtido para a condição operacional I. Portanto, os dados experimentais da condição operacional I foram utilizados para calibração e otimização dos parâmetros livres para, posteriormente, serem utilizados para validação direta das condições operacionais II, III e IV. O conteúdo intracelular de PHA ao final dos ensaios de acumulação foi calculado segundo a Equação 4.21:

$$f_{PHA} = \frac{C_{PHA}}{C_{PHA} + C_{Xa}} \quad (4.12)$$

Em que: f_{PHA} é o conteúdo intracelular de PHA ao final do ensaio de acumulação [$gPHA\ gVSS^{-1}$]; C_{PHA} e C_{X_a} são as concentrações de PHA e biomassa ativa ao final do ensaio de acumulação [$gPHA\ L^{-1}$, $gVSS\ L^{-1}$];

4.3 ESTIMAÇÃO DOS PARÂMETROS LIVRES

Os parâmetros livres dos modelos foram estimados pelo método de minimização de Box-Draper seguido de otimização pelo método de Monte Carlo com Cadeia de Markov (MCMC), de acordo com Couto et al. (2019). O método de Box-Draper determina os valores dos parâmetros através da minimização do determinante da matriz de Box-Draper (BROWN; MAC BERTHOUEX, 2002). A matriz de Box-Draper para os modelos foi construída da seguinte maneira:

$$\min|z| = \begin{vmatrix} A & a & b & c \\ a & B & f & g \\ b & f & C & j \\ c & g & j & D \end{vmatrix}$$

Onde:

$$\begin{aligned} A &= \sum (C_{H.Org_{obs}} - C_{H.Org_{mod}})^2; \\ a &= \sum (C_{H.Org_{obs}} - C_{H.Org_{mod}}) \cdot (C_{PHA_{obs}} - C_{PHA_{mod}}); \\ b &= \sum (C_{H.Org_{obs}} - C_{H.Org_{mod}}) \cdot (C_{DQO_{r_{obs}}} - C_{DQO_{r_{mod}}}); \\ c &= \sum (C_{H.Org_{obs}} - C_{H.Org_{mod}}) \cdot (C_{X_{a_{obs}}} - C_{X_{a_{mod}}}); \\ B &= \sum (C_{PHA_{obs}} - C_{PHA_{mod}})^2; \\ f &= \sum (C_{PHA_{obs}} - C_{PHA_{mod}}) \cdot (C_{DQO_{r_{obs}}} - C_{DQO_{r_{mod}}}); \\ g &= \sum (C_{PHA_{obs}} - C_{PHA_{mod}}) \cdot (C_{X_{a_{obs}}} - C_{X_{a_{mod}}}); \\ C &= \sum (C_{DQO_{r_{obs}}} - C_{DQO_{r_{mod}}})^2; \\ j &= \sum (C_{DQO_{r_{obs}}} - C_{DQO_{r_{mod}}}) \cdot (C_{X_{a_{obs}}} - C_{X_{a_{mod}}}); \\ D &= \sum (C_{X_{a_{obs}}} - C_{X_{a_{mod}}})^2; \end{aligned}$$

Em que $C_{H.Org}$, C_{PHA} , C_{X_a} , C_{DQO_r} são as concentrações em g DQO·L⁻¹ dos ácidos orgânicos, polihidroxicanoatos, biomassa ativa e DQO_r , respectivamente para os dados experimentais (obs) e para os valores simulados (mod).

O método MCMC assegura que os parâmetros estimados pelo método de Box-Draper não representem um mínimo local. É um método baseado no teorema de Bayes e foi implementado utilizando o algoritmo *Delayed Rejection Adaptive Metropolis* (DRAM) (HAARIO et al., 2006). O método MCMC cria um caminho aleatório dentro de um espaço, chamado de Cadeia de Markov (θ), e em seguida varia esse caminho por tempo suficiente para que se atinja a convergência para uma distribuição estacionária $\pi(\theta|D)$ de interesse do problema. O estado atual da cadeia θ depende apenas do estado anterior θ_{n-1} , mesmo que se tenha informações sobre todos os estados anteriores. Dessa maneira, o MCMC é chamado de estocástico e é representado pela Equação 3.8 (COUTO et al., 2019; MESA et al., 2016; QIAN; STOW; BORSUK, 2003). Para se obter uma distribuição de equilíbrio única, a Cadeia de Markov necessita ter as seguintes características: ser homogênea, irredutível e aperiódica. Portanto o processo deve atender a seguinte equação de balanço (MESA et al., 2016):

$$P(i \rightarrow j)p_i(\theta|D) = P(j \rightarrow i)p_i(\theta|D) \quad (4.13)$$

A convergência da Cadeia de Markov foi avaliada pelo teste estatístico de Geweke que compara a localização dos parâmetros amostrados em dois intervalos de tempo diferentes da cadeia. Se as médias dos parâmetros são similares entre elas, pode-se assumir que duas partes diferentes da cadeia têm localizações semelhantes no espaço de estados e, portanto, supõe-se que as duas amostras provêm da mesma distribuição (SAHLIN, 2011). Quanto mais próximo de 1, melhor é a convergência da Cadeia de Markov. De acordo com a Figura 6, quando a cadeia não converge devemos aumentar o número de iterações e calcular novamente o MCMC. No entanto, há casos em que o aumento do número de iterações provoca uma divergência da cadeia, o que significa que o modelo não descreve corretamente os dados experimentais. Nesse caso, devemos reformular as hipóteses e modificar o modelo. Dessa maneira, é necessário estimar novamente os parâmetros livres pelos métodos de minimização e otimização, até que se atinja a convergência da cadeia.

O método MCMC também fornece a média dos parâmetros gerados na cadeia, seus desvios padrões e o erro associado ao método. Além disso, a incerteza da previsão do modelo foi calculada com 50%, 90%, 95% e 99% de confiança.

A fim de aumentar a precisão dos parâmetros livres determinados, foi realizada uma análise de sensibilidade local em relação a parâmetros e variáveis. Esta técnica foi realizada para determinar quais parâmetros têm maior influência sobre as variáveis de saída dos modelos. Para fazer isso, os modelos foram calibrados e os valores dos parâmetros foram estimados. A partir destes valores, o método de análise de sensibilidade calcula os valores de saída das variáveis ao longo do tempo submetidas uma perturbação nos parâmetros previamente estimados. Para tornar os resultados comparáveis, o método leva em conta a influência das variáveis e parâmetros, normalizando os resultados, de acordo com a Equação 3.9 (COUTO et al., 2020). Os resultados da análise de sensibilidade podem ser representados por gráficos das variáveis ao longo do tempo, onde a área sob a curva (calculada por métodos de integração) para cada parâmetro indica a sensibilidade atribuída a ele. Assim, os parâmetros menos sensíveis, ou seja, aqueles com uma área menor, podem ser fixados utilizando valores da literatura o que diminui o número de parâmetros livres no modelo e, conseqüentemente, aumenta a confiabilidade dos resultados do modelo.

4.4 IMPLEMENTAÇÃO DOS MODELOS

Os modelos e os códigos para os métodos aplicados foram implementados no software Matlab R2015a. Todos os códigos estão disponíveis no Apêndice. O conjunto de equações diferenciais ordinárias (EDO) foi resolvido utilizando o comando *ode15s*. A minimização do determinante da matriz de Box-Draper foi realizada aplicando o comando *fminsearch*. O solver *fminsearch* é um algoritmo para encontrar o valor mínimo de uma função sem restrições aos parâmetros. Ele incorpora em sua base de cálculos o algoritmo simplex de Nelder-Mead (LAGARIAS et al., 1998). A implementação do *fminsearch* é realizada usando a seguinte sintaxe (MATHWORKS, [s.d.]):

$$x = \text{fminsearch}(\text{fun}, x0)$$

Em que: x pode ser um vetor ou uma matriz; fun é a função descrita pelo modelo; $x0$ é o ponto inicial do solver.

O método MCMC foi implementado com base nos códigos disponíveis em Laine (2017). As incertezas das previsões dos modelos foram calculadas usando o comando *mcmcpred*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MODELO DE SELEÇÃO

5.1.1 Análise de sensibilidade para o modelo de seleção

Após a implementação do modelo de seleção no MatLab, uma análise de sensibilidade local relativa a parâmetros e variáveis foi realizada para redução do número de parâmetros livres a serem determinados. Para simplificar os resultados a área sob cada curva de sensibilidade foi calculada. Os resultados estão apresentados na Tabela 6. A partir da análise dos resultados conclui-se que os parâmetros $q_{H.Org}^{max}$, k_{PHA} , $q_{DQO_r}^{max}$, $Y_{PHA/H.Org}$ e $Y_{X_a/PHA}$ exercem mais influência nas variáveis de saída do modelo (valores em negrito) e devem ser determinados por calibração do modelo com dados experimentais. Também pode ser verificado que os parâmetros Y_{X_a/DQO_r} , $K_{H.Org}$ e K_{DQO_r} exercem menos influência nas variáveis de saída do modelo. Marang, Van Loosdrecht e Kleerebezem (2015) realizaram uma análise de sensibilidade dos parâmetros de um modelo de um SBR e observaram que as constantes de meia saturação também exerceram pouca influência nas saídas dos modelos. Portanto, foram assumidos valores encontrados na literatura para estes parâmetros (Y_{X_a/DQO_r} , $K_{H.Org}$ e K_{DQO_r}), apresentados na

Tabela 7. Não foi possível encontrar valores específicos para estes parâmetros para vinhaça de cana-de-açúcar acidificada. Dessa maneira, foram utilizados valores estimados no trabalho de Tamis et al. (2014b), pelo fato de terem sido estimados e/ou fixados a partir do mesmo modelo (TAMIS et al., 2014a). Além disso, Tamis et al. (2014b) utilizaram efluente de uma fábrica de doces que após o processo de acidificação apresentou em sua composição os mesmos ácidos orgânicos encontrados na vinhaça de cana-de-açúcar acidificada utilizada neste trabalho e também uma relação $DQO_s/H.Org$ semelhante, de $0,64 \text{ gDQO}_{H.Org} \cdot \text{gDQOs}^{-1}$, enquanto que a vinhaça acidificada utilizada neste trabalho possui uma relação de $0,72 \text{ gDQO}_{H.Org} \cdot \text{gDQOs}^{-1}$. A realização da análise de sensibilidade relativa local permitiu reduzir o número de parâmetros livres do modelo de seleção de oito para cinco.

Tabela 6 – Resultados numéricos da análise de sensibilidade relativa local para parâmetros e variáveis para o modelo de seleção. Os valores em negrito representam os parâmetros mais influentes que foram calibrados e otimizados pelo método MCMC.

Variáveis	Parâmetros							
	$q_{H.Org}^{max}$	k_{PHA}	$q_{DQO_r}^{max}$	$Y_{PHA/H.Org}$	$Y_{X_a/PHA}$	Y_{X_o/DQO_r}	$K_{H.Org}$	K_{DQO_r}
$C_{H.Org}$	7,632	0,059	0,020	0,014	0,060	0,020	1,298	$3,664 \times 10^{-5}$
C_{PHA}	0,071	5,178	0,000	6,436	0,000	0,000	0,020	$1,122 \times 10^{-5}$
C_{DQO_r}	0,010	0,307	2,082	0,199	0,401	0,120	0,002	0,004
C_{X_a}	0,035	1,269	0,612	0,970	1,860	0,612	0,001	0,001

Fonte: elaborado pelo autor.

Siglas: $C_{H.Org}$ (concentração de ácidos orgânicos), C_{PHA} (concentração de polihidroxialcanoatos), C_{DQO_r} (concentração de substrato residual), C_{X_a} (concentração de biomassa ativa), $q_{H.Org}^{max}$ (velocidade máxima de consumo de H.Org), k_{PHA} (constante de degradação de PHA), $q_{DQO_r}^{max}$ (velocidade máxima de consumo de substrato residual), $Y_{PHA/H.Org}$ (rendimento de PHA referente a H.Org), $Y_{X_a/PHA}$ (rendimento de biomassa ativa referente a PHA), Y_{X_o/DQO_r} (rendimento de biomassa ativa referente a substrato residual), $K_{H.Org}$ (constante de meia saturação de H.Org), K_{DQO_r} (constante de meia saturação de substrato residual).

Tabela 7 -Parâmetros extraídos da literatura.

Parâmetro	Referência
$K_{H.Org} [gDQO \cdot L^{-1}]$	0,05
$K_{DQO_r} [gDQO \cdot L^{-1}]$	0,05 (TAMIS et al., 2014b)
$Y_{X_a/DQO_r} [gDQO \cdot gDQO^{-1}]$	0,39

Fonte: elaborado pelo autor.

Siglas: DQO (demanda química de oxigênio), $K_{H.Org}$ (parâmetro de meia saturação de ácidos orgânicos), K_{DQO_r} (parâmetro de meia saturação de substrato residual); L (litro).

5.1.2 Calibração do modelo de seleção

O modelo de seleção foi calibrado com dados experimentais da condição operacional II. Primeiro os parâmetros foram minimizados usando o método de Box-Draper e usados como valores iniciais para otimização com MCMC. As simulações com o MCMC foram realizadas com 1000, 5000, 20000 e 50000 iterações até que uma convergência satisfatória da cadeia fosse alcançada. A Tabela 8 apresenta os resultados dos parâmetros otimizados pelo método MCMC para 50000 iterações, seus respectivos desvios padrão, o erro associado ao MCMC e o valor do teste estatístico de Geweke. Os resultados revelam a robustez do método de otimização de parâmetros, indicada por valores próximos a 1.00 (>0.99) do teste de Geweke e pelos baixos valores dos desvios padrão e erro associado ao MCMC. Além disso estes resultados estão

relacionados a uma baixa dispersão dos dados simulados e denotam a estabilidade da cadeia de Markov gerada. A Figura 7 apresenta o ajuste entre os dados simulados pelo modelo de seleção e os dados experimentais da condição operacional II. O modelo de seleção foi capaz de descrever adequadamente a evolução dos substratos e produtos no SBR. A incerteza do modelo de seleção foi calculada a partir dos valores gerados pelo MCMC para cada variável de estado. A Figura 8 apresenta 50%, 90%, 95% e 99% de probabilidade de predição do modelo de seleção devido as incertezas dos parâmetros da Cadeia de Markov.

A Tabela 8 também apresenta valores dos parâmetros da literatura derivados de modelos cinéticos similares. As diferenças obtidas nos parâmetros estimados neste trabalho, comparado com aqueles obtidos por Tamis et al. (2014b) e por Tamis et al. (2018), estão relacionadas com o uso de diferentes substratos os quais possuem diferentes características físico-químicas, comparado com a vinhaça acidificada utilizada neste trabalho. Isso resulta na seleção de consórcios microbianos diferentes possuindo diferentes velocidades de conversão (HUANG et al., 2020). Além disso, ambos os trabalhos foram realizados em SBR em escala piloto. O valor obtido para $q_{DQO_r}^{\max}$ foi notadamente menor que aqueles encontrados por Tamis et al. (2014b) e por Tamis et al. (2018). Uma baixa velocidade de conversão de substrato residual sugere que o consórcio selecionado teve uma preferência de consumo de substratos diretamente relacionados com a rota metabólica de produção de síntese de PHA, i.e. ácidos orgânicos, indicando que as condições impostas no reator favoreceram espécies produtoras de PHA (TAMIS et al., 2014a). O que é reforçado pelo fato do consumo de DQO_r representar apenas 12,2% da DQO total consumida, resultante das baixas velocidades de consumo.

O $Y_{X/PHA}$ de $0.85 \text{ gDQO}_X \text{ gDQO}_{PHA}^{-1}$ foi ligeiramente maior que aqueles encontrados na literatura, o que indica que a biomassa selecionada direcionou grande parte do PHA armazenado durante a fase de feast para crescimento durante a fase de fome. Na verdade, crescimento de biomassa na fase de fome foi responsável por aproximadamente 70% do crescimento de biomassa observado durante o ciclo. Matos et al. (2021) reportaram um $Y_{X/PHA}$ de $0.75 \text{ gDQO}_X \text{ gDQO}_{PHA}^{-1}$ para uma cultura em um SBR alimentado com resíduo de fruta acidificado submetido a fornecimento desacoplado de carbono e nitrogênio a uma DQO_t/N de 33.4, SRT de 2d e uma COV de $6 \text{ gDQO}_t \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. A constante de degradação de PHA (k_{PHA}) obtida neste trabalho foi menor que aquelas encontradas na literatura. Segundo Tamis et al. (2014a), o valor de k_{PHA} é influenciado pela temperatura do reator, pelo SRT do sistema, pela concentração inicial de biomassa, pelo teor intracelular de PHA e pelo tempo da fase de *famine*. No geral, k_{PHA} aumenta com tempos de ciclos e temperaturas menores. O valor da constante de

degradação de PHA (k_{PHA}) obtida neste trabalho foi menor, quando comparado com os valores obtidos por Tamis et al. (2014b) e Tamis et al. (2018), apesar de ter sido realizada sob o tempo de ciclo menor (oito horas) e faixa de temperatura igual. Portanto, pode-se esperar valores próximos ou até mesmo maiores que aqueles estimados por Tamis et al. (2014b) e Tamis et al. (2018), o que não foi observado neste trabalho. O rendimento de PHA em ácidos orgânicos estimado neste trabalho, $Y_{PHA/H.Org}$ de $0.50 \text{ gDQO}_{PHA} \text{ gDQO}_{H.Org}^{-1}$ está de acordo com aqueles encontrados na literatura para modelos similares, apesar das diferentes condições operacionais adotadas (TAMIS et al., 2014a, 2018). Em estudos que adotaram a estratégia de fornecimento desacoplado de carbono e nitrogênio, Silva et al. (2017) reportaram $Y_{PHA/H.Org}$ de $0.41 \text{ gDQO}_{PHA} \text{ gDQO}_{H.Org}^{-1}$ para um SBR com uma relação COD_t/N de 33.4 e alimentado com uma mistura sintética de ácidos acético e propionico. Matos et al. (2021) reportaram um $Y_{PHA/H.Org}$ de $0.62 \text{ gDQO}_{PHA} \text{ gDQO}_{H.Org}^{-1}$ para um SBR com uma relação COD_t/N de 33.4 alimentado com resíduo fermentado de frutas.

Tabela 8 - Parâmetros livres otimizados pela MCMC para 50.000 iterações para o modelo de seleção, assim como as informações estatísticas do método e resultados para os respectivos parâmetros presentes na literatura.

Parâmetro	Valor calibrado	Desvio padrão	Erro MCMC	Teste de Geweke	Tamis et al. (2014b) ^f	Tamis et al. (2018) ^f
$q_{H.Org}^{max}$	1,80 ^a	0,20	0,0036	0,997	1,97	5,49
$Y_{PHA/H.Org}$	0,50 ^b	0,03	0,0006	0,996	0,62	0,67
q_{DQOr}^{max}	0,03 ^c	0,01	0,0001	0,998	0,35	0,25
k_{PHA}	0,13 ^d	0,01	0,0002	0,990	0,21	0,21
$Y_{Xa/PHA}$	0,86 ^e	0,11	0,0023	0,997	0,70	0,63

Fonte: elaborado pelo autor.

^a $[gDQO_{H.Org} \text{ gDQO}_{Xa}^{-1} h^{-1}]$. ^b $[gDQO_{PHA} \text{ gDQO}_{H.Org}^{-1}]$. ^c $[gDQO_r \text{ gDQO}_{Xa}^{-1} h^{-1}]$. ^d $[gDQO_{PHA}^{1/3} \text{ gDQO}_{Xa}^{-1/3} h^{-1}]$.

^e $[gDQO_{Xa} \text{ gDQO}_{PHA}^{-1}]$.

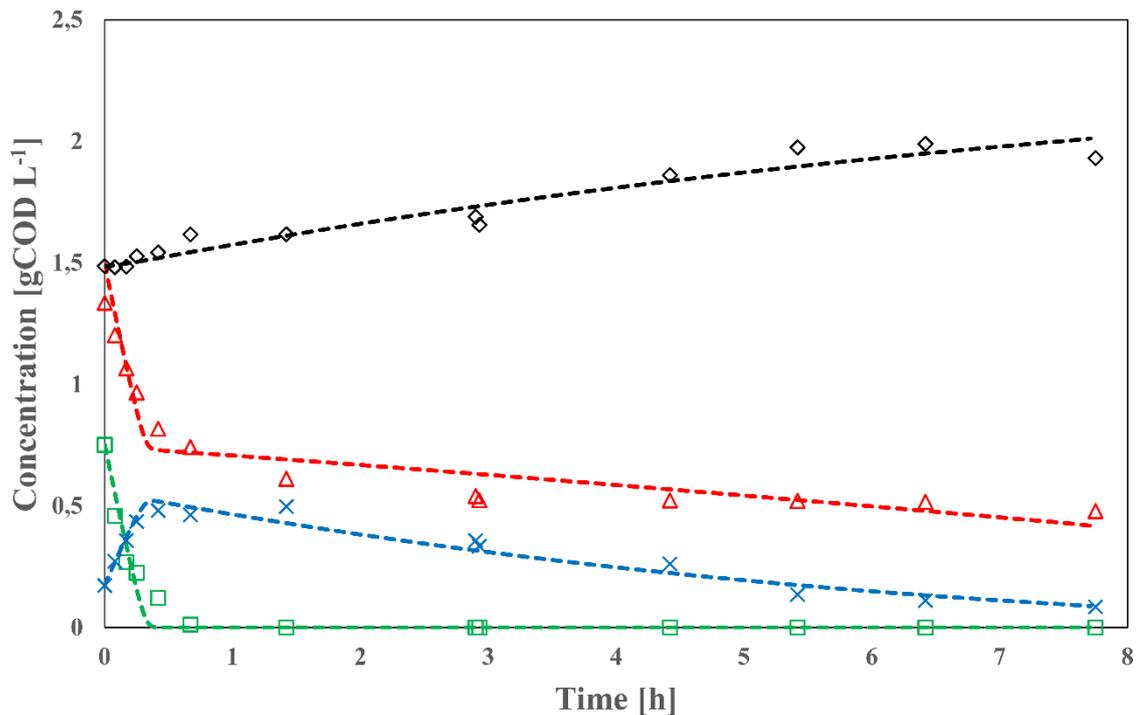
^f Calculado usando os fatores de conversão de $1,67 \text{ gDQO} \cdot \text{gPHA}^{-1}$ e $1,42 \text{ gDQO} \cdot \text{gX}^{-1}$

Siglas: $q_{H.Org}^{max}$ (velocidade máxima de consumo de H.Org), $Y_{PHA/H.Org}$ (rendimento de PHA referente a H.Org), q_{DQOr}^{max} (velocidade máxima de consumo de substrato residual), k_{PHA} (constante de degradação de PHA), $Y_{Xa/PHA}$ (rendimento de biomassa ativa referente a PHA).

De Oliveira et al. (2019) avaliaram a seleção de culturas produtoras de PHA em um SBR alimentado com vinhaça de cana-de-açúcar acidificada sujeito a aumentos sucessivos da COV e sem suplementação externa de nitrogênio. A vinhaça acidificada utilizada no

mencionado trabalho apresentou características bem diferentes da vinhaça utilizada neste trabalho tais como, uma menor $DQO_s/H.Org$ (41) e maior DQO_t/N (335). Os autores observaram um aumento no $Y_{PHA/H.Org}$ com o aumento da COV, que alcançou um $Y_{PHA/H.Org}$ de $0.73 \text{ gDQO}_{PHA} \text{ gDQO}_{H.Org}^{-1}$ para uma COV de $7.0 \text{ gDQO}_t \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Para uma COV de $4.5 \text{ gDQO}_t \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, similar a aplicada neste trabalho, o $Y_{PHA/H.Org}$ reportado por De Oliveira et al. (2019) foi significativamente maior ($0.76 \text{ gDQO}_{PHA} \text{ gDQO}_{H.Org}^{-1}$) que o valor otimizado para condição II deste trabalho. Valores similares aqueles otimizados neste trabalho foram reportados para uma COV de $2.3 \text{ gDQO}_t \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($0.44 \text{ gDQO}_{PHA} \text{ gDQO}_{H.Org}^{-1}$). No geral, os parâmetros otimizados para o SBR estão em acordo com a literatura e foram usados para validação direta com os dados experimentais das demais condições experimentais.

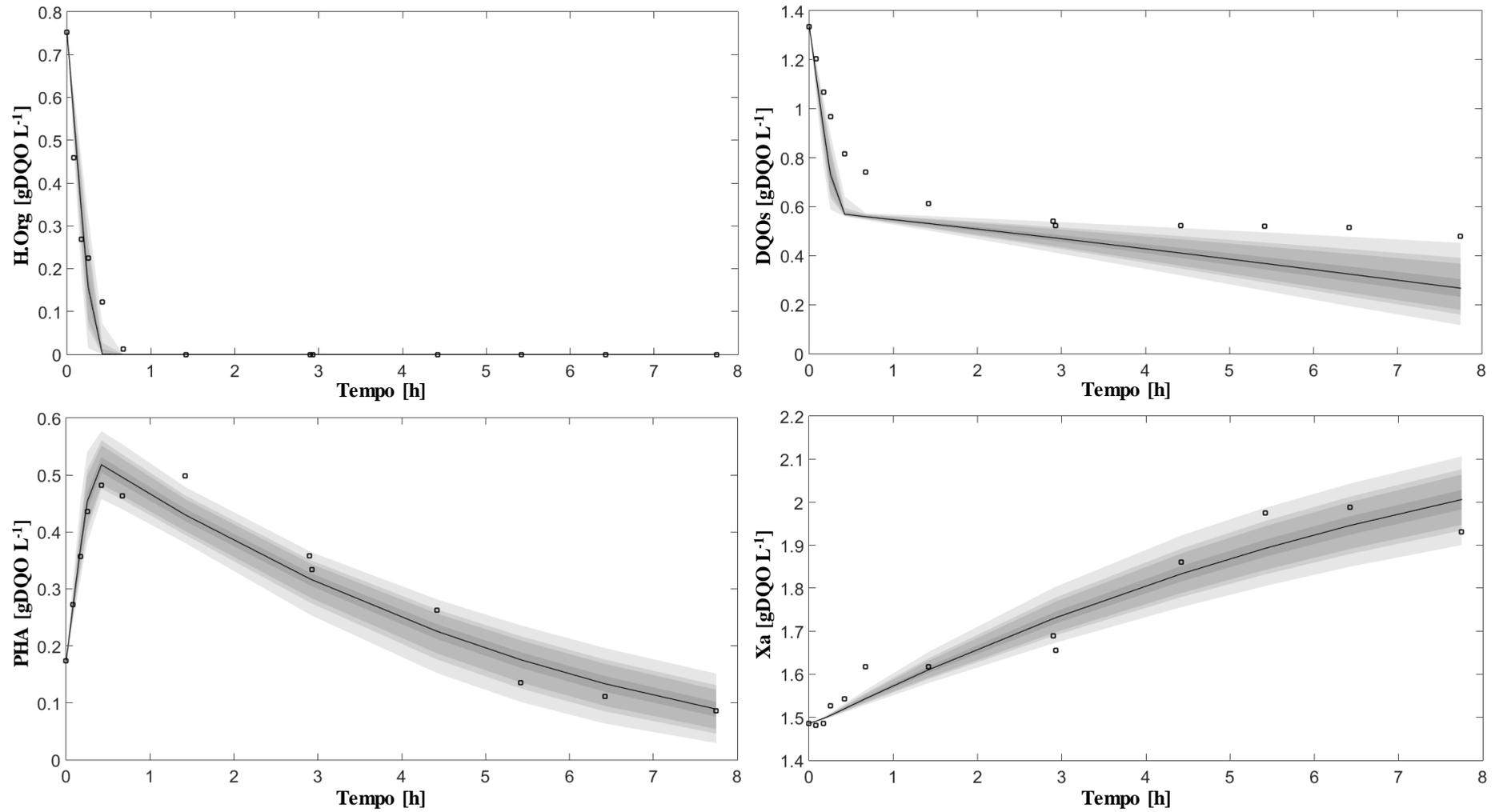
Figura 7 – Caracterização detalhada de um ciclo representativo do SBR de seleção da condição operacional II incluindo os resultados simulados pelo modelo e dados experimentais.



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: linhas pontilhadas representam resultados simulados após otimização com o MCMC para H.Org (verde), PHA (azul), DQO_s (vermelho) e X_a (preto); marcadores representam os dados experimentais de um ciclo representativo do SBR da condição operacional II para H.Org (\square), PHA (\times), DQO_s (Δ) e X_a (\diamond).

Figura 8 - Previsão da incerteza do modelo de seleção para cada variável de estado com 50%, 90%, 95% e 99% de confiança. A linha contínua representa os resultados modelados e os quadrados representam os dados experimentais.



Fonte: elaborado pelo autor.

5.1.3 Validação direta do modelo de seleção

A fim de avaliar a capacidade de generalização e previsão do modelo de seleção, foi realizada uma validação direta com dados experimentais das condições operacionais I, III e IV. Assim, foram utilizados os parâmetros otimizados pelo MCMC durante a calibração do modelo de seleção. A Figura 9(a-c) apresenta os resultados obtidos com a validação direta. Os resultados indicam que os parâmetros do modelo foram capazes de descrever adequadamente o comportamento dos dados experimentais para as condições operacionais I e III, demonstrando a aplicabilidade e robustez do método de otimização quando a suplementação de nitrogênio foi utilizada. Entretanto, para a condição operacional IV, na qual não houve suplementação de nitrogênio, o modelo não foi capaz de descrever adequadamente o comportamento do sistema. A falta de suplementação de nitrogênio afetou diretamente a cinética do consórcio microbiano selecionado. Este resultado é esperado, já que a concentração de nitrogênio é um fator-chave para os microrganismos em um processo de feast-famine, impactando seu metabolismo e, conseqüentemente, seu comportamento cinético (JOHNSON; KLEEREBEZEM; VAN LOOSDRECHT, 2010a). Oliveira et al. (2018) e Silva et al. (2017) relataram uma diminuição progressiva na taxa de consumo de H.Org e na taxa específica de armazenamento de PHA quando a suplementação de nutrientes em um SBR submetido ao processo de feast-famine e a fornecimento desacoplado de carbono e nitrogênio foi reduzida. Em comparação com as condições operacionais I, II e III, a taxa de consumo de ácidos orgânicos diminuiu na condição operacional IV, prolongando a fase de feast e impactando a produção de PHA e o crescimento da biomassa. Por outro lado, nas condições I e III, o consumo de H.Org foi descrito com bastante precisão, como pode ser visto na Figura 9a-b. Os resultados simulados previram o tempo da fase da feast/tempo da fase da fome (F/F) para as condições I, II e III em valores muito próximos aos observados nos experimentos. Para a condição II, o modelo de seleção previu uma relação F/F de 0,05, com aquela observada experimentalmente que foi de $0,07 \pm 0,03$. Para a condição I, o valor F/F previsto foi 0,05 e o observado foi $0,05 \pm 0,02$, e para a condição III, a simulação previu um valor de 0,08 e o observado foi $0,11 \pm 0,02$. O rendimento do PHA também foi afetado negativamente na condição IV, e conseqüentemente, os dados simulados não foram capazes de descrever com precisão a produção e a degradação do PHA. Além disso, estes resultados também indicam que a presença de nitrogênio é um fator importante para a degradação de PHA durante a fase de fome, e conseqüentemente, para o crescimento da biomassa a partir de PHA, pois a taxa de degradação de PHA foi diretamente afetada na

condição operacional IV. Baixas velocidade de degradação de PHA na fase de fome também foram observados por De Oliveira et al. (2019) em um SBR alimentado com vinhaça acidificada de cana de açúcar sem suplementação nutricional. A produção de biomassa ativa foi adequadamente descrita para as condições I e III, indicando que tanto a utilização do PHA armazenado quanto de substrato residual para a produção de biomassa ativa não foram significativamente diferentes nas condições nas quais a suplementação de nutrientes foi utilizada. Para a condição IV, a produção de biomassa ativa foi afetada negativamente pela falta de suplementação de nitrogênio. Isto era esperado, pois o nitrogênio é um fator importante para a produção de biomassa. Portanto, o modelo de acumulação não foi capaz de prever a produção de biomassa na condição operacional IV.

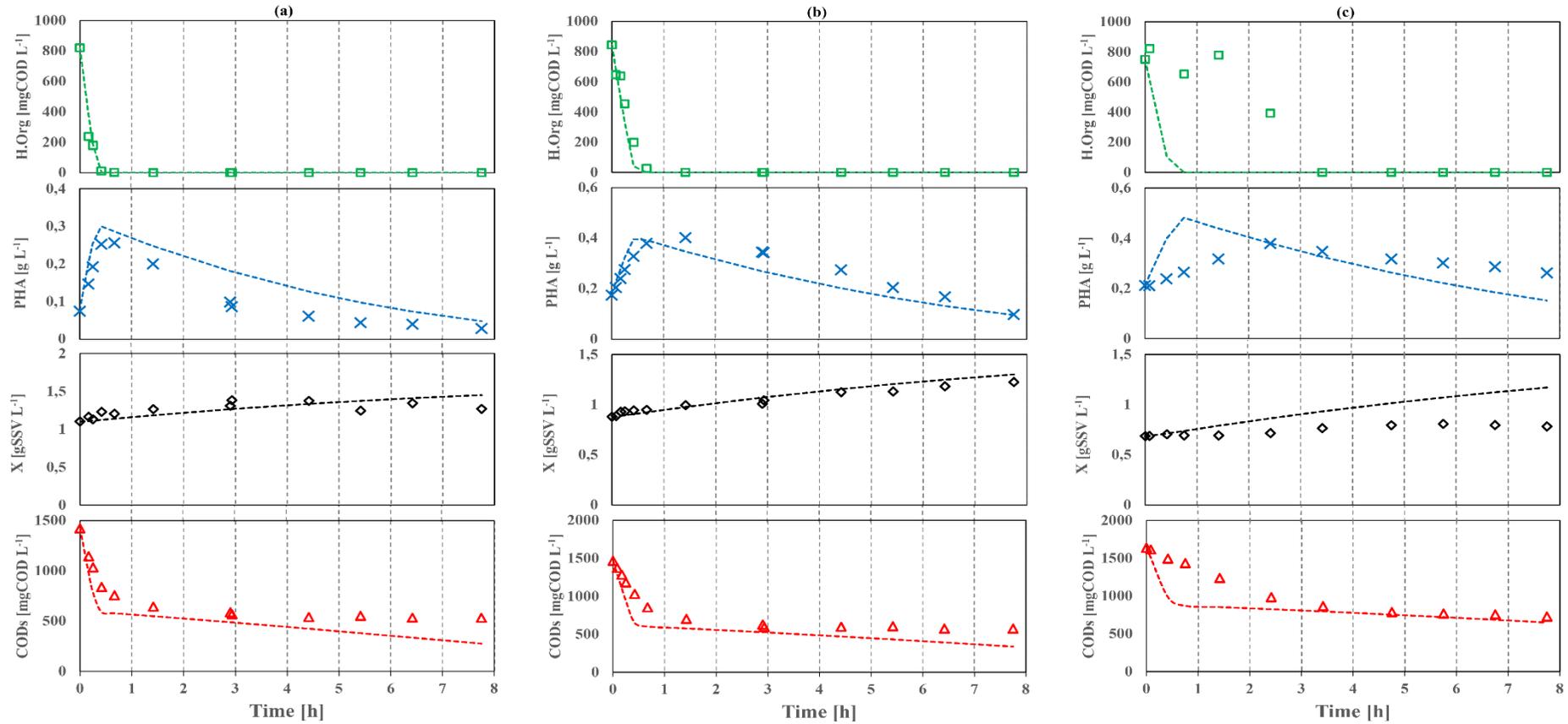
Para avaliar o impacto da falta de suplementação de nitrogênio nos parâmetros cinéticos da biomassa selecionada na condição operacional IV do SBR, o modelo de seleção foi calibrado com dados experimentais da condição operacional IV. A simulação foi realizada com 50.000 iterações e apresentou boa convergência da cadeia e baixos valores de desvio padrão e erro (Tabela 9). O modelo foi capaz de descrever adequadamente o comportamento de substratos e produtos do SBR na condição operacional IV. Como esperado, os parâmetros otimizados pelo MCMC para a condição operacional IV foram muito diferentes daqueles otimizados para a condição operacional II, exceto para $q_{DQO_r}^{max}$ que apresentou valores similares. Os parâmetros $q_{H.Org}^{max}$, $Y_{PHA/H.Org}$, e k_{PHA} apresentaram uma variação maior em comparação com a condição operacional II, o que destaca o impacto que a suplementação de nitrogênio teve na conversão de H.Org para PHA e na subsequente degradação durante o estágio de seleção.

Tabela 9 – Parâmetros livres otimizados pelo MCMC para o modelo de seleção na condição operacional IV do SBR.

Parâmetro	Valor calibrado	Desvio padrão	Erro MCMC	Teste de Geweke
$q_{H.Org}^{max}$	0.3829	0.0099	0.00025	0.99651
$Y_{PHA/H.Org}$	0.3642	0.0153	0.00035	0.99586
$q_{DQO_r}^{max}$	0.0186	0.0037	0.00013	0.99370
k_{PHA}	0.0329	0.0039	0.00014	0.98680
$Y_{X_a/PHA}$	0.7739	0.1437	0.00385	0.97474

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 9 - Validação direta do modelo de seleção. Figura (a): fase operacional I – DQO_t/N 15; Figura (b): fase operacional III – DQO_t/N 40; Figura (c): fase operacional IV – DQO_t/N 80.



Fonte: elaborado pelo autor.

Siglas: linhas pontilhadas representam os valores simulados para o modelo de seleção para H. Org (verde), PHA (azul), X (preto) e DQOs (vermelho); pontos representam os dados experimentais para H. Org (\square), PHA (\times), X (\diamond) e DQOs (Δ).

5.2 MODELO DE ACUMULAÇÃO

5.2.1 Análise de sensibilidade para o modelo de acumulação

Foi realizada uma análise de sensibilidade relativa local para determinar a influência de cada parâmetro do modelo de acumulação sobre as variáveis de saída (Tabela 10). Os resultados indicam que os parâmetros $q_{H.Org}^{max}$, $q_{DQO_r}^{max}$ and $Y_{PHA/H.Org}$ exercem a maior influência sobre as variáveis de saída (valores em negrito) do modelo de acumulação. Portanto, estes parâmetros devem ser determinados por calibração com dados experimentais. Assim como para o modelo de seleção, os parâmetros Y_{X_a/DQO_r} , $K_{H.Org}$ e K_{DQO_r} exercem menos influência. Os valores utilizados foram os apresentados na Tabela 7. Portanto, o número de parâmetros livres foi reduzido de seis para três.

Tabela 10 - Resultados numéricos da análise de sensibilidade relativa local para parâmetros e variáveis para o modelo de acumulação. Os valores em negrito representam os parâmetros mais influentes que foram calibrados e otimizados pelo método MCMC.

Variáveis	Parâmetros					
	$q_{H.Org}^{max}$	$q_{DQO_r}^{max}$	$Y_{PHA/H.Org}$	Y_{X_a/DQO_r}	$K_{H.Org}$	K_{DQO_r}
$C_{H.Org}$	7.852	0.213	0.000	0.213	0.845	0.007
C_{PHA}	0.494	0.001	6.347	0.013	0.052	4.504×10^{-4}
C_{DQO_r}	5.133×10^{-5}	1.312	0.000	0.030	3.320×10^{-5}	0.043
C_{X_a}	1.037×10^{-5}	0.265	0.000	0.266	6.708×10^{-6}	0.008

Fonte: elaborado pelo autor.

Siglas: $q_{H.Org}^{max}$ (velocidade máxima de consumo de H.Org), $Y_{PHA/H.Org}$ (rendimento de PHA referente a H.Org), $q_{DQO_r}^{max}$ (velocidade máxima de consumo de substrato residual), Y_{X_a/DQO_r} (rendimento de biomassa ativa referente a substrato residual).

5.2.2 Calibração do modelo de acumulação

O modelo de acumulação foi calibrado com dados experimentais da condição operacional I, ou seja, a biomassa usada para acumulação foi coletada do SBR (fim da fase de feast) durante a condição operacional I. Primeiro, os parâmetros livres do modelo de acumulação foram estimados pelo Box-Draper e pelo método de otimização MCMC. As

simulações MCMC foram realizadas para 500, 1.000, 5.000 e 10.000 iterações até que a convergência da cadeia chegasse a um resultado satisfatório. Os resultados obtidos após 10.000 iterações do MCMC para o modelo de acumulação são apresentados na Tabela 11. Os resultados demonstram a robustez do método de otimização que atingiu valores baixos de desvio padrão e erro associado ao método. Além disso, todos os parâmetros obtiveram uma convergência superior a 99% para o teste Geweke e uma baixa dispersão da cadeia. Figura 10 apresenta os dados experimentais para a condição operacional I do estágio de acumulação e os valores simulados pelo modelo de acumulação. A Figura 11, mostra a incerteza do modelo de acumulação para cada variável de estado com 50%, 90%, 95% e 99% de confiança.

Tabela 11 - Parâmetros livres otimizados pela MCMC para 10.000 iterações para o modelo de acumulação, assim como as informações estatísticas do método e resultados para os respectivos parâmetros presentes na literatura.

Parâmetro	Valor calibrado	Desvio padrão	Erro MCMC	Teste de Geweke	Tamis et al. (2014b) ^{e,f}	Tamis et al. (2014b) ^{e,g}
$q_{H.Org}^{max}$	0.61	0.005	0.00015	0.999	1.55	0.98
$Y_{PHA/H.Org}$	0.71	0.004	0.00012	0.999	0.83	-
$q_{DQO_r}^{max}$	0.10	0.001	0.00002	0.998	0.28	0.14

Fonte: Elaboração do autor.

^a[$gDQO_{H.Org} gDQO_{Xa}^{-1} h^{-1}$]; ^b[$gDQO_{PHA} gDQO_{H.Org}^{-1}$]; ^c[$gDQO_r gDQO_{Xa}^{-1} \cdot h^{-1}$]; ^d[$gDQO_{Xa} gDQO_r^{-1}$]

^e Calculado usando os fatores de conversão de $1,67 gDQO \cdot gPHA^{-1}$ e $1,42 gDQO \cdot gX^{-1}$

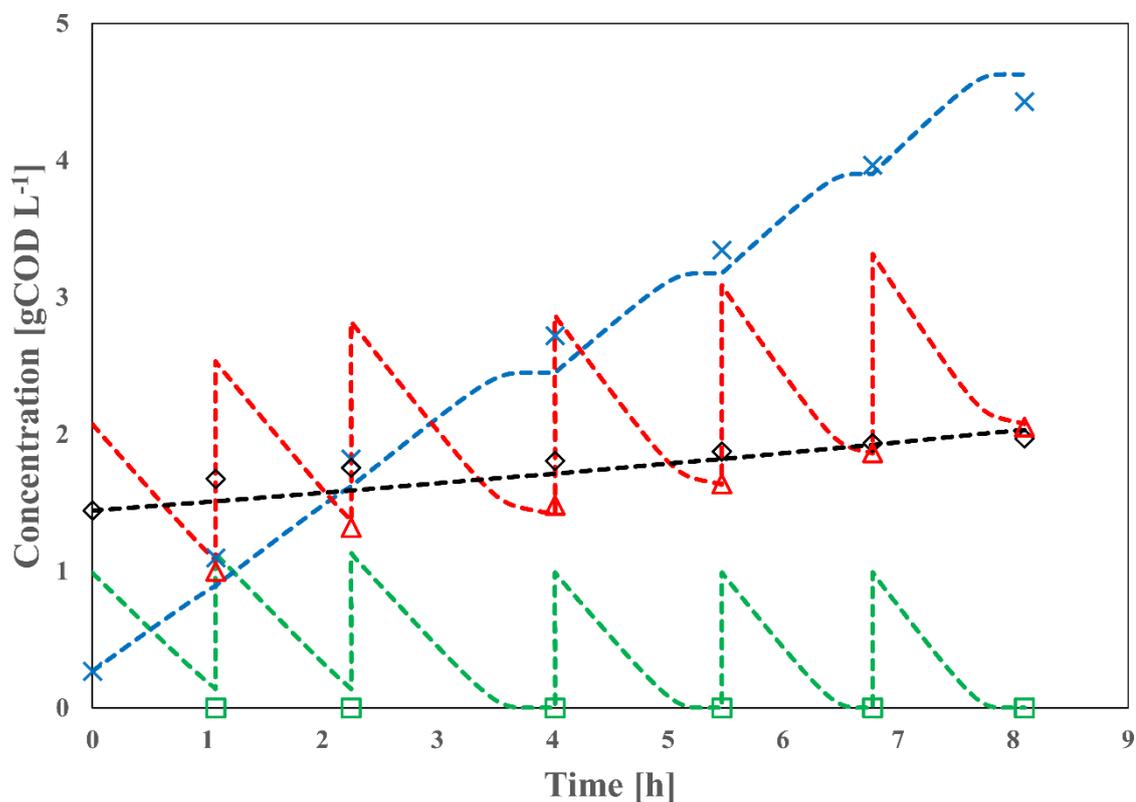
^f experimentos realizados em escala laboratorial; ^g experimentos realizados em escala piloto.

Siglas: $q_{H.Org}^{max}$ (velocidade máxima de consumo de H.Org), $Y_{PHA/H.Org}$ (rendimento de PHA referente a H.Org), $q_{DQO_r}^{max}$ (velocidade máxima de consumo de substrato residual), Y_{Xa/DQO_r} (rendimento de biomassa ativa referente a substrato residual).

Os resultados obtidos para os parâmetros livres do modelo de acumulação são da mesma ordem de grandeza que os resultados apresentados por Tamis et. al. (2014a) (Tabela 11). O $q_{H.Org}^{max}$ apresentou valores inferiores, em comparação com os resultados obtidos no modelo de seleção neste trabalho. Esta diminuição na taxa de consumo entre os estágios de enriquecimento e acumulação também foi observada por Jiang et al. (2011), que sugeriram que altas concentrações iniciais do substrato durante a acumulação podem agir como um inibidor, diminuindo a taxa de consumo do substrato. O $Y_{PHA/H.Org}$ obtido neste trabalho ($0.71 gDQO_{PHA} gDQO_{H.Org}^{-1}$) é inferior ao obtido por Tamis et al. (2014a) (Tabela 11), porém o valor de $0.83 gDQO_{PHA} gDQO_{H.Org}^{-1}$ foi obtido em experimentos usando acetato como o único

substrato, ou seja sem outros interferentes que pudessem diminuir a produção de PHA, indicando que a biomassa selecionada neste trabalho tem uma alta capacidade para converter H.Org em PHA. Em comparação com o valor otimizado para o modelo de seleção, o $Y_{PHA/H.Org}$ para o modelo de acumulação foi significativamente maior. Isto pode estar relacionado com a maior concentração de nitrogênio a que a biomassa está exposta no SBR. A alimentação desacoplada de carbono e nitrogênio visa dissociar o crescimento da biomassa da disponibilidade de substrato para que menos substrato possa ser utilizado para o crescimento durante a fase de feast (OLIVEIRA et al., 2017). Na condição operacional II, ao final do ciclo, o nitrogênio não foi totalmente consumido e estava disponível no início do ciclo subsequente (dados não mostrados). Portanto, durante a fase de feast, o nitrogênio estava presente e os ácidos orgânicos poderiam ser utilizados para crescimento, o que causaria uma diminuição no $Y_{PHA/H.Org}$. De fato, crescimento de biomassa foi observado na fase de feast da condição operacional II do SBR. Outro fator que pode ter contribuído para o $Y_{PHA/H.Org}$ mais alto obtido no modelo de acumulação é o fato de que a biomassa foi exposta a concentrações significativamente maiores de substrato nos experimentos de acumulação. Uma maior disponibilidade do substrato e condições de limitação de nitrogênio (sem suplementação de nutrientes) podem ter favorecido o metabolismo do consórcio para a produção de PHA em detrimento a crescimento na condição operacional I das corridas de acumulação. O $q_{COD,r}^{max}$ estimado para o modelo de acumulação foi ligeiramente superior em comparação com o valor estimado para o modelo de seleção (Tabela 8). Este aumento em $q_{COD,r}^{max}$ poderia causar uma maior produção de biomassa ativa durante a acumulação, o que teria impacto no f_{PHA} . Entretanto, a biomassa ativa no reator aumentou em 37,62% na condição I, que é o menor crescimento observado entre as condições operacionais avaliadas, e o f_{PHA} alcançado foi de $0.65 \text{ gPHA gSSV}^{-1}$, que foi o f_{PHA} mais alto observado. Estes resultados indicam que as condições impostas no reator de seleção (DQO_t/N de 15) favoreceram a produção de PHA no reator de acumulação.

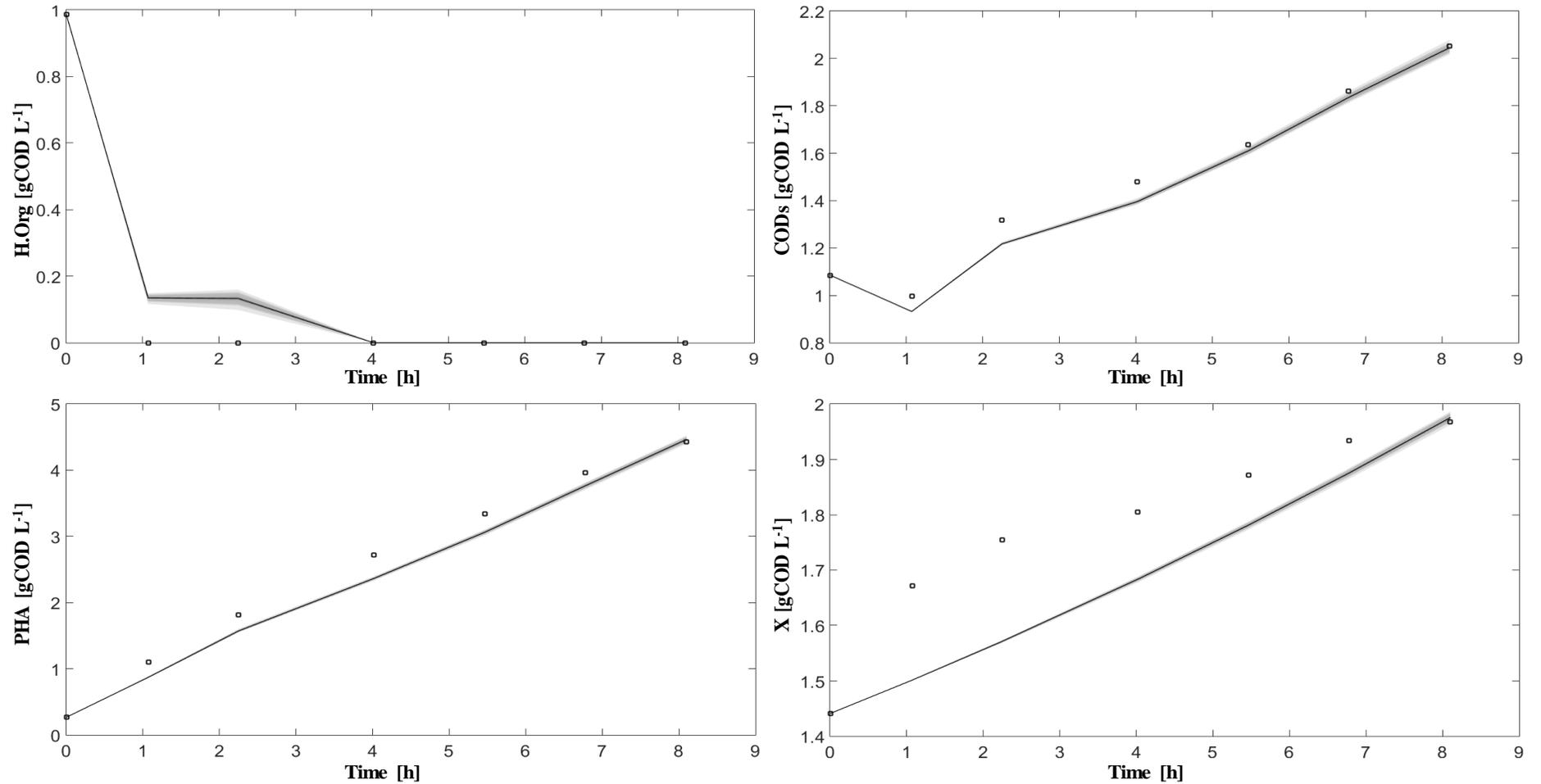
Figura 10 - – Caracterização detalhada de uma corrida de acumulação em reator de batelada alimentada com biomassa coletada durante o período de estabilidade operacional da condição I, incluindo os resultados simulados pelo modelo e dados experimentais.



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: linhas pontilhadas representam resultados simulados após otimização com o MCMC para H.Org (verde), PHA (azul), DQO_s (vermelho) e X_a (preto); marcadores representam os dados experimentais de uma corrida de acumulação com biomassa da condição operacional I para H.Org (□), PHA (×), DQO_s (△) e X_a (◇).

Figura 11 - Previsão da incerteza do modelo de acumulação para cada variável de estado com 50%, 90%, 95% e 99% de confiança. A linha contínua representa os resultados modelados e os quadrados representam os dados experimentais.

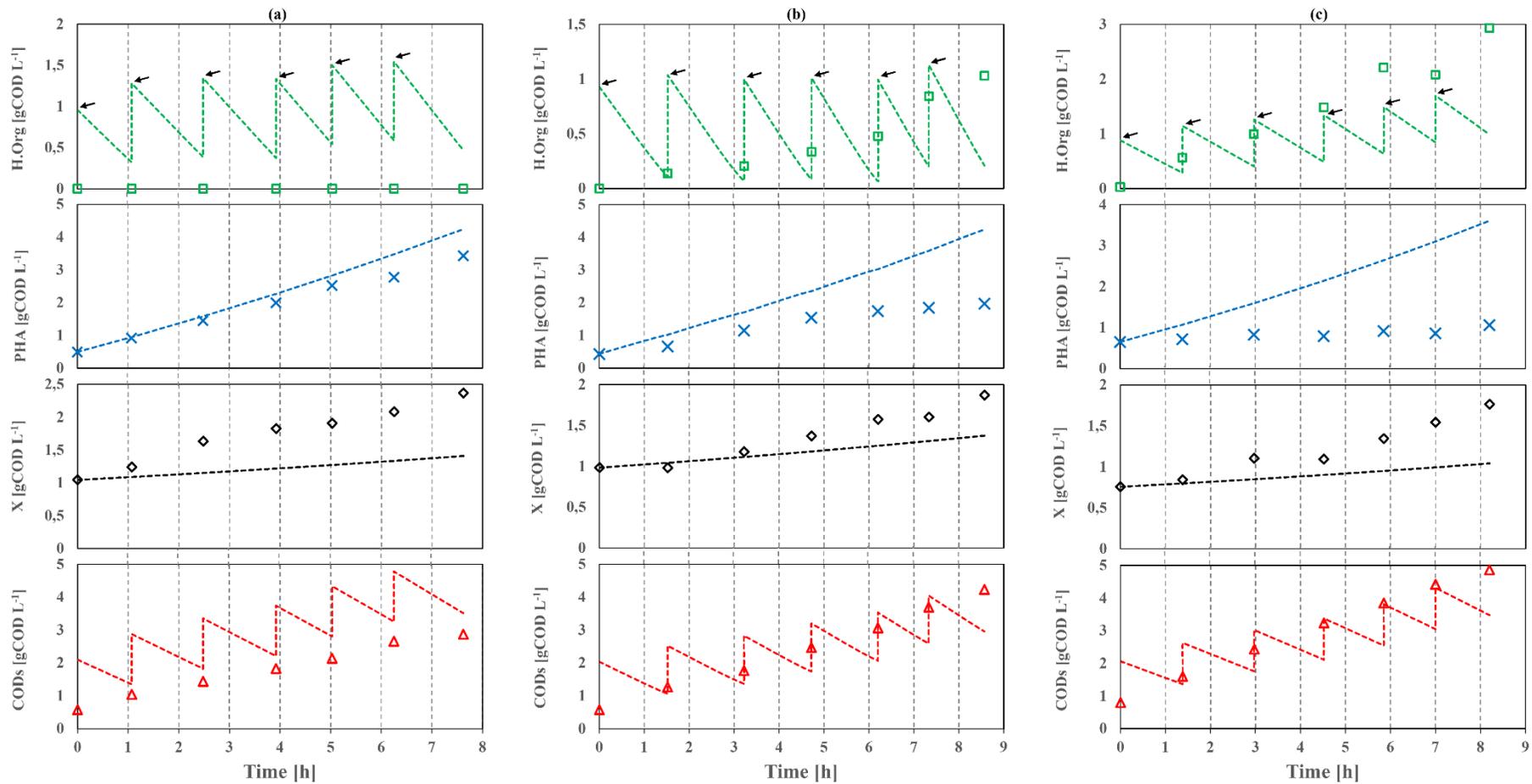


Fonte: elaborado pelo autor.

5.2.3 Validação direta do modelo de acumulação

A validação direta do modelo de acumulação foi realizada com dados experimentais das condições operacionais II, III e IV (Figura 12(a-c), respectivamente). Para isso, foram utilizados os valores dos parâmetros otimizados para a condição operacional I (Tabela 11). Os parâmetros otimizados para a condição operacional I não descreveram com precisão os dados experimentais para as outras condições. A taxa de consumo de substrato foi afetada negativamente nas condições III e IV, enquanto na condição II, a taxa de consumo foi maior em comparação com a condição operacional I. Para todas as condições, a produção de PHA foi superestimada enquanto a taxa de crescimento da biomassa foi subestimada. Este resultado sugere que o metabolismo da biomassa selecionada mudou, e foi direcionado para crescimento, consequentemente diminuindo a produção de PHA. Devido a este comportamento diferente para todas as condições operacionais, o modelo de acumulação foi melhorado com uma nova consideração em sua estrutura, conforme descrito na seção seguinte.

Figura 12 - Validação direta do modelo de acumulação. Figura (a): fase operacional II; Figura (b): fase operacional III; Figura (c): fase operacional IV.



Fonte: elaborado pelo autor.

Siglas: linhas pontilhadas representam os valores simulados para o modelo de acumulação para H.Org (verde), PHA (azul), X (preto) e DQOs (vermelho); pontos representam os dados experimentais para H.Org (\square), PHA (\times), X (\diamond) e DQOs (Δ).

5.2.4 Melhorias no modelo de acumulação para descrever as condições operacionais II, III e IV.

De acordo com os resultados obtidos para a validação direta do modelo de acumulação (Figura 12(a-c)), o $Y_{PHA/H.Org}$ foi menor para as condições operacionais II, III e IV, pois a produção de PHA foi superestimada para estas condições. Levando em conta que no modelo de acumulação, o PHA só pode ser produzido a partir de ácidos orgânicos, pode-se inferir que parte dos ácidos orgânicos consumidos foi direcionada para outra via metabólica. Ao mesmo tempo, foi observado que a concentração de biomassa foi subestimada em todas as condições avaliadas. Assim, foi levantada a hipótese de que os ácidos orgânicos também poderiam ser utilizados como substrato para a produção direta de biomassa, em vez de apenas para a produção de PHA. Portanto, o modelo cinético de acumulação foi modificado considerando que a biomassa ativa pode utilizar tanto DQO_r quanto $H.Org$ para o crescimento. Uma contribuição do consumo de ácidos orgânicos foi adicionada na equação da taxa de crescimento de biomassa (Equação 13). Portanto, a nova equação é governada por um parâmetro de produção de biomassa ativa em ácidos orgânicos ($Y_{X/H.Org}$). Assim, a melhoria do modelo de acumulação é representada pelas Equações 4.4-6 e 5.13.

$$\mu = Y_{X/DQO_r} q_{DQO_r} + Y_{X/H.Org} q_{Horg} \quad (5.13)$$

Como o comportamento observado durante as corridas de acumulação para as condições operacionais foi divergente entre si, foi decidido calibrar o modelo de acumulação melhorado para todas as condições operacionais individualmente para validar a hipótese levantada. Portanto, o modelo de acumulação melhorado foi calibrado com os dados experimentais para as condições operacionais I, II, III e IV. Como um novo parâmetro foi adicionado ao modelo, uma análise de sensibilidade relativa local foi realizada para verificar a influência deste novo parâmetro sobre as variáveis de saída do modelo. Os resultados numéricos da análise de sensibilidade local do modelo de acumulação melhorado são apresentados na Tabela 12. Foi observado que $Y_{X/H.Org}$ influencia significativamente os ácidos orgânicos e a concentração de biomassa ativa do modelo. Assim, Y_{X/DQO_r} , $K_{H.Org}$ e K_{COD_r} permanecem fixos e com os mesmos valores considerados anteriormente, e $q_{H.Org}^{max}$, $q_{DQO_r}^{max}$, $Y_{PHA/H.Org}$ and $Y_{X/H.Org}$ são parâmetros livres que devem ser estimados através de calibração com dados experimentais.

Tabela 12 - Resultados numéricos da análise de sensibilidade relativa local para parâmetros e variáveis para o modelo de acumulação melhorado. Os valores em negrito representam os parâmetros mais influentes que foram calibrados e otimizados pelo método MCMC.

Variáveis	Parâmetros						
	$q_{H.Org}^{max}$	$q_{DQO_r}^{max}$	$Y_{PHA/H.Org}$	Y_{X/DQO_r}	$Y_{X/H.Org}$	$K_{H.Org}$	K_{DQO_r}
$C_{H.Org}$	8.876	0.609	0.000	0.610	1.209	0.696	0.013
C_{PHA}	0.790	0.054	5.940	0.054	0.107	0.062	0.001
C_{COD_r}	0.039	1.174	0.000	0.084	0.170	0.003	0.024
C_X	0.218	0.833	0.000	0.835	1.580	0.017	0.017

Fonte: elaborado pelo autor.

Siglas: $q_{H.Org}^{max}$ (velocidade máxima de consumo de H.Org), $Y_{PHA/H.Org}$ (rendimento de PHA referente a H.Org), $q_{DQO_r}^{max}$ (velocidade máxima de consumo de substrato residual), Y_{X/DQO_r} (rendimento de biomassa ativa referente a substrato residual).

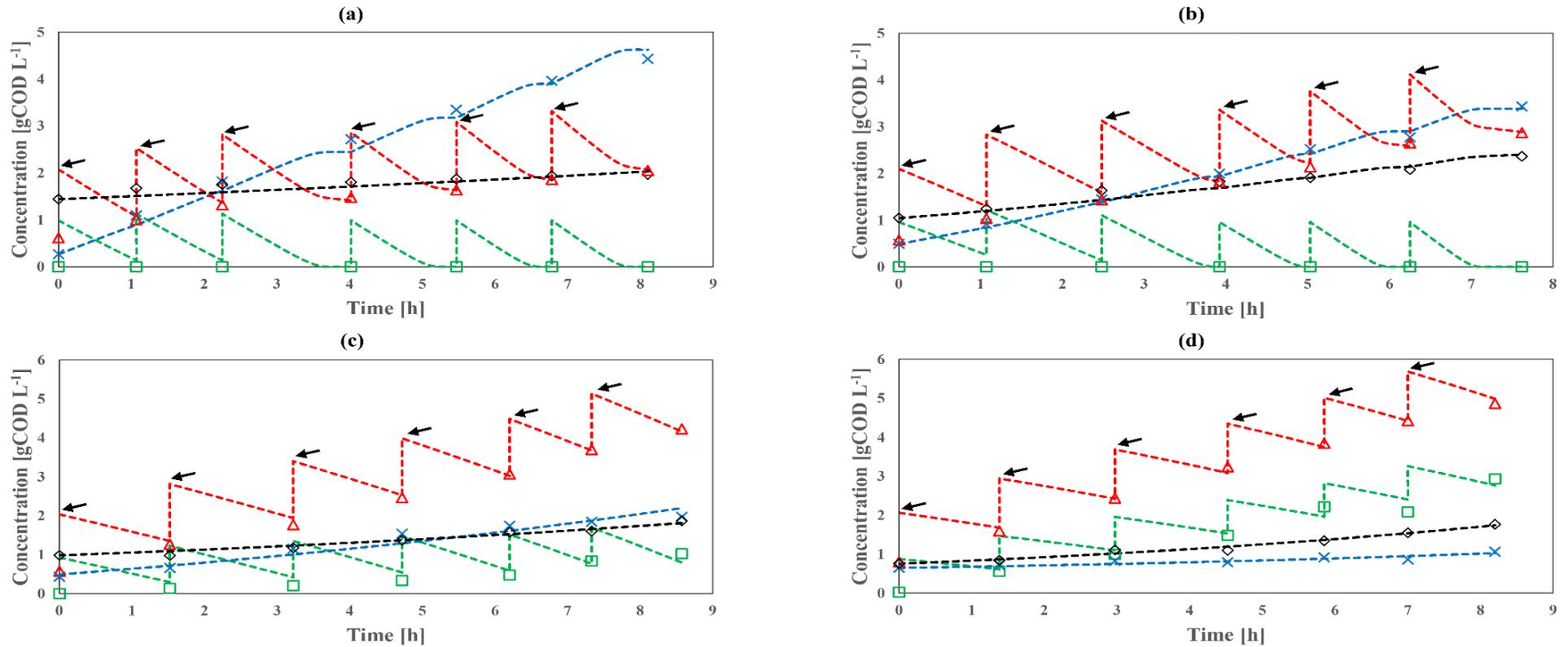
A estimativa dos parâmetros livres do modelo de acumulação melhorado para as condições I, II, III e IV foi realizada novamente pelos métodos Box Draper e MCMC. Todas as simulações MCMC mostraram baixos valores de erro associados ao método e valores superiores a 97% para a convergência da cadeia, conforme avaliado pelo teste de Geweke (dados não mostrados). Os parâmetros otimizados e os valores de desvio padrão para o modelo de acumulação melhorado para condições operacionais I, II, III e IV são apresentados na Tabela 13. Os novos parâmetros estimados pelo MCMC foram capazes de descrever adequadamente o comportamento dos dados experimentais para as condições operacionais I, II, III e IV, como pode ser visto na Figura 13 a-d, respectivamente. A incerteza do modelo de acumulação melhorado para condições operacionais II, III e IV com 50%, 90%, 95% e 99% de confiança são apresentadas nas Figuras 14, 15 e 16, respectivamente. Com relação aos parâmetros estimados para a condição operacional I do modelo de acumulação melhorado, não foram observadas diferenças significativas entre os valores otimizados com aqueles obtidos com o modelo de acumulação anteriormente adotado. As pequenas diferenças observadas estão relacionadas com a variabilidade intrínseca do método de otimização adotado neste trabalho.

Tabela 13 - Parâmetros livres otimizados pelo MCMC para o modelo de acumulação melhorado nas condições operacionais I, II, III e IV.

Parâmetro otimizado	Condição operacional			
	I - $DQO_t/N = 15$	II - $DQO_t/N = 30$	III - $DQO_t/N = 40$	IV - $DQO_t/N = 80$
$q_{H.Org}^{max}$ ^a	0.599 ± 0.006	0.778 ± 0.023	0.437 ± 0.020	0.253 ± 0.017
$Y_{PHA/H.Org}$ ^b	0.740 ± 0.017	0.502 ± 0.013	0.356 ± 0.019	0.162 ± 0.027
$q_{DQO_r}^{max}$ ^c	0.098 ± 0.002	0.084 ± 0.004	0.033 ± 0.008	0.107 ± 0.018
$Y_{X/H.Org}$ ^d	0.012 ± 0.007	0.164 ± 0.015	0.140 ± 0.013	0.248 ± 0.020

^a[$gDQO_{H.Org}gDQO_X^{-1} h^{-1}$], ^b[$gDQO_{PHA}gDQO_{H.Org}^{-1}$], ^c[$gDQO_rgDQO_X^{-1} h^{-1}$], ^d[$gDQO_xgDQO_{H.Org}^{-1}$].

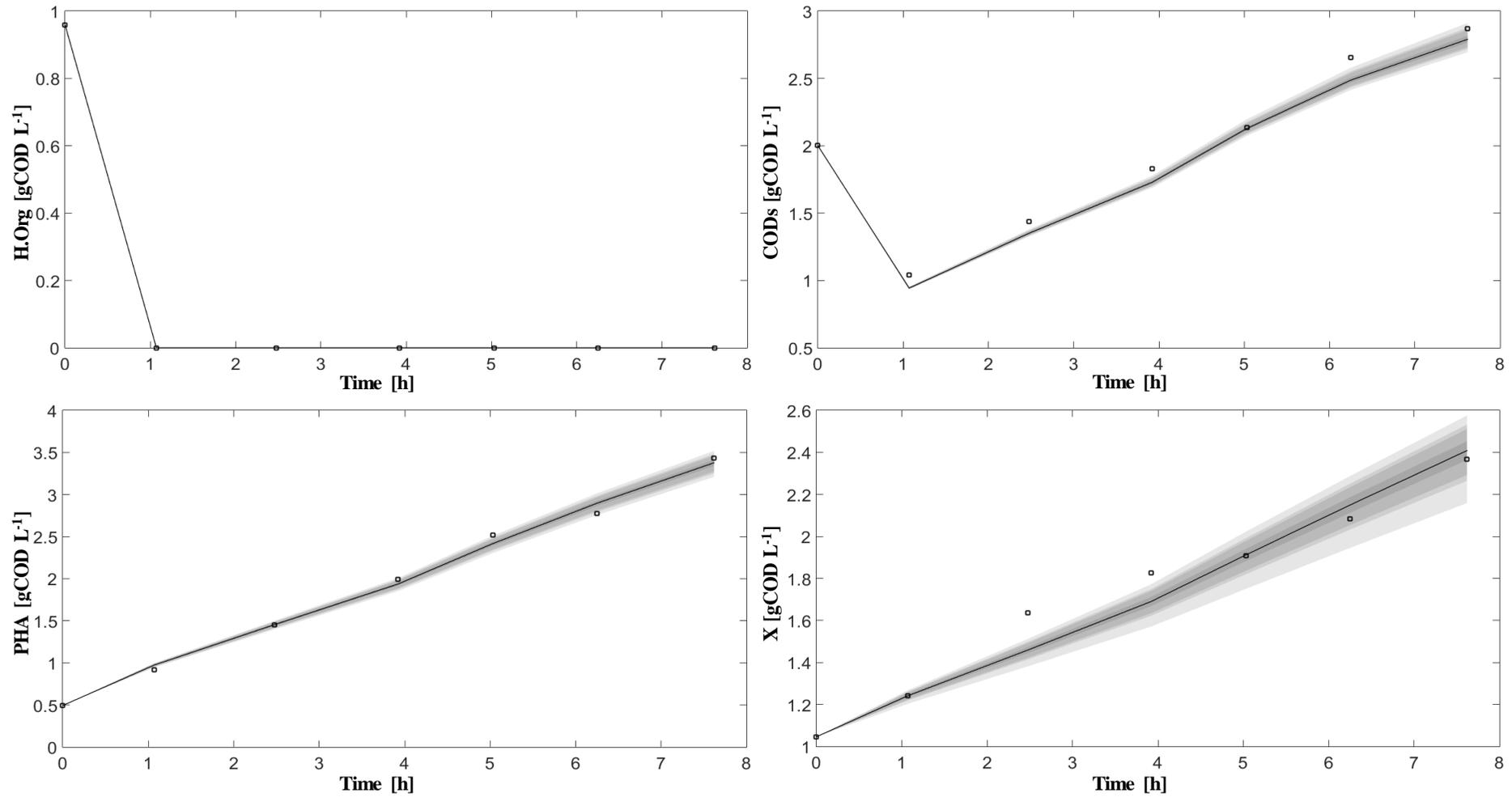
Figura 13 – Caracterização detalhada das corridas de acumulação em reator de batelada alimentada com biomassa coletada no SBR durante o período de estabilidade operacional incluindo os resultados simulados pelo modelo de acumulação melhorado e os dados experimentais para as condições (a) I, (b) II, (c) III e (d) IV.



Fonte: elaborado pelo autor.

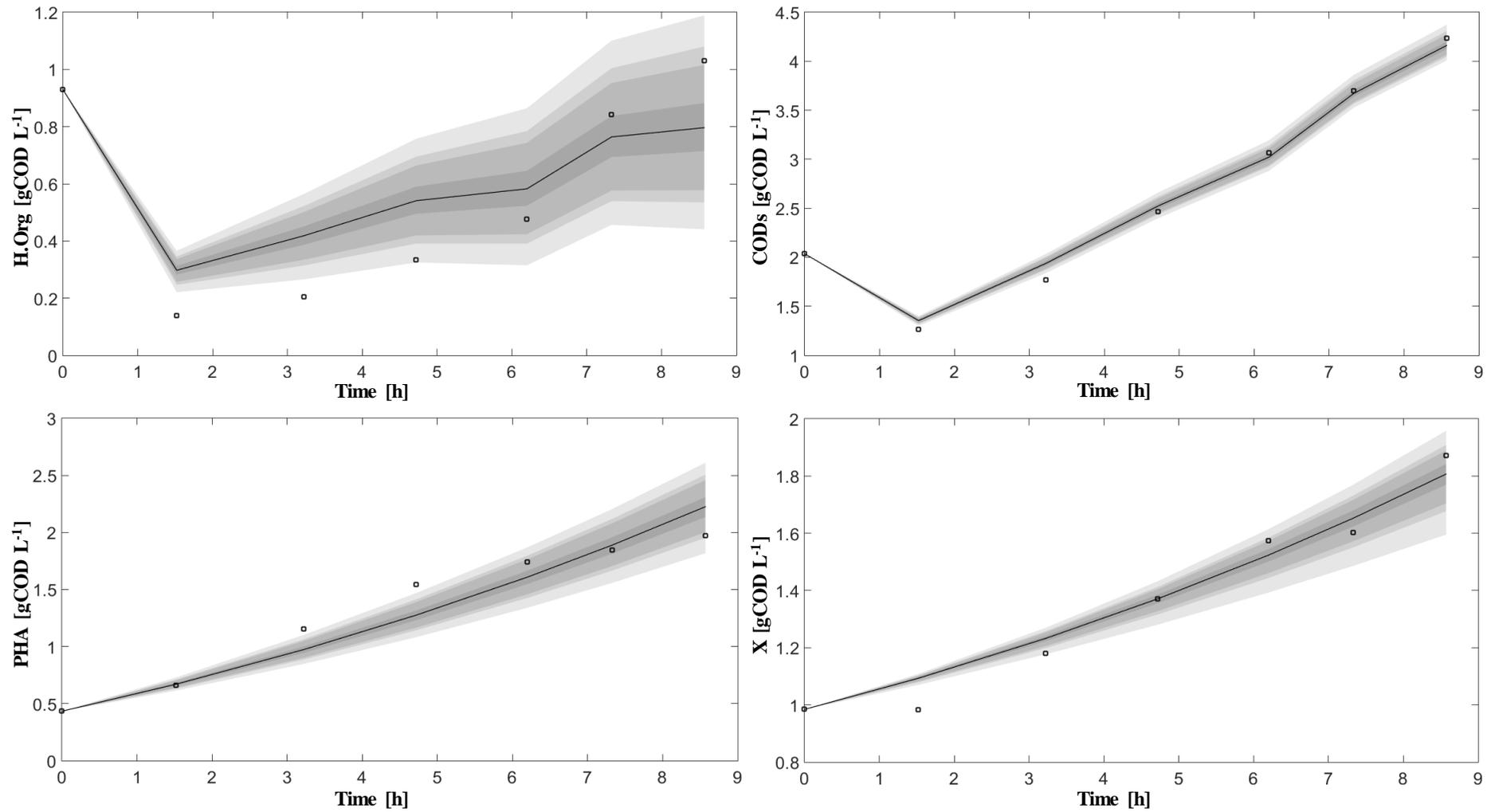
Legenda: linhas pontilhadas representam resultados simulados após otimização com o MCMC para H.Org (verde), PHA (azul), DQO_s (vermelho) e X_a (preto); marcadores representam os dados experimentais das corridas de acumulação com biomassa da condições operacionais I, II, III e IV para H.Org (□), PHA (×), DQO_s (△) e X_a (◇).

Figura 14 - Previsão da incerteza do modelo de acumulação melhorado da condição operacional II para cada variável de estado com 50%, 90%, 95% e 99% de confiança. A linha contínua representa os resultados modelados e os quadrados representam os dados experimentais.



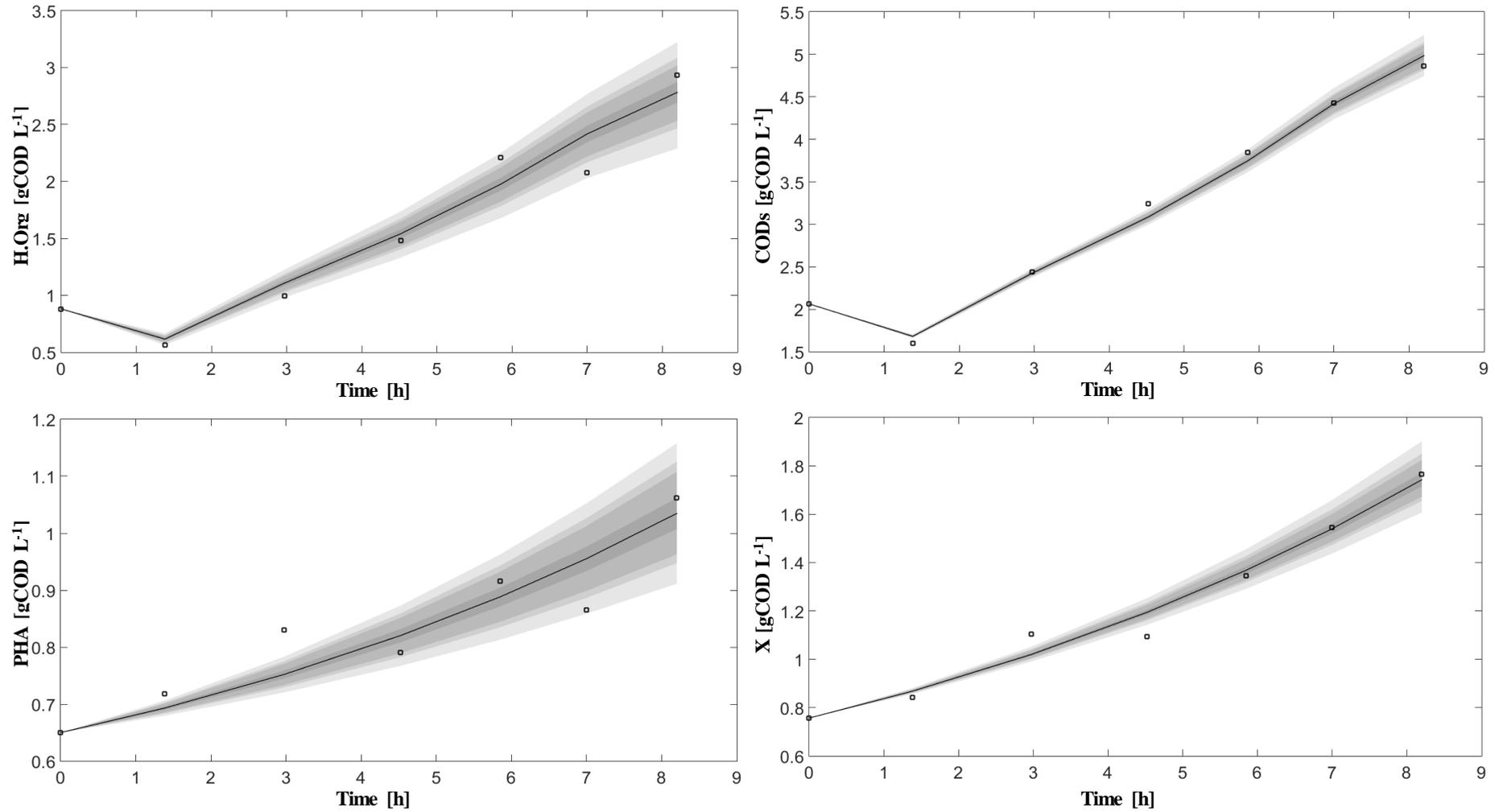
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 15 - Previsão da incerteza do modelo de acumulação melhorado da condição operacional III para cada variável de estado com 50%, 90%, 95% e 99% de confiança. A linha contínua representa os resultados modelados e os quadrados representam os dados experimentais.



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 16 - Previsão da incerteza do modelo de acumulação melhorado da condição operacional IV para cada variável de estado com 50%, 90%, 95% e 99% de confiança. A linha contínua representa os resultados modelados e os quadrados representam os dados experimentais.



Fonte: elaborado pelo autor.

A modificação do modelo de acumulação permitiu a análise do impacto de operar a fase de seleção sob diferentes relações DQOt/N sobre a acumulação de PHA. A seleção de organismos acumuladores de PHA sob diferentes relações DQOt/N afetou fortemente o rendimento de armazenamento, avaliado pelo $Y_{PHA/H.Org}$ nas corridas de acumulação. O $Y_{PHA/H.Org}$ diminuiu progressivamente, à medida que a suplementação de nutrientes foi reduzida (Tabela 13), atingindo $0.74 \text{ gDQO}_{PHA} \text{ gDQO}_{H.Org}^{-1}$ para a condição operacional I e $0.16 \text{ gDQO}_{PHA} \text{ gDQO}_{H.Org}^{-1}$ para a condição operacional IV. Vale mencionar que o $Y_{PHA/H.Org}$ otimizado para o modelo de acumulação melhorado na condição operacional II é igual ao do modelo de seleção ($0.50 \text{ gDQO}_{PHA} \text{ gDQO}_{H.Org}^{-1}$) (estimado a partir da calibração com dados da condição operacional II do SBR), o que reforça a capacidade de previsão que o modelo estruturado por Tamis et. al. (2014a) possui. Para $q_{H.Org}^{max}$, foi observada a mesma tendência que $Y_{PHA/H.Org}$, exceto para a condição operacional II, na qual um valor ligeiramente maior foi estimado ($0.78 \text{ gDQO}_{H.Org} \text{ gDQO}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$). O $q_{H.Org}^{max}$ foi afetado negativamente nas condições operacionais III e IV, nas quais foi observado o acúmulo de H.Org dentro do sistema durante as corridas (Figura 13c - d). Esta diminuição na taxa de consumo não parece ter sido causada por altas concentrações de substrato no reator de acumulação, pois as condições de alimentação foram mantidas as mesmas para todas as condições operacionais. É mais provável que esta diminuição possa estar relacionada às condições experimentais adotadas no SBR (diferentes DQOt/N), o que pode ter levado à seleção de diferentes biomassas. Para $q_{DQO_r}^{max}$, não foi observada nenhuma tendência clara e foram obtidos valores muito semelhantes para as condições I, II e IV. Para a condição III, o valor obtido ($0.03 \text{ gDQO}_r \text{ gDQO}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$) foi ligeiramente inferior. O $Y_{X/H.Org}$, aumentou progressivamente, à medida que a suplementação de nutrientes foi reduzida. Estes resultados demonstram que a diminuição da suplementação de nitrogênio no reator de seleção induziu uma resposta de crescimento nas corridas de acumulação. De fato, a biomassa selecionada sob maior disponibilidade de nitrogênio direcionou uma quantidade menor dos ácidos orgânicos para o crescimento ($0.01 \text{ gDQO}_X \text{ gDQO}_{H.Org}^{-1}$), enquanto que a biomassa selecionada sob menor disponibilidade de nitrogênio direcionou uma quantidade maior ($0.25 \text{ gDQO}_X \text{ gDQO}_{H.Org}^{-1}$), em relação às condições operacionais II e III, ambas tiveram resultados similares para $Y_{X/H.Org}$ (0.16 e $0.14 \text{ gDQO}_X \text{ gDQO}_{H.Org}^{-1}$, respectivamente).

Na condição operacional II, foi observado um aumento de 125,67% na biomassa ativa do reator e um f_{PHA} de $0.54 \text{ gPHA gSSV}^{-1}$. Estes resultados são interessantes pois indicam que

a biomassa selecionada na condição II foi capaz de produzir quantidades significativas de novas células sem perder a capacidade de acumular PHA em níveis elevados. Em um contexto de aplicação industrial, isto pode ser uma vantagem, pois aumenta a produtividade volumétrica de PHA no final do processo de três estágios. Por exemplo, considerando tanto as etapas de seleção como de acumulação, a produtividade volumétrica observada nas condições I e II foram muito semelhantes (2.1 e 2.0 gPHA L⁻¹ d⁻¹ para as condições I e II, respectivamente). Portanto, a biomassa na condição II produziu quantidades semelhantes de PHA que foram suplementadas com menos nitrogênio, o que significaria menores custos de produção, tornando mais vantajosa a utilização em escalas maiores. De fato, em experiências em escala piloto aplicando o fornecimento desacoplado de carbono e nitrogênio, a suplementação de nitrogênio no SBR de seleção visou chegar a uma DQOt/N de 33.4, o que suporta a aplicação das condições operacionais que selecionaram a biomassa na condição II em escalas maiores (MATOS et al., 2021b, 2021a). Por outro lado, níveis intracelulares elevados de PHA são desejáveis para o processamento downstream de biomassa para extração de PHA. Os custos com downstream estão entre os fatores mais importantes que afetam o custo total de produção de PHA por culturas mistas. Um f_{PHA} mais alto torna a parede das células mais suscetível à ruptura, facilitando a liberação do biopolímero e diminuindo os custos com solvente usado para extração (DE DONNO NOVELLI; MORENO SAYAVEDRA; RENE, 2021; MANNINA et al., 2020). Portanto, além da produtividade do processo (avaliada pela produtividade volumétrica), a quantidade de PHA que o consórcio pode acumular também deve ser levada em conta em projetos de aumento de escala. Assim, a biomassa selecionada em I tem uma vantagem sobre a biomassa selecionada em II, uma vez que atingiu maior f_{PHA} (0.65 e 0.54 gPHA gSSV⁻¹ para I e II, respectivamente).

A cultura selecionada sem suplementação de nitrogênio (condição operacional IV) alcançou o menor $Y_{\text{PHA}/\text{H.Org}}$ e $q_{\text{H.Org}}^{\text{max}}$ e o maior $Y_{\text{X}/\text{H.Org}}$ de todas as condições, indicando que o metabolismo foi favorecido em direção à produção de biomassa ativa. Além disso, o f_{PHA} (0.33 gPHA gSSV⁻¹) no final da corrida de acumulação foi inferior ao f_{PHA} no início (0.42 gPHA gSSV⁻¹), devido à produção de biomassa ativa. O conteúdo intracelular máximo na condição operacional IV foi alcançado no reator de seleção no final da fase de feast. Valores similares foram relatados por de Oliveira et al. (2019) para vinhaça de cana acidificada apresentando uma relação DQOt/N de 335 e sem suplementação externa de nitrogênio no SBR. Nesse trabalho, com um OLR de 7.0 kg DQOt m⁻³ d⁻¹ o f_{PHA} no final da fase de feast era de 0.49 gPHA gSSV⁻¹. Uma diminuição na capacidade de armazenamento do PHA, quando o

reator de seleção é operado sob limitação de nutrientes, está de acordo com as descobertas de Oliveira et al. (2018), que observaram que um aumento na DQOt/N de 18 para 35 no SBR resultou em uma diminuição no $Y_{\text{PHA}/\text{H.Org}}$ de 0.85 para 0.52 $\text{gDQO}_{\text{PHA}} \text{gDQO}_{\text{H.Org}}^{-1}$ nos experimentos de acumulação.

5.3 VALIDAÇÃO CRUZADA DO MODELO DE ACUMULAÇÃO

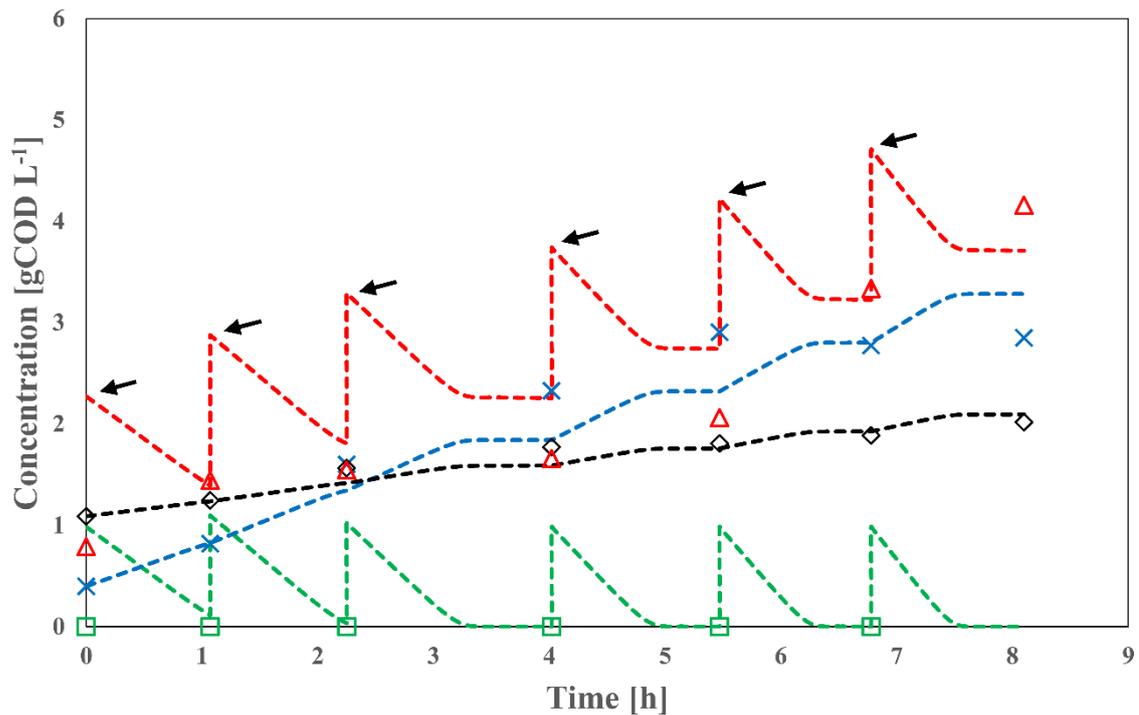
Para avaliar melhor o modelo de acumulação, foi realizada uma validação cruzada com dados experimentais de uma corrida de acumulação com melaço de cana acidificado e a biomassa do SBR na condição operacional I. A simulação foi realizada com 10.000 iterações e mostrou baixo desvio padrão e valores de erro e uma convergência satisfatória da cadeia gerada (Tabela 14). Vale notar que a biomassa selecionada na condição I mostrou um comportamento diferente nos experimentos com melaço acidificado em comparação com o observado na corrida de acumulação com vinhaça acidificada. O $q_{\text{H.Org}}^{\text{max}}$ foi ligeiramente superior àquele otimizado para a condição I com vinhaça acidificada. É importante ressaltar que o melaço acidificado utilizado é composto de ácidos orgânicos diferentes daqueles encontrados na vinhaça acidificada, sendo o ácido láctico responsável por 46,55% da DQOs (Tabela 4). Portanto, esta diferença na taxa de consumo de H.Org é esperada, pois a vinhaça acidificada utilizada na fase de seleção mostrou apenas quantidades traço de ácido láctico (Tabela 3). Além disso, isto indica que a biomassa selecionada no SBR é capaz de se adaptar a diferentes subprodutos da biorefinaria da cana-de-açúcar, assim a produção de PHA por culturas mistas poderia ser integrada tanto a produção de etanol quanto a produção de açúcar. Outro ponto interessante é o fato de que ao final dos experimentos uma porção recalcitrante da DQOs não foi consumida. Assim, ainda seria necessário um pós-tratamento para o descarte correto deste efluente. Uma opção, que já foi amplamente avaliada tanto para o melaço (FUESS; ZAIAT; NASCIMENTO, 2021) quanto para a vinhaça de cana de açúcar (KIYUNA; FUESS; ZAIAT, 2017) e que poderia diversificar ainda mais a cadeia de produção das biorrefinarias, seria a aplicação da digestão anaeróbia para a produção de biometano. Assim, os efluentes da indústria da cana-de-açúcar poderiam ser considerados matéria-prima para a produção de PHA e para a geração de biogás. A Figura 6 mostra a caracterização detalhada do experimento de acumulação com melaço acidificado e os resultados obtidos com o modelo.

Tabela 14 - Parâmetros livres otimizados pelo MCMC com 10000 iterações para o modelo de acumulação melhorado na corrida de acumulação com biomassa coletada do SBR na condição operacional I usando melão de cana acidificado, assim como informações estatísticas do método.

Parâmetro	Valor otimizado	Desvio padrão	Erro MCMC	Teste de Geweke
$q_{H.Org}^{max}$ ^a	0.7843	0.0147	0.00070	0.99847
$Y_{PHA/H.Org}$ ^b	0.4891	0.0066	0.00038	0.99534
$q_{DQO_r}^{max}$ ^c	0.0055	0.0028	0.00016	0.80683
$Y_{X/H.Org}$ ^d	0.1663	0.0067	0.00029	0.98089

^a[gDQO_{H.Org}gDQO_X⁻¹ h⁻¹], ^b[gDQO_{PHA}gDQO_{H.Org}⁻¹], ^c[gDQO_rgDQO_X⁻¹ h⁻¹], ^d[gDQO_XgDQO_{H.Org}⁻¹].

Figura 17 - Caracterização detalhada da corrida de acumulação em reator de batelada alimentada com melão de cana acidificado e biomassa selecionada no SBR durante o período de estabilidade operacional da condição I.



Fonte: elaborado pelo autor.

Legenda: linhas pontilhadas representam resultados simulados após otimização com o MCMC para H.Org (verde), PHA (azul), DQO_s (vermelho) e X_a (preto); marcadores representam os dados experimentais de uma corrida de acumulação com melão de cana acidificado e biomassa da condição operacional I para H.Org (□), PHA (×), DQO_s (△) e X_a (◇).

6 CONCLUSÕES

Neste estudo, foram desenvolvidos modelos que descrevem o enriquecimento das espécies produtoras de PHA e o acúmulo de PHA a partir da vinhaça de cana de açúcar. Para o SBR de enriquecimento, foi obtido um modelo geral para o caso em que houve suplementação de nitrogênio. Para a fase de acumulação, não foi possível obter um modelo geral, devido às diferentes condições adotadas no SBR. Dessa maneira, foi proposta uma modificação no modelo estruturado para o reator de acumulação para descrever todas as condições operacionais adotadas. A otimização dos parâmetros do modelo de acumulação melhorado permitiu avaliar o impacto que diferentes níveis de suplementação externa de nitrogênio no reator de seleção possui na acumulação de PHA. A aplicação de maiores relações DQOt/N induziu uma resposta de crescimento na biomassa, diminuindo o rendimento e a produção de PHA. Em contrapartida, menores relações DQOt/N induziram uma resposta de armazenamento na biomassa, atingido maiores rendimentos e teores finais polímero. Os resultados encontrados neste trabalho revelaram o impacto que a relação DQOt/N adotada no SBR tem sobre o acúmulo de PHA, avaliando os parâmetros cinéticos das biomassas, contribuindo para a elucidação dos mecanismos envolvidos na produção de PHA a partir de vinhaça de cana-de-açúcar por culturas mistas microbianas.

7 RECOMENDAÇÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A seguir são apresentadas sugestões para trabalhos futuros acerca da modelagem matemática do processamento da vinhaça de cana-de-açúcar para produção de PHA por CMM:

- i. O modelo de Tamis et. al. (2014a) considera a conversão dos ácidos orgânicos em PHA, não havendo a diferenciação entre os monômeros produzidos. Uma forma de melhorar o modelo seria diferenciar o consumo de ácidos orgânicos entre precursores de PHB, PHV, PHH, entre outros, com o objetivo de prever a composição final do polímero produzido;
- ii. O modelo Tamis et. al. (2014a) considera a biomassa como “aglomerada”, isto é, a biomassa ativa do sistema é a soma entre a biomassa produtora de PHA e a biomassa não produtora de PHA. A inserção no modelo SBR de enriquecimento da dinâmica do nitrogênio associada a análises de biologia molecular no decorrer do tempo dos ciclos *feast-famine*, poderia auxiliar na elucidação de quais espécies foram enriquecidas sob maior disponibilidade de nitrogênio e que tiveram importante papel na acumulação de PHA;
- iii. Durante a etapa de acumulação os consórcios selecionados sob maiores relações $DQO_t/Nitrogênio$ apresentaram um metabolismo diferente, quando comparados com as biomassas selecionadas sob menores relações $DQO_t/Nitrogênio$, ocorrendo um redirecionamento dos ácidos orgânicos consumidos para crescimento, em detrimento a acumulação de PHA. Análises de biologia molecular durante o ensaio de acumulação, poderiam indicar se esse redirecionamento do metabolismo foi realizado pelas bactérias produtoras ou pelas não produtoras, através da análise da mudança na abundância relativa das espécies no decorrer do tempo, o que poderia auxiliar na elucidação dos mecanismos envolvidos;

REFERÊNCIAS

ADORNO, M.; HIRASAWA, J.; VARESCHE, M. Development and validation of two methods to quantify volatile acids. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 5, n. May, p. 406–414, 2014.

ALBERT, C. G.; CALLIES, U.; TOUSSAINT, U. VON. A Bayesian Approach to the Estimation of Parameters and Their Interdependencies in Environmental Modeling. **Entropy**, v. 24, n. 2, p. 1–32, 2022.

ALBUQUERQUE, M. G. E. et al. Strategies for the development of a side stream process for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from sugar cane molasses. **Journal of Biotechnology**, v. 130, n. 4, p. 411–421, 2007.

ALBUQUERQUE, M. G. E.; TORRES, C. A. V.; REIS, M. A. M. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production by a mixed microbial culture using sugar molasses: Effect of the influent substrate concentration on culture selection. **Water Research**, v. 44, n. 11, p. 3419–3433, 2010.

AMULYA, K. et al. Wastewater as renewable feedstock for bioplastics production: Understanding the role of reactor microenvironment and system pH. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p. 4618–4627, 2016.

ANTERRIEU, S. et al. Integration of biopolymer production with process water treatment at a sugar factory. **New Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 308–323, 2014.

APHA; AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Washington DC: [s.n.]. v. 51

BASSET, N. et al. Integrating the selection of PHA storing biomass and nitrogen removal via nitrite in the main wastewater treatment line. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 820–829, 2016.

BECCARI, M. et al. Exploiting olive oil mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic-aerobic process. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 6, p. 901–908, 2009.

BENGTSSON, S.; WERKER, A.; WELANDER, T. Production of polyhydroxyalkanoates by glycogen accumulating organisms treating a paper mill wastewater. **Water Science and Technology**, v. 58, n. 2, p. 323–330, 1 ago. 2008.

BEUN, J. J. et al. Stoichiometry and kinetics of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in aerobic, slow growing, activated sludge cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 67,

n. 4, p. 379–389, 2000.

BEUN, J. J. et al. Poly- β -hydroxybutyrate metabolism in dynamically fed mixed microbial cultures. **Water Research**, v. 36, n. 5, p. 1167–1180, 2002.

BOX, G. E. P. et al. Some Problems Associated with the Analysis of Multiresponse Data. **Technometrics**, v. 15, n. 1, p. 33–51, 1973.

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 65, n. 2–3, p. 127–161, 1998.

BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTY, R. M. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- γ -hydroxybutyric acid in microbial biomass. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 29–37, 1978.

BROWN, L.; MAC BERTHOUEX, P. **Statistics for Environmental Engineers**. Second edi ed. [s.l: s.n.].

CARLSON, R.; WLASCHIN, A.; SRIENC, F. Kinetic Studies and Biochemical Pathway Analysis of Anaerobic Poly-(R)-3-Hydroxybutyric Acid Synthesis in Escherichia coli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 713–720, fev. 2005.

CHEN, G. Industrial Production of PHA. v. 14, 2010.

CHEN, G.; CHEN, G. www.rsc.org/csr | Chemical Society Reviews A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. n. Table 2, 2009.

CHEN, G. Q. et al. Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 10, p. 565–574, 2015.

CHEN, S.-T.; HSU, C.-Y.; BERTHOUEX, P. M. Fate and Modeling of Pentachlorophenol Degradation in a Laboratory-Scale Anaerobic Sludge Digester. **Journal of Environmental Engineering**, v. 132, n. 7, p. 795–802, 2006.

CHEN, Z. et al. Modeling polyhydroxyalkanoate (PHA) production in a newly developed aerobic dynamic discharge (ADD) culture enrichment process. **Chemical Engineering Journal**, v. 298, p. 36–43, 2016.

CHOI, J.; LEE, S. Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 1, p. 13–21, 1999.

CHUA, A. S. . et al. Production of polyhydroxyalkanoates (PHA) by activated sludge treating municipal wastewater: effect of pH, sludge retention time (SRT), and acetate concentration in influent. **Water Research**, v. 37, n. 15, p. 3602–3611, set. 2003.

CONCEIÇÃO, E. L. T.; PORTUGAL, A. A. T. G. Comparison of two robust alternatives to the box-droper determinant criterion in multiresponse kinetic parameter estimation. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 51, n. 3, p. 1118–1130, 2012.

COOLEY, R. L. A method of estimating parameters and assessing reliability for models of steady state Groundwater flow: 2. Application of statistical analysis. **Water Resources Research**, v. 15, n. 3, p. 603–617, jun. 1979.

COUTO, P. T. et al. Calibration of ADM1 using the Monte Carlo Markov Chain for modeling of anaerobic biodigestion of sugarcane vinasse in an AnSBBR. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 141, p. 425–435, 2019.

COUTO, P. T. et al. Modelling sugarcane vinasse processing in an acidogenic reactor to produce hydrogen with an ADM1-based model. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 11, p. 6217–6230, 2020.

COUTO, P. T. **Estudo da utilização do ADM1 como plataforma de modelagem para reatores em batelada empregados no processamento anaeróbio da vinhaça de cana-de-açúcar**. [s.l.: s.n.].

DE DONNO NOVELLI, L.; MORENO SAYAVEDRA, S.; RENE, E. R. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production via resource recovery from industrial waste streams: A review of techniques and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 331, n. March, p. 124985, 2021.

DE OLIVEIRA, G. H. D. et al. Effects of the Organic Loading Rate on Polyhydroxyalkanoate Production from Sugarcane Stillage by Mixed Microbial Cultures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 189, n. 4, p. 1039–1055, 2019.

DIAS, J. M. L. et al. Mathematical modelling of a mixed culture cultivation process for the production of polyhydroxybutyrate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 92, n. 2, p. 209–222, 2005.

DIAS, J. M. L. et al. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: From the substrate to the final product. **Macromolecular Bioscience**, v. 6, n. 11, p. 885–906, 2006.

DIAS, J. M. L. et al. Metabolic modelling of polyhydroxyalkanoate copolymers production by mixed microbial cultures. **BMC Systems Biology**, v. 2, p. 1–21, 2008.

DIONISI, D. et al. Biodegradable Polymers from Organic Acids by Using Activated Sludge Enriched by Aerobic Periodic Feeding. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 85, n. 6, p. 569–579, 2004.

DIRCKS, K. et al. Glycogen metabolism in aerobic mixed cultures. **Biotechnology and**

Bioengineering, v. 73, n. 2, p. 85–94, 2001.

DONOSO-BRAVO, A. et al. Model selection, identification and validation in anaerobic digestion: A review. **Water Research**, v. 45, n. 17, p. 5347–5364, 2011.

DURNER, R.; WITHOLT, B.; EGLI, T. Accumulation of Poly[(R)-3-Hydroxyalkanoates] in *Pseudomonas oleovorans* during Growth with Octanoate in Continuous Culture at Different Dilution Rates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3408–3414, ago. 2000.

ENG SÁNCHEZ, F. et al. Value-added soluble metabolite production from sugarcane vinasse within the carboxylate platform: An application of the anaerobic biorefinery beyond biogas production. **Fuel**, v. 286, n. September 2020, 2021.

ESPAÑA-GAMBOA, E. et al. Vinasses: Characterization and treatments. **Waste Management and Research**, v. 29, n. 12, p. 1235–1250, 2011.

FERNÁNDEZ-DACOSTA, C. et al. Microbial community-based polyhydroxyalkanoates (PHAs) production from wastewater: Techno-economic analysis and ex-ante environmental assessment. **Bioresource Technology**, v. 185, p. 368–377, 2015.

FUESS, L. T. et al. Operational strategies for long-term biohydrogen production from sugarcane stillage in a continuous acidogenic packed-bed reactor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 41, n. 19, p. 8132–8145, 2016.

FUESS, L. T. et al. Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. **Applied Energy**, v. 189, p. 480–491, 2017.

FUESS, L. T. **Biodigestão anaeróbia termofílica de vinhaça em sistemas combinados do tipo acidogênico-metanogênico para potencialização da recuperação de bioenergia em biorrefinarias de cana-de-açúcar de primeira geração**. São Carlos: Universidade de São Paulo, 25 abr. 2017.

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. September 2017, p. 426–433, 2018.

FUESS, L. T.; RODRIGUES, I. J.; GARCIA, M. L. Fertirrigation with sugarcane vinasse: Foreseeing potential impacts on soil and water resources through vinasse characterization. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 52, n. 11, p. 1063–1072, 2017.

FUESS, L. T.; ZAIAT, M.; DO NASCIMENTO, C. A. O. Novel insights on the versatility of biohydrogen production from sugarcane vinasse via thermophilic dark

fermentation: Impacts of pH-driven operating strategies on acidogenesis metabolite profiles. **Bioresource Technology**, v. 286, n. April, p. 121379, 2019.

FUESS, L. T.; ZAIAT, M.; NASCIMENTO, C. A. O. DO. Thermophilic biodigestion of fermented sugarcane molasses in high-rate structured-bed reactors: Alkalinization strategies define the operating limits. **Energy Conversion and Management**, v. 239, n. April, p. 114203, 2021.

GEWEKE, J. Evaluating the Accuracy of Sampling-Based Approaches to the Calculation of Posterior Moments. **Bayesian Statistics**, v. 4, n. November 1995, 1992.

GOUVEIA, A. R. et al. Dynamic change of pH in acidogenic fermentation of cheese whey towards polyhydroxyalkanoates production: Impact on performance and microbial population. **New Biotechnology**, v. 37, p. 108–116, 2017.

GUJER, W. et al. Activated Sludge Model No. 3. **Water Science and Technology**, v. 39, n. 1, p. 183–193, 1999.

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

HAMBY, D. M. A Review of Techniques for Parameter Sensitivity. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 32, n. c, p. 135–154, 1994.

HUANG, L. et al. Bioresource Technology Toward flexible regulation of polyhydroxyalkanoate composition based on substrate feeding strategy : Insights into microbial community and metabolic features. v. 296, n. November 2019, 2020.

JIANG, Y. **Polyhydroxyalkanoates production by bacterial enrichments**. [s.l: s.n.].

JIANG, Y. et al. Metabolic modeling of mixed substrate uptake for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. **Water Research**, v. 45, n. 3, p. 1309–1321, 2011a.

JIANG, Y. et al. Effect of temperature and cycle length on microbial competition in PHB-producing sequencing batch reactor. **ISME Journal**, v. 5, n. 5, p. 896–907, 2011b.

JIANG, Y. et al. Polyhydroxybutyrate production from lactate using a mixed microbial culture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 9, p. 2022–2035, 2011c.

JOHNSON, K. et al. Enrichment of a mixed bacterial culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity. **Biomacromolecules**, v. 10, n. 4, p. 670–676, 2009.

JOHNSON, K. **PHA Production in Aerobic Mixed Microbial Cultures**. [s.l: s.n.].

JOHNSON, K. et al. Short- and long-term temperature effects on aerobic polyhydroxybutyrate producing mixed cultures. **Water Research**, v. 44, n. 6, p. 1689–1700, mar. 2010.

JOHNSON, K.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Model-based

data evaluation of polyhydroxybutyrate producing mixed microbial cultures in aerobic sequencing batch and fed-batch reactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 1, p. 50–67, 2009.

JOHNSON, K.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Influence of the C/N ratio on the performance of polyhydroxybutyrate (PHB) producing sequencing batch reactors at short SRTs. **Water Research**, v. 44, n. 7, p. 2141–2152, 2010a.

JOHNSON, K.; KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M. Influence of ammonium on the accumulation of polyhydroxybutyrate (PHB) in aerobic open mixed cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 147, n. 2, p. 73–79, 17 maio 2010b.

KIYUNA, L. S. M.; FUESS, L. T.; ZAIAT, M. Unraveling the influence of the COD/sulfate ratio on organic matter removal and methane production from the biodigestion of sugarcane vinasse. **Bioresource Technology**, v. 232, p. 103–112, maio 2017.

KLEEREBEZEM, R.; VAN LOOSDRECHT, M. C. Mixed culture biotechnology for bioenergy production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 207–212, 2007.

KOLLER, M. et al. Microbial PHA Production from Waste Raw Materials. v. 14, 2010.

KOLLER, M. A review on established and emerging fermentation schemes for microbial production of polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters. **Fermentation**, v. 4, n. 2, 2018.

KOLLER, M.; NIEBELSCHÜTZ, H. Strategies for recovery and purification of poly [(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass. v. 1, p. 549–562, 2013.

KUMAR, G. et al. A review on the conversion of volatile fatty acids to polyhydroxyalkanoates using dark fermentative effluents from hydrogen production. **Bioresource Technology**, v. 287, n. March, p. 121427, 2019.

LAGARIAS, J. C. et al. Convergence Properties of the Nelder--Mead Simplex Method in Low Dimensions. **SIAM Journal on Optimization**, v. 9, n. 1, p. 112–147, jan. 1998.

LAINE, M. **Adaptive MCMC Methods With Applications in Environmental and Geophysical Models**. [s.l: s.n.].

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

LEE, S. H. et al. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by activated sludge enriched under periodic feeding with nonanoic acid. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6159–6166, maio 2011.

LEEuwEN, M. A. V. A. et al. MA Van Aalst Van Leeuwen 1997 Kinetic modeling of

poly(β -hydroxybutyrate) production and consumption by *Paracoccus pantotrophus* under dynamic substrate supply.pdf. 1997.

LEMOS, P. C.; SERAFIM, L. S.; REIS, M. A. M. Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. **Journal of Biotechnology**, v. 122, n. 2, p. 226–238, 2006.

LEONG, Y. K. et al. Economic and environmental analysis of PHAs production process. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 19, n. 7, p. 1941–1953, 2017.

MALVE, O. et al. Bayesian modelling of algal mass occurrences-using adaptive MCMC methods with a lake water quality model. **Environmental Modelling and Software**, v. 22, n. 7, p. 966–977, 2007.

MANNINA, G. et al. Recovery of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from wastewater: A review. **Bioresource Technology**, v. 297, n. November 2019, p. 122478, 2020.

MARANG, L. et al. Butyrate as preferred substrate for polyhydroxybutyrate production. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 232–239, 2013.

MARANG, L.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; KLEEREBEZEM, R. Modeling the competition between PHA-producing and non-PHA-producing bacteria in feast-famine SBR and staged CSTR systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 12, p. 2475–2484, 2015.

MATHWORKS. **fminsearch** Algorithm. Disponível em: <<https://www.mathworks.com/help/optim/ug/fminsearch-algorithm.html>>. Acesso em: 11 dez. 2021.

MATOS, M. et al. Sludge retention time impacts on polyhydroxyalkanoate productivity in uncoupled storage/growth processes. **Science of the Total Environment**, v. 799, p. 149363, 2021a.

MATOS, M. et al. Combined Strategies to Boost Polyhydroxyalkanoate Production from Fruit Waste in a Three-Stage Pilot Plant. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 9, n. 24, p. 8270–8279, 2021b.

MEHRVAR, M. et al. Non-linear parameter estimation for a dynamic model in photocatalytic reaction engineering. **Chemical Engineering Science**, v. 55, n. 21, p. 4885–4891, 2000.

MESA, M. I. et al. Uncertainty Quantification in Chromatography Process Identification Based on Markov Chain Monte Carlo. In: **Mathematical Modeling and Computational Intelligence in Engineering Applications**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 77–88.

MORETTO, G. et al. An urban biorefinery for food waste and biological sludge conversion into polyhydroxyalkanoates and biogas. **Water Research**, v. 170, p. 115371, 2020.

MURNLEITNER, E. et al. An integrated metabolic model for the aerobic and denitrifying biological phosphorus removal. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 54, n. 5, p. 434–450, 1997.

NOVAK, M. et al. Mathematical modelling as a tool for optimized PHA production. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 29, n. 2, p. 183–220, 2015.

OLIVEIRA, C. S. S. et al. Strategies for efficiently selecting PHA producing mixed microbial cultures using complex feedstocks: Feast and famine regime and uncoupled carbon and nitrogen availabilities. **New Biotechnology**, v. 37, p. 69–79, 2017.

OLIVEIRA, C. S. S. et al. Assessment of protein-rich cheese whey waste stream as a nutrients source for low-cost mixed microbial PHA production. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 8, n. 10, 2018.

PARDELHA, F. et al. Dynamic metabolic modelling of volatile fatty acids conversion to polyhydroxyalkanoates by a mixed microbial culture. **New Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 335–344, 2014.

PIANOSI, F. et al. Sensitivity analysis of environmental models: A systematic review with practical workflow. **Environmental Modelling and Software**, v. 79, p. 214–232, 2016.

QIAN, S. S.; STOW, C. A.; BORSUK, M. E. On Monte Carlo methods for Bayesian inference. **Ecological Modelling**, v. 159, n. 2–3, p. 269–277, 2003.

RAZA, Z. A.; ABID, S.; BANAT, I. M. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 126, n. September 2017, p. 45–56, 2018.

REDDY, C. S. K. et al. Polyhydroxyalkanoates: An overview. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 137–146, 2003.

REIS, M. A. M. et al. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 25, n. 6, p. 377–385, 2003.

SAHLIN, K. **Estimating convergence of Markov chain Monte Carlo simulations**. [s.l.] Stockholm University, Sweden, 2011.

SERAFIM, L. S. et al. Optimization of polyhydroxybutyrate production by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 87, n. 2, p. 145–160, 2004.

SILVA, F. et al. Impact of nitrogen feeding regulation on polyhydroxyalkanoates production by mixed microbial cultures. **New Biotechnology**, v. 37, p. 90–98, 2017.

SMOLDERS, G. J. F.; MEIJ, J. VAN DER; LOOSDRECHT, M. C. M. VAN. Stoichiometric Model of the Aerobic Metabolism of the Biological Phosphorus Removal Process. v. 44, p. 837–848, 1994.

SNELL, K. D.; PEOPLES, O. P. PHA bioplastic: A value-added coproduct for biomass biorefineries. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 3, n. 4, p. 456–467, jul. 2009.

SOLAIMAN, D. K. Y. et al. Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 6, p. 783–789, 2006.

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

SOLOMONEN, A.; HAARIO, H. Model-based process optimization in the presence of parameter uncertainty. **Engineering Optimization**, v. 44, n. 7, p. 875–894, 2012.

TAMIS, J. et al. Modeling PHA-producing microbial enrichment cultures-towards a generalized model with predictive power. **New Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 324–334, 2014a.

TAMIS, J. et al. Enrichment of *Plasticumulans acidivorans* at pilot-scale for PHA production on industrial wastewater. **Journal of Biotechnology**, v. 192, n. Part A, p. 161–169, 2014b.

TAMIS, J. et al. Pilot-Scale Polyhydroxyalkanoate Production from Paper Mill Wastewater: Process Characteristics and Identification of Bottlenecks for Full-Scale Implementation. **Journal of Environmental Engineering**, v. 144, n. 10, p. 04018107, 2018.

TAN, G. Y. A. et al. Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review. **Polymers**, v. 6, n. 3, p. 706–754, 2014.

TANG, J.; ZHUANG, Q. A global sensitivity analysis and Bayesian inference framework for improving the parameter estimation and prediction of a process-based Terrestrial Ecosystem Model. **Journal of Geophysical Research Atmospheres**, v. 114, n. 15, p. 1–19, 2009.

TAYLOR, K. A. C. C. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 49–58, 1996.

TERADA, M.; MARCHESSAULT, R. H. Determination of solubility parameters for poly(3-hydroxyalkanoates). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, n. 1–3, p. 207–215, jun. 1999.

TU, W.; ZHANG, D.; WANG, H. Polyhydroxyalkanoates (PHA) production from fermented thermal-hydrolyzed sludge by mixed microbial cultures: The link between

phosphorus and PHA yields. **Waste Management**, v. 96, p. 149–157, 2019.

WANG, K. et al. Techno-Economic Analysis on an Industrial-Scale Production System of Polyhydroxyalkanoates (PHA) from Cheese By-Products by Halophiles. **Processes**, v. 10, n. 1, p. 17, 23 dez. 2021.

WANG, X. et al. Metabolic modeling of the substrate competition among multiple VFAs for PHA production by mixed microbial cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 280, n. October 2017, p. 62–69, 2018.

WANG, Y.-G. et al. Robust Estimation Using the Huber Function With a Data-Dependent Tuning Constant. **Journal of Computational and Graphical Statistics**, v. 16, n. 2, p. 468–481, jun. 2007.

WELLES, L. et al. Impact of salinity on the anaerobic metabolism of phosphate-accumulating organisms (PAO) and glycogen-accumulating organisms (GAO). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 17, p. 7609–7622, 2014.

WERKER, A. et al. Modelling Mixed Microbial Culture Polyhydroxyalkanoate Accumulation Bioprocess towards Novel Methods for Polymer Production Using Dilute Volatile Fatty Acid Rich Feedstocks. **Bioengineering**, v. 9, n. 3, 2022.

WIJEYEKOON, S. et al. Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis from nutrient rich wet oxidation liquors. **Water Research**, v. 140, p. 1–11, 2018.

WILKIE, A. C.; RIEDESEL, K. J.; OWENS, J. M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, n. 2, p. 63–102, 2000.

ZHANG, J. L. et al. Uncertainty analysis for effluent trading planning using a Bayesian estimation-based simulation-optimization modeling approach. **Water Research**, v. 116, p. 159–181, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A – CÓDIGOS MATEMÁTICOS DO MODELO SBR DE SELEÇÃO

A.1 Modelo SBR de seleção

A.1.1 Modelo cinético para o SBR de seleção.

```
function dy=Batelada_mestrado_ode_try(~,y,p0)

global q_HOrg_max K_HOrg k_PHA q_DQOr_max K_DQOr...
      Y_PHA_HOrg Y_X_PHA Y_X_DQOr X0

% PARÂMETROS CINÉTICOS-----

K_HOrg = 0.05;
K_DQOr = 0.05;

%   PARÂMETROS ESTEQUIOMÉTRICOS-----

Y_X_PHA = 0.78;
Y_X_DQOr = 0.392;

%Modelo cinético-----

q_HOrg = p0(1)*y(1)/(K_HOrg+y(1));

q_PHA = p0(2)*q_HOrg -
        p0(4)*(X0/y(4))^(1/3)*(y(2)/y(4))^(2/3);

q_DQOr = p0(3)*y(3)/(K_DQOr+y(3));

u_X = Y_X_PHA*p0(4)*(X0/y(4))^(1/3)*(y(2)/y(4))^(2/3) +
      Y_X_DQOr*q_DQOr;

%VARIÁVEIS-----

%1: HOrg - Ácidos Orgânicos
%2: PHA - Polihidróxialcanoatos
%3: DQOr - DQO residual
%4: X - Biomassa ativa

%BALANÇOS-----

dy=zeros(4,1);
dy(1) = -y(4)*(q_HOrg); % HOrg
dy(2) = y(4)*(q_PHA); % PHA
dy(3) = -y(4)*(q_DQOr); % DQOr
dy(4) = y(4)*(u_X); % X

end
```

A.1.2 Análise de sensibilidade relativa global dos parâmetros livres do modelo SBR de seleção.

```

global X0
data.ydata = [
% Time (h)      [HOrg]   [PHA]   [DQOr]   [Xr]
      0          0.7520  0.1735  0.5830  1.4860
      0.08       0.4590  0.2730  0.7440  1.4820
      0.17       0.2690  0.3573  0.7980  1.4850
      0.25       0.2250  0.4361  0.7420  1.5270
      0.42       0.1220  0.4820  0.6950  1.5430
      0.67       0.0120  0.4631  0.7300  1.6170
      1.42       0.0000  0.4982  0.6120  1.6180
      2.9        0.0000  0.3579  0.5405  1.6900
      2.93       0.0000  0.3343  0.5240  1.6560
      4.42       0.0000  0.2623  0.5225  1.8610
      5.42       0.0000  0.1356  0.5215  1.9750
      6.42       0.0000  0.1112  0.5165  1.9890
      7.75       0.0000  0.0856  0.4785  1.9310
];
%INITIAL CONDITIONS-----
-----
% Initial amounts of HOrg, PHA, DQOr, Xr [gDQO/L]:
HOrg = 0.7520;
PHA = 0.1735;
DQOr = 0.7440;
Xr = 1.4860;
data.Y0=[HOrg;PHA;DQOr;Xr];
Y0=data.Y0;

p(1)= 1.8834;
p(2)= 0.1245;
p(3)= 0.0247;
p(4)= 0.4947;
p(5)= 1.7272;
p(6)= -0.9109;
p(7)= 0.0775;
p(8)= -0.0014;

X0=data.Y0(4);% degradação de PHA - Tamis

tspan = (0:7.75/3000:7.75);
options = odeset('AbsTol',1e-3, 'NonNegative',1:4);
[t,z1]=ode15s(@(t,y)
Batelada_mestrado_ode_try(t,y,p),tspan,data.Y0,options);

xi=1e-5;
S=[];
I2=[];

```

```

colorespec= {[1 1 0];[0 1 0];[0 0 0];[1 0 0];[0 1 1];[1 1 0];[0
1 0];[0 0 0]};
linespec={'-','-','-',':',':','--',':',':'};
for i=1:8
    pad_p=p;
    pad_p(i)=p(i)*(1+xi);
    [t,z2]=ode15s(@(t,y)
Batelada_mestrado_ode_try(t,y,pad_p),tspan,data.Y0,options);

    mz=mean(z1,1);

B = repmat(mz,3001,1);
    sens=(z2-z1)/(xi*p(i))*p(i)./B;

    figure(1);
    hold on;
    plot(t,sens(:,1), 'Color', colorespec{i},'LineStyle',
linespec{i});
    xlabel('Time [h]');
    ylabel('H.Org');

    figure(2);
    hold on;
    plot(t,sens(:,2), 'Color', colorespec{i},'LineStyle',
linespec{i});
    xlabel('Time [h]');
    ylabel('PHA');

    figure(3);
    hold on;
    plot(t,sens(:,3), 'Color', colorespec{i},'LineStyle',
linespec{i});
    xlabel('Time [h]');
    ylabel('DQOr');

    figure(4);
    hold on;
    plot(t,sens(:,4), 'Color', colorespec{i},'LineStyle',
linespec{i});
    xlabel('Time [h]');
    ylabel('Xa');

    S=[S;sens];
    I1=trapz(sens(:,:));
    I2=[I2;trapz(tspan,(sens(:,:)))];
    I3=abs(I2');
end

for i=1:4
    figure(i)

```

```
legend('q_{HOrg_{max}}','k_{PHA}','q_{DQOr_{max}}','Y_{PHA/HOr  
g}','Y_{X/PHA}','Y_{X/DQOr}','K_{HOrg}','K_{DQOr}')  
end
```

A.1.3 Método de minimização de Box-Draper para o reator SBR de seleção.

```

function ss = Batelada_mestrado_ss(p,data,~)

    global X0

    time = data.ydata(:,1);
    HOrg_obs = data.ydata(:,2);
    PHA_obs = data.ydata(:,3);
    DQOr_obs = data.ydata(:,4);
    Xr_obs = data.ydata(:,5);

    %%
    % PROCESS PARAMETERS-----
    -----
    RT = 24; % tempo de retenção de sólidos [h]
    CL = 8; % tempo de ciclo [h]

    %INITIAL CONDITIONS-----
    -----
    % Initial amounts of HOrg, PHA, DQOr, Xr [gDQO/L]:
    HOrg = 0.7520;
    PHA = 0.1735;
    DQOr = 0.7440;
    Xr = 1.4860;
    data.Y0=[HOrg;PHA;DQOr;Xr];

    X0=data.Y0(4);% degradação de PHA - Tamis

    tspan = data.ydata(:,1);
    options = odeset('AbsTol',1e-6', 'NonNegative',1:4);
    [t,Y1]=ode15s(@Batelada_mestrado_ode_try,tspan,data.Y0,options
    ,p);

    Tot_HOrg=Y1(:,1);
    Tot_PHA=Y1(:,2);
    Tot_DQOr=Y1(:,3);
    Tot_X=Y1(:,4);
    Tot_time=t;

    A=sum((HOrg_obs - Tot_HOrg).^2);
    a=sum((HOrg_obs - Tot_HOrg).*(PHA_obs - Tot_PHA));
    b=sum((HOrg_obs - Tot_HOrg).*(DQOr_obs - Tot_DQOr));
    c=sum((HOrg_obs - Tot_HOrg).*(Xr_obs - Tot_X));

    B=sum((PHA_obs - Tot_PHA).^2);
    f=sum((PHA_obs - Tot_PHA).*(DQOr_obs - Tot_DQOr));
    g=sum((PHA_obs - Tot_PHA).*(Xr_obs - Tot_X));

    C=sum((DQOr_obs - Tot_DQOr).^2);

```

```
j=sum((DQOr_obs - Tot_DQOr).*(Xr_obs - Tot_X));  
D=sum((Xr_obs - Tot_X).^2);  
Z=[A a b c ; a B f g ; b f C j ; c g j D];  
ss=det(Z)
```

A.1.4 Método de simulação de Monte Carlo e Cadeia de Markov para o reator SBR de seleção.

```

clear model data parama options

data.ydata = [
% Time (h)      [HOrg]   [PHA]   [DQOr]   [Xr]
      0         0.7520  0.1735  0.5830  1.4860
      0.08      0.4590  0.2730  0.7440  1.4820
      0.17      0.2690  0.3573  0.7980  1.4850
      0.25      0.2250  0.4361  0.7420  1.5270
      0.42      0.1220  0.4820  0.6950  1.5430
      0.67      0.0120  0.4631  0.7300  1.6170
      1.42      0         0.4982  0.6120  1.6180
      2.9       0         0.3579  0.5405  1.6900
      2.93      0         0.3343  0.5240  1.6560
      4.42      0         0.2623  0.5225  1.8610
      5.42      0         0.1356  0.5215  1.9750
      6.42      0         0.1112  0.5165  1.9890
      7.75      0         0.0856  0.4785  1.9310
];

% PROCESS PARAMETERS-----
-----
RT = 24; % tempo de retenção de sólidos [h]
CL = 8; % tempo de ciclo [h]

%INITIAL CONDITIONS-----
-----
% Initial amounts of HOrg, PHA, DQOr, Xr [gDQO/L]:
HOrg = 0.7520;
PHA = 0.1735;
DQOr = 0.7440;
Xr = 1.4860;
data.Y0=[HOrg;PHA;DQOr;Xr];
p00 = [1.7567 0.5183 0.0283 0.1293];
[p0,ss0] = fminsearch(@Batelada_mestrado_ss,p00,[],data);

%%
mse = ss0/((length(data.ydata))-4);

%%
params = {
    'q^{max}_{HOrg}', p0(1),0}
    'Y_{PHA/HOrg}', p0(2),0}
    'q^{max}_{DQOr}', p0(3),0}
    'k_{PHA}', p0(4),0}
};

%%
nsimu = 10000; %número de simulações

```

```

npar = 4; %número de parâmetros livres
model.ssfun = @Batelada_mestrado_ss2;
model.sigma2 = mse;
model.N=10;

%%

[Sig,Lam] = covcond(100,ones(npar,1));

%%

data.Lam = Lam;

%%
options.nsimu = nsimu;
options.updatesigma = 1;
options.method = 'dram';

%%

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

%%
figure(1), clf
mcmplot(chain, [], results, 'chainpanel')

chainstats(chain,results)

options = odeset('RelTol', 1e-10, 'AbsTol', 1e-10);
[t,Y1] = ode15s(@(t,y,p) Batelada_mestrado_ode_try (t,y,p), [0
7.75],data.Y0,options,mean(chain));
%%
figure(2); clf
mcmplot(sqrt(s2chain), [], [], 'hist')
title('Error std posterior')

%%
figure(3); clf
mcmplot(chain, [], results, 'pairs');

%%
figure(4); clf
plot(data.ydata(:,1),data.ydata(:,2),'sb',t,Y1(:,1),'-b')
hold on
plot(data.ydata(:,1),data.ydata(:,3),'sg',t,Y1(:,2),'-g')
hold on
plot(data.ydata(:,1),data.ydata(:,4),'sr',t,Y1(:,3),'-r')
hold on
plot(data.ydata(:,1),data.ydata(:,5),'sk',t,Y1(:,4),'-k')
hold on
xlabel('t [h]', 'Color', 'b')

```

```
ylabel('Concentração [gDQO/L]', 'Color', 'b')
```

APÊNDICE B – CÓDIGOS MATEMÁTICOS DO MODELO DE ACUMULAÇÃO

B.1 Modelo de acumulação

B.1.1 Modelo cinético adaptado do modelo SBR de enriquecimento para a etapa de acumulação.

```
function dy=Ac_ode(~, y, p)

global K_HOrg K_DQOr

% BIOMASS SPECIFIC PARAMETERS: KINETICS-----
-----
K_HOrg = 0.05; % cte. de meia saturação de HOrg [gDQO_HOrg/L]
K_DQOr = 0.05; % cte. de meia saturação de DQOr [gDQOr/L]

%Model kinetics-----
-----
% Considerando a fase de feast
q_HOrg = p(1)*y(1)/(K_HOrg+y(1)); %velocidade específica de
consumo de HOrg [gDQO_HOrg/gX.h]
q_PHA = p(2)*q_HOrg; %-
k_PHA*(X0/y(4))^(1/3)*(y(2)/y(4))^(2/3); % acumulação de PHA,
considerando feast e famine e degradação segundo TAMIS
[gDQO_PHA/gX.h]
q_DQOr = p(3)*y(3)/(K_DQOr+y(3)); %velocidade específica de
consumo de DQOr [gDQOr/gX.h]
u_X = p(4)*q_DQOr; crescimento de biomassa

%Variables-----
-----
%1: HOrg - Ácidos Orgânicos
%2: PHA - Polihidroxialcanoatos
%3: DQOr - DQO residual
%4: Xa - Biomassa
%Balances-----
-----
dy=zeros(4,1);
dy(1) = -y(4)*(q_HOrg); % HOrg
dy(2) = y(4)*(q_PHA); % PHA
dy(3) = -y(4)*(q_DQOr); % DQOr
dy(4) = y(4)*(u_X); % Xa

end
```

B.1.2 Método de minimização de Box-Draper para estimativa dos parâmetros livres do modelo de acumulação.

```
function ss = Batelada_mestrado_ss_ac(p,data,~)

time = data.ydata(:,1);
HOrg_obs = data.ydata(:,2);
PHA_obs = data.ydata(:,3);
DQOr_obs = data.ydata(:,4);
Xr_obs = data.ydata(:,5);

% PROCESS PARAMETERS-----
-----
HOrg_feed = 0.9862; % []HOrg no pulso (dentro do reator)
[gDQO/L]
DQOr_feed = 0.46455; % []DQOr no pulso [gDQO/L]

%declarar o tempo que os pulsos foram dosados ao reator
%tempo dos pulsos
t1 = 1.07;%segundo pulso
t2 = 2.25;%terceiro pulso
t3 = 4.02;%quarto pulso
t4 = 5.47;%quinto pulso
t5 = 6.78;%sexto pulso
t6 = 8.10;%tempo final

%INITIAL CONDITIONS-----
-----
% []inicial de HOrg, PHA, DQOr, Xr [gDQO/L] após o primeiro
pulso no instante t=0:
%%primeiro pulso
HOrg = 0 + HOrg_feed;
PHA = 0.268;
DQOr = 0.621 + DQOr_feed;
Xr = 1.441; %GHDO
Y0=[HOrg;PHA;DQOr;Xr];

tspan=linspace(0,t1,100);
options = odeset('AbsTol',1e-3, 'NonNegative',1:4);
[~,Y1]=ode15s(@Ac_ode,tspan,Y0,options,p);
A0=Y1(end,:);

%Segundo pulso
Y2=A0';
%atualizando a []de H.Org e []de DQOr
Y2(1,1)=Y2(1,1)+HOrg_feed;
Y2(3,1)=Y2(3,1)+DQOr_feed;
tspan=linspace(t1,t2,100);
options = odeset('AbsTol',1e-3, 'NonNegative',1:4);
[~,Y3]=ode15s(@Ac_ode,tspan,Y2,options,p);
A1=Y3(end,:);
```

```

%terceiro pulso
Y4=A1';
%atualizando a []de H.Org e []de DQOr
Y4(1,1)=Y4(1,1)+HOrg_feed;
Y4(3,1)=Y4(3,1)+DQOr_feed;
tspan=linspace(t2,t3,100);
options = odeset('AbsTol',1e-3, 'NonNegative',1:4);
[~,Y5]=ode15s(@Ac_ode,tspan,Y4,options,p);
A2=Y5(end,:);

%quarto pulso
Y6=A2';
%atualizando a []de H.Org e []de DQOr
Y6(1,1)=Y6(1,1)+HOrg_feed;
Y6(3,1)=Y6(3,1)+DQOr_feed;
tspan=linspace(t3,t4,100);
options = odeset('AbsTol',1e-3, 'NonNegative',1:4);
[~,Y7]=ode15s(@Ac_ode,tspan,Y6,options,p);
A3=Y7(end,:);

%quinto pulso
Y8=A3';
%atualizando a []de H.Org e []de DQOr
Y8(1,1)=Y8(1,1)+HOrg_feed;
Y8(3,1)=Y8(3,1)+DQOr_feed;
tspan=linspace(t4,t5,100);
options = odeset('AbsTol',1e-3, 'NonNegative',1:4);
[~,Y9]=ode15s(@Ac_ode,tspan,Y8,options,p);
A4=Y9(end,:);

%sexto pulso
Y10=A4';
%atualizando a []de H.Org e []de DQOr
Y10(1,1)=Y10(1,1)+HOrg_feed;
Y10(3,1)=Y10(3,1)+DQOr_feed;
tspan=linspace(t5,t6,100);
options = odeset('AbsTol',1e-3, 'NonNegative',1:4);
[~,Y11]=ode15s(@Ac_ode,tspan,Y10,options,p);
A5=Y11(end,:);
%Armazenando os resultados ao final de cada pulso
A=[Y0';A0;A1;A2;A3;A4;A5];

Tot_HOrg=A(:,1);
Tot_PHA=A(:,2);
Tot_DQOr=A(:,3);
Tot_X=A(:,4);
Tot_time=[0;1.07;2.25;4.02;5.47;6.78;8.10];

A=sum((HOrg_obs - Tot_HOrg).^2);
a=sum((HOrg_obs - Tot_HOrg).*(PHA_obs - Tot_PHA));

```

```
b=sum((HOrg_obs - Tot_HOrg).*(DQOr_obs - Tot_DQOr));  
c=sum((HOrg_obs - Tot_HOrg).*(Xr_obs - Tot_X));
```

```
B=sum((PHA_obs - Tot_PHA).^2);  
f=sum((PHA_obs - Tot_PHA).*(DQOr_obs - Tot_DQOr));  
g=sum((PHA_obs - Tot_PHA).*(Xr_obs - Tot_X));
```

```
C=sum((DQOr_obs - Tot_DQOr).^2);  
j=sum((DQOr_obs - Tot_DQOr).*(Xr_obs - Tot_X));
```

```
D=sum((Xr_obs - Tot_X).^2);
```

```
Z=[A a b c ; a B f g ; b f C j ; c g j D];
```

```
ss=det(Z)
```

B.1.3 Método simulação de Monte Carlo com cadeia de Markov (MCMC) para otimização dos parâmetros livres do modelo de acumulação.

```

clear model data parama options

data.ydata = [
% Time (h)      [HOrg]   [PHA]    [DQOr]   [Xr]
      0         0.9862  0.268   1.085   1.441
      1.07      0        1.097   0.997   1.672
      2.25      0        1.818   1.317   1.755
      4.02      0        2.720   1.480   1.805
      5.47      0        3.343   1.635   1.872
      6.78      0        3.961   1.862   1.934
      8.10      0        4.428   2.052   1.968
];

% PROCESS PARAMETERS-----
-----
HOrg_feed = 0.9862; % []HOrg no pulso (dentro do reator)
[gDQO/L]
DQOr_feed = 0.46455; % []DQOr no pulso [gDQO/L]
% []inicial de HOrg, PHA, DQOr, Xr [gDQO/L] após o primeiro
pulso no instante t=0:
HOrg = 0 + HOrg_feed;
PHA = 0.268;
DQOr = 0.621 + DQOr_feed;
Xr = 1.441; %GHDO
Y0=[HOrg;PHA;DQOr;Xr];
%%
p00 = [0.6037 0.6874 0.1054 0.3561];
[p0,ss0] = fminsearch(@Batelada_mestrado_ss_ac,p00,[],data);
%%
mse = ss0/((length(data.ydata))-4);

%%
params = {
    {'q^{max}_{HOrg}', p0(1),0}
    {'Y_{PHA/HOrg}', p0(2),0}
    {'q^{max}_{DQOr}', p0(3),0}
    {'Y_{Xa/PHA}', p0(4),0}
    {'p5', p0(5),0}
    {'p6', p0(6),0}
};

%%
nsimu = 10000; %número de simulações
npar = 4; %número de parâmetros livres
model.ssfun = @Batelada_mestrado_ss3_acE1;
model.sigma2 = mse;
model.N=10;

%%

```

```

[Sig,Lam] = covcond(100,ones(npar,1));

%%

data.Lam = Lam;

%%
options.nsimu = nsimu;
options.updatesigma = 1;
options.method = 'dram';

%%

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

%%
figure(1), clf
mcmplot(chain, [], results, 'chainpanel')

chainstats(chain,results)

options = odeset('RelTol', 1e-3, 'AbsTol', 1e-3);

HOrg_feed = 0.9862; % []HOrg no pulso (dentro do reator)
DQOr_feed = 0.46455; % []DQOr no pulso [gDQO/L]
%declarar o tempo que os pulsos foram dosados ao reator
%tempo dos pulsos
t1 = 1.07;%segundo pulso
t2 = 2.25;%terceiro pulso
t3 = 4.02;%quarto pulso
t4 = 5.47;%quinto pulso
t5 = 6.78;%sexto pulso
t6 = 8.10;%tempo final

%INITIAL CONDITIONS-----
-----
%%primeiro pulso
HOrg = 0 + HOrg_feed;
PHA = 0.268;
DQOr = 0.621 + DQOr_feed;
Xr = 1.441; %GHDO
Y0=[HOrg;PHA;DQOr;Xr];

tspan=linspace(0,t1,100);
options = odeset('AbsTol',1e-3, 'NonNegative',1:4);
[~,Y1]=ode15s(@Ac_ode,tspan,Y0,options,p0);
A0=Y1(end,:);

%Segundo pulso
Y2=A0';

```

```

%atualizando a []de H.Org e []de DQOr
Y2(1,1)=Y2(1,1)+HOrg_feed;
Y2(3,1)=Y2(3,1)+DQOr_feed;
tspan=linspace(t1,t2,100);
options = odeset('AbsTol',1e-3, 'NonNegative',1:4);
[~,Y3]=ode15s(@Ac_ode,tspan,Y2,options,p0);
A1=Y3(end,:);

%terceiro pulso
Y4=A1';
%atualizando a []de H.Org e []de DQOr
Y4(1,1)=Y4(1,1)+HOrg_feed;
Y4(3,1)=Y4(3,1)+DQOr_feed;
tspan=linspace(t2,t3,100);
options = odeset('AbsTol',1e-3, 'NonNegative',1:4);
[~,Y5]=ode15s(@Ac_ode,tspan,Y4,options,p0);
A2=Y5(end,:);

%quarto pulso
Y6=A2';
%atualizando a []de H.Org e []de DQOr
Y6(1,1)=Y6(1,1)+HOrg_feed;
Y6(3,1)=Y6(3,1)+DQOr_feed;
tspan=linspace(t3,t4,100);
options = odeset('AbsTol',1e-3, 'NonNegative',1:4);
[~,Y7]=ode15s(@Ac_ode,tspan,Y6,options,p0);
A3=Y7(end,:);

%quinto pulso
Y8=A3';
%atualizando a []de H.Org e []de DQOr
Y8(1,1)=Y8(1,1)+HOrg_feed;
Y8(3,1)=Y8(3,1)+DQOr_feed;
tspan=linspace(t4,t5,100);
options = odeset('AbsTol',1e-3, 'NonNegative',1:4);
[~,Y9]=ode15s(@Ac_ode,tspan,Y8,options,p0);
A4=Y9(end,:);

%sexto pulso
Y10=A4';
%atualizando a []de H.Org e []de DQOr
Y10(1,1)=Y10(1,1)+HOrg_feed;
Y10(3,1)=Y10(3,1)+DQOr_feed;
tspan=linspace(t5,t6,100);
options = odeset('AbsTol',1e-3, 'NonNegative',1:4);
[~,Y11]=ode15s(@Ac_ode,tspan,Y10,options,p0);
A5=Y11(end,:);

%Armazenando os resultados ao final de cada pulso
A=[Y0';A0;A1;A2;A3;A4;A5];

```

```

Tot_HOrg=A(:,1);
Tot_PHA=A(:,2);
Tot_DQOr=A(:,3);
Tot_X=A(:,4);
Tot_time=[0;1.07;2.25;4.02;5.47;6.78;8.10];

%% plots
figure(2); clf
mcmplot(sqrt(s2chain),[],[],'hist')
title('Error std posterior')
%%
figure(3); clf
mcmplot(chain,[],results,'pairs');
%%
figure(4); clf
plot(data.ydata(:,1),data.ydata(:,2),'sb',Tot_time,Tot_HOrg,'-b')
hold on
plot(data.ydata(:,1),data.ydata(:,3),'sg',Tot_time,Tot_PHA,'-g')
hold on
plot(data.ydata(:,1),data.ydata(:,4),'sr',Tot_time,Tot_DQOr,'-r')
hold on
plot(data.ydata(:,1),data.ydata(:,5),'sk',Tot_time,Tot_X,'-k')
hold on
xlabel('Tempo [h]', 'Color', 'b')
ylabel('Concentração (gDQO/L)', 'Color', 'b')

```