

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**MODELAGEM E SIMULAÇÃO DE BIORREATOR PARA PRODUÇÃO DE  
ÁCIDO FUMÁRICO**

**Marisa Cristina Mendonça Fujimoto**

Trabalho de Graduação apresentado ao  
Departamento de Engenharia Química da  
Universidade Federal de São Carlos.

Orientadora: **Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Alice Medeiros de Lima.**

São Carlos – SP  
2018

## **BANCA EXAMINADORA**

Trabalho de Graduação apresentado no dia 03 de dezembro de 2018 perante a seguinte banca examinadora:

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alice Medeiros de Lima, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCar).

Convidado: Prof. Dr. Felipe Fernando Furlan, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCar).

Professor da Disciplina: Prof. Dr. Claudio Alberto Torres Suazo, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCar).

## AGRADECIMENTOS

À minha irmã, Victória – se você não tivesse jogado um caderno em mim enquanto tomava lição sobre a tabela periódica, talvez eu nunca fizesse a associação entre dor e conhecimento necessária para terminar esse curso.

Aos meus pais, tia Teté e vó Myrthes, que depois de cinco anos me escutando falar das matérias e apresentar seminários pelo telefone, já podem também se formar em Engenharia Química. Muito obrigada por terem traçado esse caminho comigo. Tentei fazer do jeitinho que vocês me ensinaram.

À dona Rosa, que manteve a casa sempre cheia de carinho e comidinhas maravilhosas.

À minha orientadora Alice, que nunca perdeu a calma e a paciência, mesmo quando eu já estava desesperada fazia tempo.

Aos meus amigos de Manaus e de São Carlos, que nunca abandonaram o barco. Sem a companhia de vocês, esses cinco anos não teriam significado nada.

## RESUMO

Tendo em vista as necessidades atuais de se adequar às demandas por uma indústria cada vez mais sustentável, diversas empresas têm investido em pesquisa e desenvolvimento de processos com menores impactos ambientais. No foco da inovação estão rotas com menores gastos energéticos, consumo de solventes e geração de resíduos, além de uso de matérias-primas de origem renovável. Neste contexto, pretende-se realizar o estudo sobre a produção de ácido fumárico, um intermediário químico atualmente produzido a partir de matéria-prima fóssil. Realizou-se um levantamento bibliográfico sobre os tipos de micro-organismos capazes de produzi-lo, e um modelo cinético para crescimento e acúmulo de produto foi escolhido. Este foi ajustado a partir de dados experimentais reportados em artigos, com auxílio do software *SimulaFerm*. Em seguida, o modelo do biorreator foi desenvolvido no ambiente *Scilab*© utilizando as informações cinéticas (equações constitutivas) e os balanços de massa no regime transiente. Este software foi escolhido em virtude da interface existente com o simulador de processos *COCO (CAPE-OPEN to CAPE-OPEN)*, o qual não compreende em suas operações básicas as reações em regime de batelada que são comumente aplicadas a fermentações. Com os resultados, foi possível ter uma melhor compreensão sobre as limitações e oportunidades relacionadas à produção de ácido fumárico através desta rota alternativa.

## ABSTRACT

Considering the current scenario where there is a growing pressure for industry to include sustainability in its inegotiable values, several companies have been investing in research and development of new, environmentally friendly, processes. In the focus of innovation there are routes with smaller energy and solvent consumption, and reduced generation of waste. In this context, the present study aims at evaluating the production of fumaric acid via fermentation; the compound is an intermediate currently obtained from petrochemical raw materials. The study was based on extensive bibliographic research about the types of micro-organisms capable of producing the chemical, and an appropriate kinetic model to describe growth and accumulation of product was chosen. As an adequate kinetic model was not readily available in literature, a simple model was adjusted in the software *SimulaFerm* using experimental information reported in articles. Then, the bioreactor model was implemented in *Scilab* environment, making use of constitutive equations (kinetic models), and mass balances pertinent to transient operation. This *software* was chosen due to its interface with the process simulator *COCO (CAPE-OPEN to CAPE-OPEN)*, which does not comprise in its basic unit operations batch reactions commonly present in fermentations. With the results obtained, it was possible to better understand the limitations and opportunities regarding the production of fumaric acid through this alternative route.

## SUMÁRIO

Banca examinadora.....	i
Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas e Quadros.....	vii
Nomenclatura.....	viii
1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 - Ácido fumárico – usos, aplicações e mercado.....	2
2.2 - Rota de produção atual.....	6
2.3 - Rota de produção fermentativa.....	7
2.3.1 - Micro-organismos e substratos.....	7
2.3.2 - Condições de reação e parâmetros de influência.....	10
2.4 - <i>Downstream</i> .....	11
3 – METODOLOGIA.....	15
3.1 - Dados cinéticos.....	15
3.1.1 - Modelagem e ajuste de parâmetros.....	15
3.1.2 - Utilizando o <i>SimulaFerm</i> .....	17
3.2 - Simulação do processo fermentativo.....	20
3.2.1 - Estudo do processo fermentativo em <i>Scilab</i> .....	21
3.2.2 - Integração da rotina em <i>Scilab</i> ao <i>COCO</i> .....	23
3.3 - Avaliação econômica.....	24
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1 - Dados cinéticos.....	26
4.1.1 - Modelagem e ajuste de parâmetros.....	26
4.1.2 - Formação de sub-produtos.....	33
4.2.1 - Simulação do processo fermentativo.....	35
4.2.2 - Programação dos reatores.....	39
4.2.3 - Integração da rotina em <i>Scilab</i> ao <i>COCO</i> .....	41
5 – CONCLUSÕES E RESULTADOS.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
APÊNDICE A.....	53

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Fumária, planta de onde o AF foi isolado pela primeira vez.	3
Figura 2.2	Ácido fumárico.	4
Figura 2.3	Exportações de ácido fumárico e preço FOB.	5
Figura 2.4	Importações de ácido fumárico e preço FOB.	5
Figura 2.5	Transformação de anidrido maleico até ácido fumárico.	6
Figura 2.6	Ciclo de citrato levando à formação de ácido fumárico.	8
Figura 2.7	Fumarato de cálcio.	11
Figura 2.8	<i>Downstream</i> ácido fumárico – carbonato de sódio como neutralizante.	12
Figura 2.9	<i>Downstream</i> ácido fumárico – carbonato de cálcio como neutralizante.	13
Figura 3.1	Escolha do tipo de experimento e análise.	18
Figura 3.2	Escolha do modelo de crescimento e cinética de produção.	18
Figura 3.3	Página inicial do <i>software SimulaFerm</i> .	19
Figura 4.1	Produção de ácido fumárico, consumo de glicose e formação de biomassa.	27
Figura 4.2	Modelo de Contois- concentrações de substrato, células e produto ao longo do tempo.	29
Figura 4.3	Modelo de Lee- concentrações de substrato, células e produto ao longo do tempo.	30
Figura 4.4	Resultados obtidos no experimento de Zhang (2012).	34
Figura 4.5	Concentrações de substrato, células e ácido fumárico - modelo de Contois.	36
Figura 4.6	Concentrações de sub-produtos - modelo de Contois.	37
Figura 4.7	Previsão das concentrações de substrato, células e ácido fumárico – modelo de Lee.	38
Figura 4.8	Concentração de sub-produtos - modelo de Lee.	38
Figura 4.9	Programação dos reatores e procedimentos auxiliares.	40
Figura 4.10	Fluxograma implementado no <i>COCO</i> .	44

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

### LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1	Varição nas concentrações de glicose, substrato e produto ao longo do tempo.	28
Tabela 4.2	Coefficientes de rendimento globais de sub-produtos – originais e corrigidos.	35
Tabela 4.3	Condições iniciais fornecidas para resolução do sistema de EDOs.	36
Tabela 4.4	Vazões e frações mássicas (FM) de alimentação da bomba P-001 (corrente 1).	44
Tabela 4.5	Custos unitários de matéria-prima e sub-produtos, quantidade consumida ou produzida dos mesmos, despesas e lucros obtidos.	46
Tabela 4.6	Índices CEPCI utilizados nos cálculos.	48
Tabela 4.7	Custos corrigidos pela inflação ( $C_2$ ), número de unidades requeridas e custo total de investimento.	48

### LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1	Resultados experimentais obtidos para produtividade, concentração final de produto e rendimento.	9
Quadro 3.1	Alguns modelos cinéticos de crescimentos disponíveis no <i>SimulaFerm</i> e no <i>OptimusFerm</i> .	16
Quadro 4.1	Condições de fermentação adotadas por Rhodes (1962).	26
Quadro 4.2	Parâmetros cinéticos ajustados – modelos de Contois, Lee, e acúmulo de produto parcialmente associado ao crescimento.	32
Quadro 4.3	Condições experimentais impostas para produção de ácido fumárico com <i>R. oryzae</i> .	33
Quadro 4.4	Concentrações finais obtidas pela rotina em Scilab ( $C_f$ ) e erros relativos em comparação com valores experimentais ( $C_{exp}$ ).	39
Quadro 4.5	Propriedades fornecidas para biomassa e glicose.	42
Quadro 4.6	Propriedades fornecidas para os ácidos fumárico, láctico e málico.	42
Quadro 4.7	Informações adicionais fornecidas sobre glicose.	43
Quadro 4.8	Balanços de massa.	45
Quadro 4.9	Dimensões características $S$ , fatores de escala $n$ , custos de referência $C_1$ e custos calculados $C_2'$ para os equipamentos nos respectivos anos base.	48



## NOMENCLATURA

$C_1$	Custo de referência do equipamento	US\$
$C_2'$	Custo do equipamento estudado	US\$
$C_2$	Custo do equipamento estudado após correção com CEPCI	US\$
$C_{i,tf}$	Concentração do componente $i$ ao término da batelada	$g.L^{-1}$
$C_p$	Concentração de produto	$g.L^{-1}$
$C_p^*$	Concentração crítica de produtos	$g.L^{-1}$
$C_p^*$	Concentração crítica de produtos	$g.L^{-1}$
$C_s$	Concentração de substrato	$g.L^{-1}$
$C_{spi}$	Concentração de sub-produto $i$	$g.L^{-1}$
$C_x$	Concentração de células	$g.L^{-1}$
$C_x^*$	Concentração crítica de células	$g.L^{-1}$
$C_s$	Concentração de substrato	$g.L^{-1}$
$K_{sx}$	Constante de saturação de Contois	$g_{substrato}/g_{células}$
$K_s$	Constante de saturação de Monod	$g.L^{-1}$
$m_i$	Vazão mássica do componente $i$	$kg.h^{-1}$
$r_x$	Taxa de crescimento celular	$g.L^{-1}.h^{-1}$
$r_p$	Taxa de acúmulo de produto	$g.L^{-1}.h^{-1}$
$r_s$	Taxa de consumo de substrato	$g.L^{-1}.h^{-1}$
$S_1$	Dimensão característica de referência	$m^2$ ou $m^3$ ou $W$
$S_2$	Dimensão característica do equipamento estudado	$m^2$ ou $m^3$ ou $W$
$t_d$	Tempo de descarga do fermentador	$h$
$V$	Volume do fermentador	$L$
$Y_{p/s}$	Coefficiente de rendimento global de substrato a produto	$g_{produto}/g_{substrato}$
$Y_{p/s}'$	Coef. de rendimento global de substrato a produto (Zhang, 2012)	$g_{produto}/g_{substrato}$
$(Y_{p/s})_V$	Coefficiente verdadeiro de rendimento de substrato a produto	$g_{produto}/g_{substrato}$
$Y_{spi/s}$	Coefficiente de rendimento global de substrato a sub-produto $i$	$g_{subproduto}/g_{substrato}$
$Y_{spi/s}'$	Coef. de rendimento global de substrato a sub-produto $i$ (Zhang, 2012)	$g_{subproduto}/g_{substrato}$
$Y_{x/s}$	Coefficiente de rendimento global de substrato a células	$g_{células}/g_{substrato}$
$(Y_{x/s})_V$	Coefficiente verdadeiro de rendimento de substrato a produto	$g_{células}/g_{substrato}$

### Símbolos gregos

$\mu$	Velocidade específica de crescimento do micro-organismo	$h^{-1}$
-------	---	----------

$\mu_{m\acute{a}x}$	Velocidade específica máx. de crescimento do micro-organismo	$h^{-1}$
$\mu_p$	Velocidade específica de produção de ácido fumárico	$h^{-1}$
$\alpha$	Parâmetro cinético	
$\beta$	Parâmetro cinético	$h^{-1}$

### Adimensionais

$m$	Parâmetro cinético de Lee
$n$	Parâmetro cinético de Levenspiel
$n^*$	Fator de escala

### Abreviações

AF	Ácido fumárico
CEPCI	<i>Chemical Engineering Plant Cost Index</i>
COCO	<i>CAPE-OPEN to CAPE-OPEN</i>

## 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Tendo em vista a crescente preocupação em buscar rotas ambientalmente mais amigáveis para produção de químicos, diversas matérias-primas alternativas e processos mais brandos têm sido investigados durante as últimas décadas. Um exemplo foi o desenvolvimento do polietileno verde pela Braskem, o qual utiliza eteno produzido através da desidratação catalítica de etanol como ponto de partida.

Antecipando futuras demandas por uma indústria química cada vez mais sustentável, o número de empresas investindo em pesquisas no setor é bastante expressivo, contando com nomes tais quais BASF e DuPont. A primeira participa de uma *joint venture* com a holandesa Corbion para produção de bio-ácido succínico (BASF, 2018), enquanto a DuPont, por sua vez, comercializa juntamente com Tate & Lyle 1,3-propanodiol gerado por matérias-primas de fonte renovável (BIOFUELS DIGEST, 2018).

Os dois produtos acima citados têm em comum o fato de haverem sido produzidos via rota fermentativa. O interesse por este tipo de processo, catalisado por micro-organismos, é justificado por suas características intrínsecas: as condições de reação amenas e o uso de matérias-primas como açúcares têm potencial para gerar menores consumos energéticos e impactos ambientais. A rota fermentativa é atualmente estudada como forma de obtenção de inúmeros compostos, como ácidos orgânicos, solventes e aminoácidos.

Em 2004, o Departamento de Energia dos Estados Unidos (DOE) publicou um relatório em que eram indicados químicos de valor agregado com maior potencial para serem produzidos a partir de biomassa (NREL & DOE, 2004). Compondo a lista, estavam diácidos com cadeias de quatro carbonos (C4) – ácidos succínico, fumárico e maleico, atualmente produzidos majoritariamente através de matérias-primas fósseis. Em comparação com succínico, os ácidos maleico e fumárico, em especial o último, têm despertado pouca atenção.

O ácido fumárico encontra diversas aplicações na indústria, sendo majoritariamente empregado como acidulante de bebidas e alimentos. Também participa de reações de polimerização, conferindo às resinas resistência diferenciada e, assim como os outros dois diácidos C4, pode ser convertido em 1,4-butanodiol, posteriormente utilizado em aplicações diversas, incluindo solventes, plásticos, resinas e polímeros.

Estes compostos, por sua vez, encontram seus usos finais em tintas de impressão, agentes de limpeza, fibras elásticas, tanques resistentes à corrosão e tubulações. O mercado para 1,4-butanodiol e derivados cresce aproximadamente 3% ao ano, com valor estimado em 2,8 bilhões de dólares (BIOFUELS DIGEST, 2018). Nesse contexto, percebe-se que a rota de produção fermentativa do ácido tem potencial para complementar a via petroquímica tradicional, ao mesmo tempo tornando o processo menos agressivo ao meio ambiente.

Diante deste cenário, pretendeu-se estudar o processo de produção de ácido fumárico via rota fermentativa através de ferramentas computacionais como o *COCO* e o *Scilab*. Juntamente a estes *softwares* voltados à simulação, também se fez uso de programas voltados especificamente à análise de bioprocessos, tais quais o *SimulaFerm*. Dessa forma, a obtenção do composto pode ser avaliada não somente no contexto de sua operação unitária principal, mas também considerando aspectos de modelagem cinética e ajuste de parâmetros.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Ácido fumárico – usos, aplicações e mercado

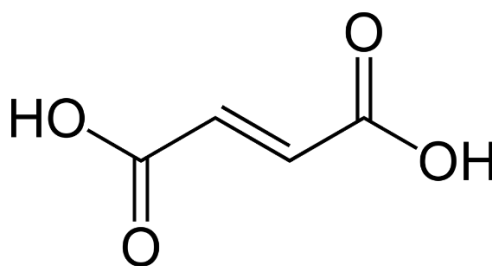
O ácido fumárico (AF), também conhecido como ácido (E)-2-butanodioico ou trans-1,2-etilenodicarboxílico, é um dicarboxílico com quatro carbonos cuja fórmula molecular é  $C_4H_4O_4$ . O composto ocorre naturalmente como produto do metabolismo de uma série de micro-organismos, uma vez que faz parte do ciclo de citrato, e foi isolado pela primeira vez da planta que deu origem ao seu nome, fumária (*Fumaria officinalis*), representada na Figura 2.

**Figura 2.1. Fumária, planta de onde o AF foi isolado pela primeira vez.**



**Fonte:** Paixão (2018).

Por conta dos dois grupos carboxila e da ligação dupla contida em sua estrutura (Figura 2.1.2), o composto encontra diversas aplicações na indústria, em especial como ponto de partida para produção de resinas insaturadas de poliéster. Neste setor, o ácido compete com o anidrido maleico, alternativa mais barata, tendo como potenciais vantagens a menor toxicidade e conferência de características especiais aos polímeros, como maior dureza e resistência térmica.

**Figura 2.1. Ácido fumárico.**

**Fonte:** Mundo educação (2018).

Aplicações como intermediário químico também incluem a produção de 1,4-butanodiol, através de hidrogenação das ligações duplas presentes na molécula. Esta reação confere ao ácido a possibilidade de ser empregado como *building block* para compostos com cadeias de 4 carbonos, sendo uma das justificativas citadas para produção de bio-ácido succínico.

Outra grande aplicação do ácido fumárico é na indústria alimentícia, a qual corresponde a 33% do consumo de AF produzido (DAS, 2016). Neste campo, tem sido usado como regulador de acidez em bebidas, vinho, derivados de queijo, dentre outros, com capacidade de controlar crescimento de micro-organismos indesejados e ajustar o pH. Por ter um sabor mais forte que o de outros ácidos usados para este fim, pequenas quantidades são suficientes para realçar o gosto dos alimentos, resultando em menores custos por unidade.

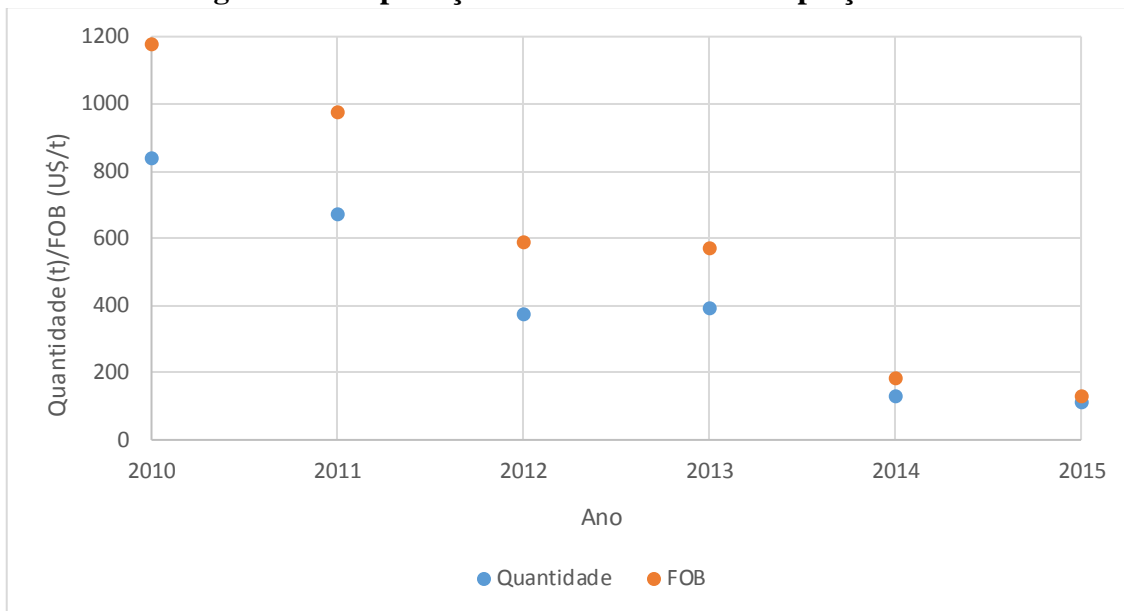
Além disso, o produto é intermediário na produção de outros orgânicos, como ácidos L-málico e L-aspartico. Conforme o uso destes últimos cresce nos setores de adoçantes e bebidas, o consumo de AF também é impulsionado. Outras aplicações do ácido orgânico incluem a formulação de cosméticos, produtos para cabelo e pele, também como regulador de acidez.

Mais recentemente, o AF também tem sido utilizado pela indústria farmacêutica no tratamento para psoríase - uma enfermidade que afeta a pele de indivíduos que não conseguem produzir ácido fumárico. Indivíduos com esta condição necessitam suprir esta deficiência ingerindo o composto em suas formas de monoetil ou dimetil-éster.

A produção do ácido fumárico foi estimada em 300 mil toneladas para 2018, e 346 mil para 2020 (MARTIN-DOMINGUEZ, 2018). No Brasil, as exportações têm decrescido desde 2010, não tendo sido reportadas em 2016 e 2017 (Figura 2.2). As importações apresentaram variações ao longo do mesmo período de tempo, tendo

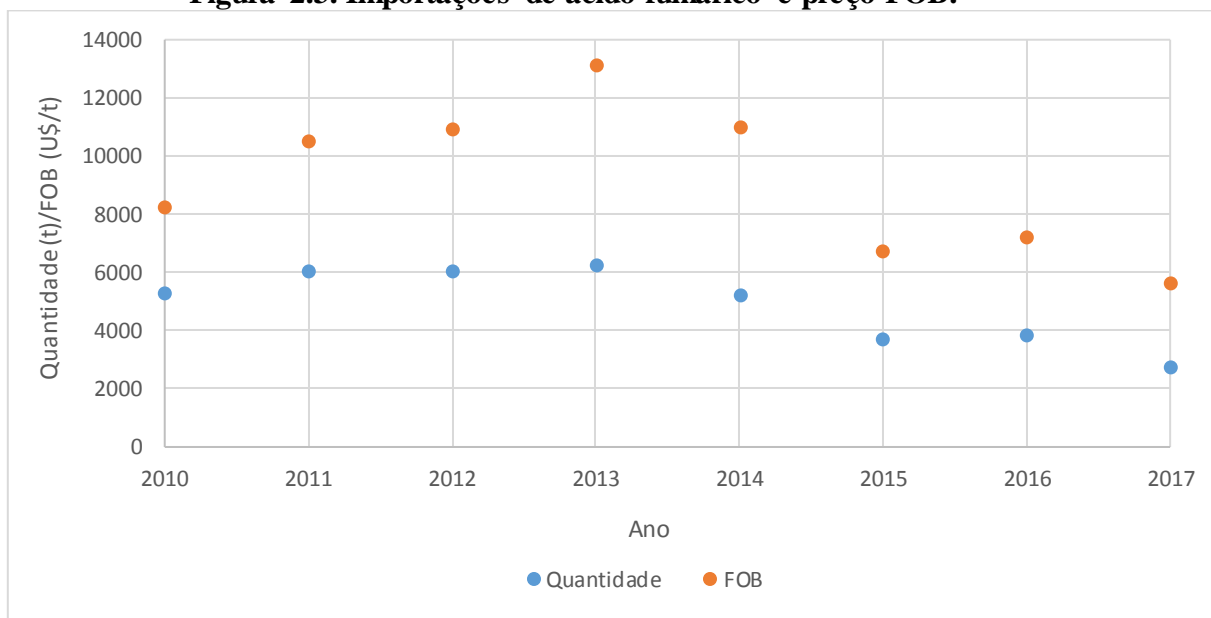
aparentemente se estabilizado em torno de 4 mil toneladas entre 2015 e 2017. O preço FOB acompanhou a tendência, equivalendo a cerca de 1,88 U\$/kg (Figura 2.3).

**Figura 2.2. Exportações de ácido fumárico e preço FOB.**



**Fonte:** Adaptado de ComexStat (2018).

**Figura 2.3. Importações de ácido fumárico e preço FOB.**

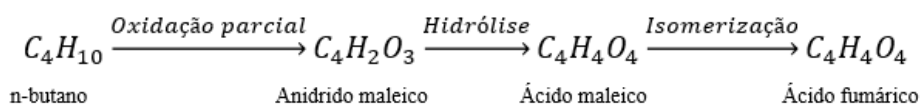


**Fonte:** Adaptado de ComexStat (2018).

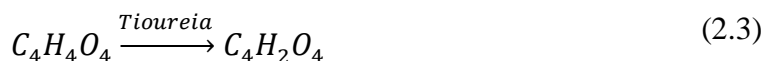
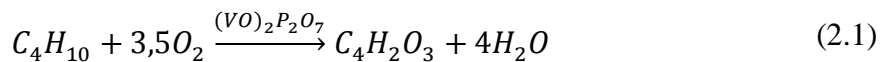
## 2.2 Rota de produção atual

Atualmente, a produção do ácido fumárico em sua totalidade se dá através da isomerização do ácido maleico, o qual por sua vez é obtido por meio da hidrólise de anidrido maleico. O anidrido pode ser gerado a partir da oxidação parcial catalítica de n-butano ou benzeno, embora esta última rota tenha sido descontinuada, em sua maior parte, a partir da década de 1980 em virtude de preocupações com a natureza carcinogênica do benzeno. As reações de transformação desde o n-butano até o ácido fumárico estão representadas pela Figura 2.4.

**Figura 2.4. Transformação de anidrido maleico até ácido fumárico.**



**Fonte:** Adaptado de Das (2016).



As equações (2.1) - (2.3) representam as transformações químicas da rota tradicional para produção de ácido fumárico. É interessante observar que a maior parte dos custos de produção de ácido fumárico – cerca de 60-70% do total (DAS, 2016) - correspondem à matéria-prima, anidrido maleico. Tendo em vista este fato, e lembrando que o anidrido compete com AF na produção de resinas insaturadas por ser uma opção mais barata, o aumento nos preços do anidrido tem tido grande influência no desenvolvimento de rotas alternativas para produção de ácido fumárico.



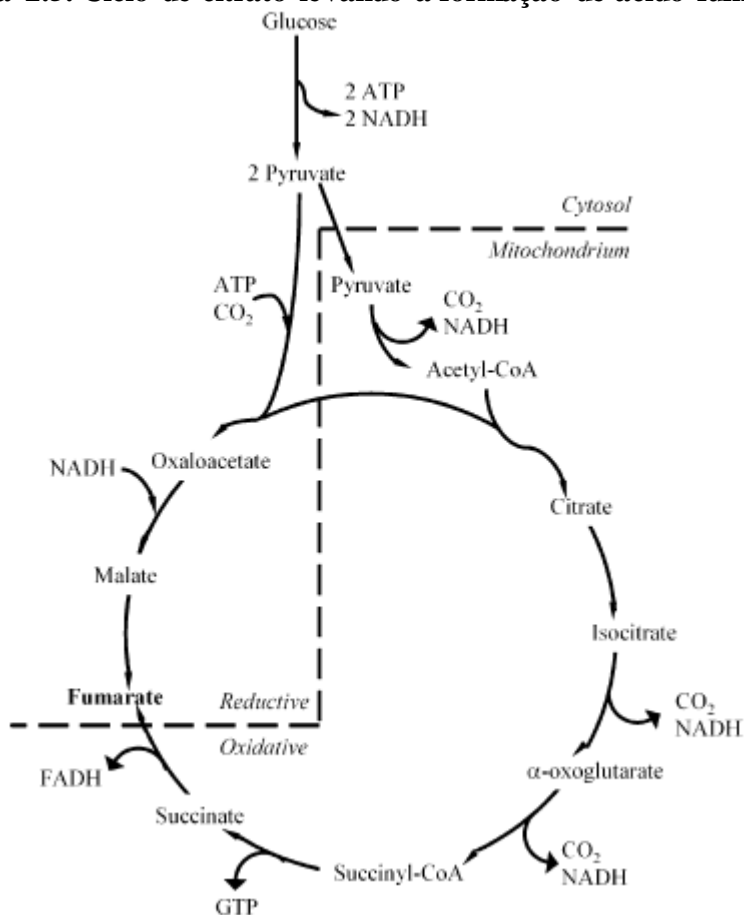
## **2.3 Rota de produção fermentativa**

A proposta de produzir ácido fumárico através de fermentação não é nova: já no início da década de 1940, a farmacêutica Pfizer a utilizava para fabricar o composto, com uma produção anual de 4000 ton. A rota biológica também atraiu a atenção de outras companhias, como a National Distillers and Chemical Company e DuPont, ambas tendo registrados patentes neste âmbito. Entretanto, os menores custos associados à rota química fizeram com que o processo fosse descontinuado.

### **2.3.1 Micro-organismos e substratos**

A síntese de ácido fumárico ocorre em todos os organismos aeróbicos majoritariamente através do ciclo de Krebs (ou ciclo de citrato); este foi ilustrado de maneira simplificada na Figura 2.5. Catalisada pela enzima piruvato carboxilase, a fixação redutiva de gás carbônico que ocorre durante este período leva à formação de ácido oxalacético, o qual é eventualmente convertido em ácido fumárico. A participação de CO<sub>2</sub> nesta reação explica porque a adição de carbonatos ao meio fermentativo aumenta o rendimento da reação (DAS, 2016).

**Figura 2.5. Ciclo de citrato levando à formação de ácido fumárico.**



**Fonte:** Das (2016).

Uma vez que o ácido fumárico faz parte dos produtos do metabolismo celular, uma série de micro-organismos são capazes de produzi-lo, mas apenas alguns o fazem em quantidades significativas (XU ET AL, 2012). Após estudo com 41 cepas de oito gêneros diferentes de fungos filamentosos da ordem *Mucorales*, foi identificado que as espécies *Rhizopus*, *Mucor*, *Cunninghamella* e *Circinella* são as mais promissoras para acumulação do orgânico.

Dentre as espécies citadas, as do tipo *Rhizopus* têm demonstrado melhores desempenhos. Cepas de *R. formosa*, *R. arrhizus*, *R. oryzae* e *R. nigricans* têm sido extensamente citadas em literatura sobre produção de ácido fumárico (MARTIN-DOMINGUEZ, 2018; XU ET AL, 2012). Conforme o Quadro 2.1, *R. arrhizus* foi identificada como a cepa relacionada a maiores concentrações finais de produto a partir de glicose, porém com baixo rendimento. De modo geral, nota-se que as cepas estão limitadas a baixos valores de produtividade.

**Quadro 2.1: Resultados experimentais obtidos para produtividade, concentração final de produto e rendimento.**

Micro-organismo	Concentração final (g/L)	Produtividade (g/L/h)	Rendimento (gproduto/gsubstrato)
<i>R. arrhizus</i>	121,0	1,02	0,37
<i>R. arrhizus</i>	40,0	0,46	0,33
<i>R. oryzae</i>	32,1	0,32	0,45
<i>R. oryzae</i>	52,7	0,54	-
<i>R.oryzae</i>	56,2	0,70	0,54
<i>R.oryzae</i>	30,2	0,18	0,28
<i>R. nigricans</i>	20,0	0,25	0,66
<i>R. oryzae</i>	37,2	1,03	0,53
<i>R. oryzae</i>	30,3	0,63	0,21

**Fonte:** Adaptado de Martin-Dominguez (2018).

Ressalva-se que as cepas de *R. arrhizus* apresentam também menores rendimentos do que as de *R. oryzae*, além de requererem meios de fermentação mais ricos em nutrientes para seu crescimento. Enquanto isso, apesar de algumas referências apontarem a espécie *R. oryzae* como a mais promissora – com produtividade superior a 4 g/L/h (CAO ET AL, 1996) -, tais resultados foram obtidos para um biorreator do tipo RBC (*Rotary Biofilm Contactor*), associado à remoção do ácido simultaneamente à fermentação. Apesar de promissora, a aplicação industrial desta técnica se mostra, até o momento, complexa demais para ser viável.

Como apontado, nota-se que a escolha de uma cepa para produção de AF é dificultada pela ausência de um micro-organismo que se destaque por ter, ao mesmo tempo, altos rendimento, produtividade, e concentração final de produto. Adicionalmente, resultados experimentais obtidos por vezes encontram aplicação limitada em estudos sobre viabilidade de produção comercial, já que se utilizam de condições ou equipamentos proibitivos para a indústria.

Quanto aos substratos utilizados como matéria-prima para o processo, nota-se que o mais comum é glicose. Sacarose e xilose, outros açúcares comumente empregados em fermentações, também foram investigados, porém com resultados negativos: sacarose apresenta metabolismo deficiente pelo fungo, enquanto a produtividade volumétrica

obtida para xilose é muito baixa – aproximadamente 0,087 g/L/h (STRAATHOF ET AL, 2008).

Levando em consideração que o custo do substrato representa entre 30 e 40% do total para um bioprocessamento (XU ET AL, 2012), diversas outras fontes de carbono mais baratas também foram estudadas. Dentre elas, destacam-se melaços, amidos e aquelas derivadas de resíduos agrícolas, como lascas de madeira, glicérol bruto e palha de milho. De maneira geral, observa-se que a utilização deste tipo de substrato não apresenta vantagens em termos de desempenho da fermentação quando comparados à glicose, de forma que o interesse neste tipo de fonte de carbono se dá em virtude da abundância e menor custo associado.

### **2.3.2 Condições de reação e parâmetros de influência**

Estudos experimentais realizados com respeito à produção de FA via fermentação indicam que o processo é melhor conduzido em temperaturas amenas, em torno de 33°C, mantendo-se o pH próximo de 5,5-6,0 (RHODES, 1961). Uma vez que o pH do meio cai rapidamente à medida em que o produto se acumula, é necessário adicionar um agente neutralizante ao fermentador. Do contrário, observam-se fortes efeitos de inibição no crescimento do micro-organismo e produção do ácido.

Os agentes mais comumente empregados são bicarbonatos; diversos estudos foram conduzidos com utilização de bicarbonatos de cálcio e sódio, avaliando sua influência na acumulação de produto. Hidróxido de cálcio e carbonato de amônio também foram considerados como possíveis agentes neutralizantes (STRAATHOF, 2008).

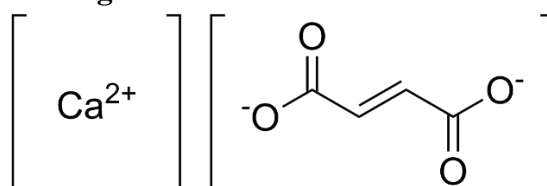
O uso de carbonato de cálcio é mais aceito como agente neutralizante para aplicações comerciais (STRAATHOF, 2016; XU ET AL, 2012). As justificativas reportadas são de que houve menores rendimento e produtividade associados quando outros agentes foram utilizados, além de haver maior formação de sub-produtos como etanol e ácido málico. Além disso, o bicarbonato de cálcio é capaz de suprir CO<sub>2</sub> utilizado na biossíntese de ácido fumárico (DAS, 2016).

Apesar de ser um entrave relativamente simples de ser solucionado, a necessidade de adicionar agentes neutralizantes ao fermentador confere à operação um grau extra de

complexidade. Carbonato de cálcio, apesar de ser o mais utilizado, apresenta propriedades físicas que tornam tanto a fermentação quanto o downstream mais problemáticos.

A presença de carbonato de cálcio no fermentador faz com que ácido fumárico produzido esteja presente na forma de sal – fumarato de cálcio (Figura 2.6). Este apresenta baixa solubilidade em meio aquoso (21 g/L a 30°C), fazendo com que o composto precipite durante a reação. As partículas de sal precipitado então interagem com as células presentes no meio, produzindo uma suspensão altamente viscosa, prejudicando a transferência de oxigênio.

**Figura 2.6. Fumarato de cálcio.**



**Fonte:** Wikipedia (2018).

A utilização de carbonato de sódio - ou outros agentes neutralizantes - seria um modo de reduzir custos associados ao processo, uma vez que sua solubilidade em meio aquoso é consideravelmente mais alta (307 g/L a 25°C). Desse modo, fumarato de sódio estaria presente no fermentado em sua forma dissolvida, fazendo com que a solução pudesse ser prontamente clarificada para separação de células. Adicionalmente, haveria possibilidade de reciclar os micélios utilizados, já que se manteriam vivos durante centrifugação ou filtração.

## **2.4 Downstream**

Conforme citado na seção anterior, as etapas de separação e purificação do ácido fumárico variam de acordo com o agente neutralizante utilizado durante fermentação. Dois tipos de sequência principais podem ser identificados; a primeira se dá quando o sal de fumarato formado é bastante solúvel em água, assemelhando-se a processos de downstream conhecidos e utilizados para produção de outros ácidos orgânicos, como o cítrico.

A formação de sais de fumarato solúveis no meio aquoso está associada, por exemplo, à adição de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  como neutralizantes. O fumarato de sódio formado ao longo da etapa de fermentação permanece dissolvido no meio, de forma que o fermentado pode ser imediatamente encaminhado à etapa de remoção de células, também denominada clarificação.

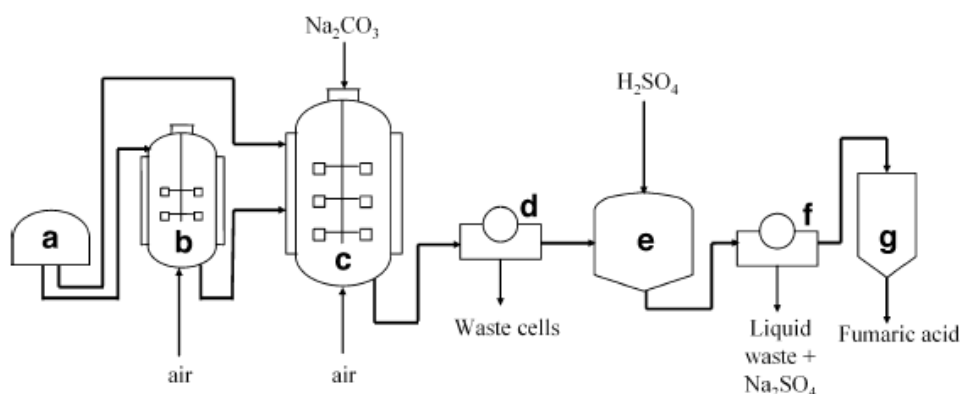
A etapa de clarificação se dá comumente por centrifugação ou filtração – geralmente, em processos envolvendo micélios como biocatalisadores, a filtração é a técnica mais indicada, uma vez que as hifas podem ocasionar problemas durante a operação das centrífugas (KRISTIASSEN ET AL, 1999). A remoção de células prontamente após a fermentação representa uma oportunidade de otimizar o processo, uma vez que permite a recuperação e reutilização das mesmas.

Em seguida, o ácido fumárico produzido e excretado pelas células precisa ser recuperado. Isto se dá através de mistura da solução aquosa obtida com ácidos inorgânicos, em geral sulfúrico ou clorídrico. Estes ácidos, quando em contato com fumarato de sódio, por exemplo, proporcionam reações de deslocamento, produzindo ácido fumárico (em solução no meio aquoso) e sulfato de sódio.

Dessa forma, o produto formado retorna à sua forma de ácido, estando dissolvido no meio aquoso. A solução é destinada, então, a uma segunda etapa de filtração, em que sulfato de sódio gerado é filtrado; o líquido segue para etapas de evaporação, cristalização e secagem, após as quais é obtido o ácido fumárico em sua forma cristalina e pura. Ressalta-se que o processo não está isento da presença de sub-produtos, os quais seriam separados do ácido fumárico principalmente durante a etapa de cristalização - esta operação tem seus parâmetros controlados de modo a maximizar o isolamento do produto principal.

Um esquema simplificado deste tipo de *downstream* foi esquematizado na Figura 2.7. Nesta, *a* se refere ao tanque de formulação, onde estão contidos nutrientes e a fonte de glicose, *b* é o reator de crescimento (*seed*), *c* ao fermentador, *d* ao filtro, *e* ao tanque de acidificação, *f* a um segundo filtro, e *g* ao secador rotativo.

**Figura 2.7. Downstream ácido fumárico – carbonato de sódio como neutralizante.**



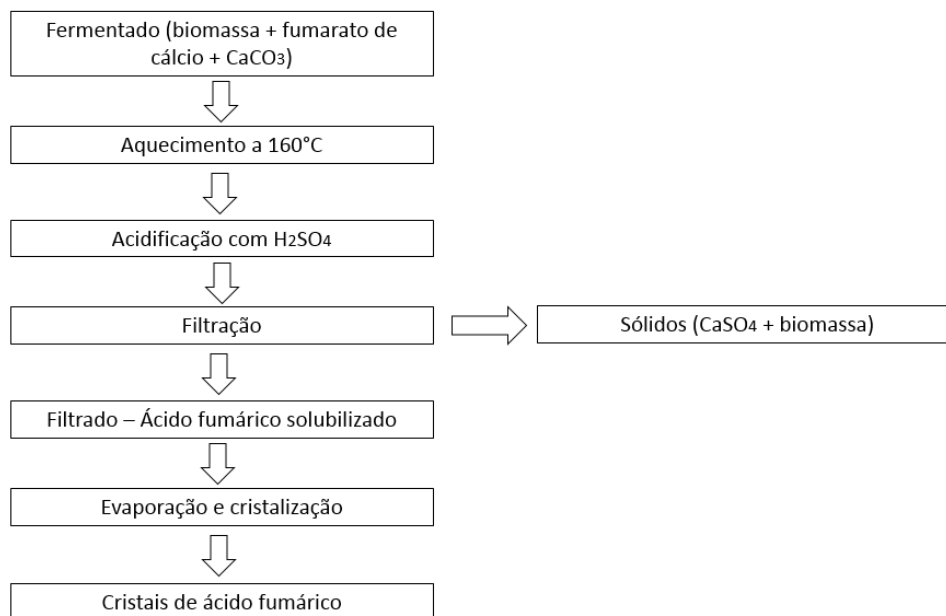
**Fonte:** Das (2016).

Já o segundo tipo de sequência é associado à formação de sais com tendência à precipitação, típico de quando se utiliza  $\text{CaCO}_3$  como agente neutralizante durante a fermentação. De modo análogo ao que ocorre quando se utiliza  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , este químico gera fumarato de cálcio quando em mistura com ácido fumárico produzido. Este sal apresenta baixa solubilidade em meio aquoso, sendo encontrado na forma de precipitado na dorna de fermentação.

Além de dificultar a transferência de massa, como citado na seção 2.3.2, a presença de produto na forma de precipitado sólido faz com que o fermentado não possa ser imediatamente filtrado ou centrifugado para remoção de células. A alternativa encontrada para contornar este entrave é aquecer todo fermentado produzido até aproximadamente  $160^\circ\text{C}$ , a fim de solubilizá-lo, acidificá-lo com ácido sulfúrico, e somente então realizar a etapa de filtração. Um diagrama de blocos com as etapas mais importantes encontra-se na Figura 2.8.

No filtro encontram-se retidos tanto os micélios utilizados na fermentação quanto o gesso formado durante acidificação. A solução de ácido fumárico filtrada seria por fim destinada à concentração e cristalização (Figura 2.8). A vantagem desta rota é que somente uma etapa de filtração é necessária no processo; entretanto, o aquecimento requer maiores gastos energéticos, além de inviabilizar o reciclo de micro-organismos.

**Figura 2.8. Downstream ácido fumárico – carbonato de cálcio como neutralizante.**



**Fonte:** Adaptado de Das (2016).

Uma variação deste processo consiste em aquecer e acidificar simultaneamente o fermentado até 90°C e pH 1. Então, o precipitado é filtrado, juntamente com as células, e o processo segue com as etapas de evaporação e cristalização. Apesar de consumir menos energia, o método é proibitivo se a concentração de ácido fumárico for maior do que 50 g/L, e também não permite a reutilização de micélios.

É importante mencionar que as etapas relativas ao *downstream* de AF impõem grandes barreiras à comercialização do processo (STRAATHOF ET AL, 2016). Além de serem associadas a grande consumo de ácidos inorgânicos, as técnicas convencionais envolvendo acidificação produzem quantidades consideráveis de gesso, o que representa maiores gastos com tratamento e descarte de resíduos. A geração de um subproduto em tal volume também vai de encontro com a proposta da rota fermentativa de apresentar menores impactos ambientais.

Tecnologias alternativas à precipitação foram estudadas – não somente para recuperação de fumárico, mas também para outros ácidos orgânicos -, porém demonstraram-se mais complexas e, por enquanto, com baixa eficiência (DAS, 2016). Dentre técnicas potenciais, cita-se extração líquido-líquido e o uso de resinas de troca iônica, as quais inclusive foram avaliadas para remoção de AF simultaneamente à fermentação, resultando em ganhos de produtividade e concentração final de ácido (CAO ET AL, 1996; ZHOU, 1999). Uma vantagem adicional destes métodos seria a



possibilidade de reduzir ou eliminar a quantidade de agente neutralizante empregada na fermentação, já que o ácido está sendo retirado constantemente da dorna.

### 3. METODOLOGIA

O estudo do processo fermentativo para produção de ácido fumárico envolveu diversas etapas, as quais são elucidadas a seguir. Dentre os passos de importância, destacam-se a busca por dados cinéticos satisfatórios e descrição dos mesmos através de um modelo de crescimento adequado, além da transposição destas informações para o ambiente de simulação juntamente com os balanços de massa.

#### 3.1 Dados cinéticos

A escolha de um conjunto de dados cinéticos adequado é fundamental para a modelagem da fermentação de ácido fumárico, de modo que todos os procedimentos posteriores de simulação e avaliação do processo dependem desta etapa. Para levantamento das informações requeridas, recorreu-se à literatura publicada sobre o assunto, em particular as relacionadas a trabalhos experimentais.

Minimamente, era necessário que fossem reportados dados sobre consumo de substrato, formação de produto e variação da concentração de células ao longo de todo tempo requerido para completar o processo fermentativo. Também era desejável que os dados descrevessem a formação de sub-produtos ao longo da fermentação, uma vez que as substâncias geradas concomitantemente ao produto definem as etapas de *downstream*.

##### 3.1.1 Modelagem e ajuste de parâmetros

Uma vez determinado o conjunto de dados, era necessário escolher um modelo cinético de crescimento que o descrevesse apropriadamente. Estes consistem em equações matemáticas que representem a velocidade específica de crescimento celular ( $\mu$ ), e são normalmente funções das concentrações de substrato, células e/ou produto (OLIVEIRA ET AL, 2017). Além disso, também precisaria ser determinada uma equação

que representasse a taxa de produção de ácido fumárico ( $\mu_p$ ), a qual pode ser associada, parcialmente associada ou não associada ao crescimento do micro-organismo.

Enquanto para a velocidade de formação de produto existem apenas estas três opções, segundo modelos previstos por Luedeking e Piret (1959), para a taxa de crescimento celular há uma infinidade de modelos cinéticos disponíveis. Uma vez que nenhuma informação sobre a representação matemática da fermentação de AF foi encontrada em literatura, vários modelos diferentes e seus parâmetros associados precisariam ser ajustados e avaliados nesta etapa.

Os modelos cinéticos mais utilizados para descrição de dados classificam-se como não estruturados e não segregados; isto é, aqueles que consideram uma população homogênea de células com composição média (OLIVEIRA ET AL, 2017). Neste grupo enquadra-se uma vasta gama de modelos bem conhecidos, divididos em duas categorias: modelos sem inibição, como o de Monod (1949), e os com inibição, tais quais os de Andrews (1968) e Levenspiel (1988).

Para auxiliar nesta etapa, tinha-se à disposição dois *softwares*: *OptimusFerm* e *SimulaFerm*, ambos os quais contêm em suas bibliotecas um leque de 32 modelos cinéticos, alguns dos quais listados no Quadro 3.1. Os dois módulos consistem em programas voltados ao estudo de biorreatores, e fazem parte do pacote conhecido como *AnaBioPlus*, desenvolvido por pesquisadores da Universidade Federal de São Carlos. O mesmo possui instalação livre e se caracteriza como uma ferramenta muito útil para análise de processos fermentativos, particularmente por conta de sua interface amigável e utilização intuitiva.

**Quadro 3.1. Alguns modelos cinéticos de crescimentos disponíveis no *SimulaFerm* e no *OptimusFerm*.**

<b>Sem inibição</b>	Monod (1949)	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{C_s}{K_s + C_s}$
	Moser (1985)	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{C_s^u}{K_s + C_s^u}$
	Contois (1959)	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{C_s}{K_{sx} \cdot C_x + C_s}$
<b>Com inibição por produto</b>	Hoppe e Hansford (1982)	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{C_s}{K_s + C_s} \cdot \frac{K_{IP}}{K_{IP} + C_p}$
	Aiba-Shoda-Nagatani (1968)	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{C_s}{K_s + C_s} \cdot e^{-K_p \cdot C_p}$
	Levenspiel (1988)	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{C_s}{K_s + C_s} \cdot \left(1 - \frac{C_p}{C_p^*}\right)^n$

Com inibição por substrato	Andrews (1968)	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{C_s}{K_s + C_s + \frac{C_s^2}{K_{IS}}}$
	Wu (1999)	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{C_s}{K_s + C_s + C_s \cdot \left(\frac{C_s}{K_{IS}}\right)^\theta}$
Com inibição por células	Lee, Polland e Coulman (1983)	$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{C_s}{K_s + C_s} \cdot \left(1 - \frac{C_x}{C_x^*}\right)^m$

Fonte: Adaptado de Oliveira (2015a).

O *OptimusFerm* é voltado ao ajuste de parâmetros cinéticos referentes a modelos de crescimento celular. Especializa-se, portanto, na resolução de problemas de otimização não-lineares, nos quais a função objetivo - erro entre valores calculados de substrato, produto e células e os dados experimentais – é minimizada (OLIVEIRA ET AL, 2015). Como restrições, tem-se os valores mínimos e máximos para os parâmetros em questão, inseridos pelo usuário durante a inicialização do programa.

O *SimulaFerm*, por sua vez, é dedicado à simulação de bioprocessos através da solução de balanços de massa. Neste, é possível escolher o tipo de cultivo do micro-organismo, o biorreator, as condições iniciais de operação, e o modelo cinético desejado. O programa então resolve o conjunto de equações pertinentes, resultando em curvas estimadas para consumo de substrato, acúmulo de produto e formação de biomassa. Para operações em estado transiente, é utilizado o método de Newton-Raphson associado a Runge-Kutta de 4ª ordem na resolução do sistema de equações diferenciais ordinárias (EDOs) (OLIVEIRA ET AL, 2015).

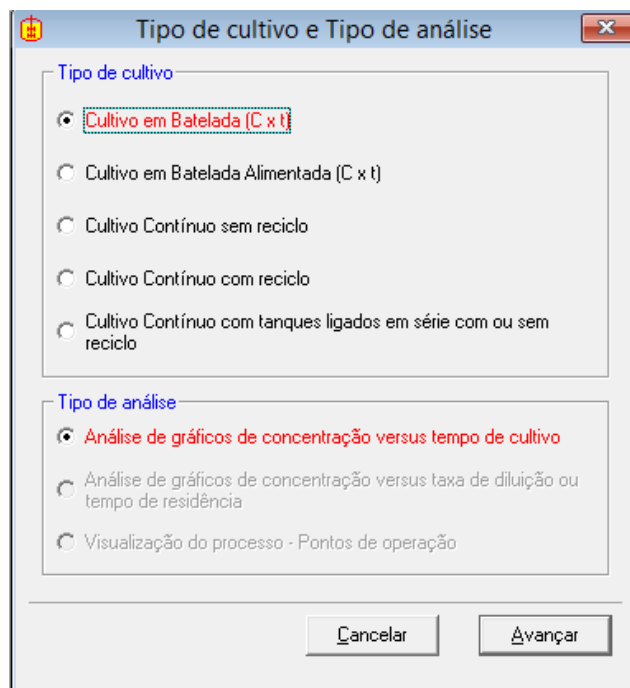
Idealmente, para escolha do modelo cinético e ajuste de parâmetros seria utilizado o *OptimusFerm*, enquanto que o segundo *software* seria destinado à simulação do processo já com valores otimizados previamente. Entretanto, foi feita a opção pelo *SimulaFerm* para o ajuste, em virtude de problemas de convergência do *OptimusFerm* apresentados durante a utilização do mesmo.

Estes problemas levam ao fechamento do programa dependendo do modelo escolhido e dos valores mínimo e máximo introduzidos como limites de otimização, dificultando o teste de diversos modelos e parâmetros em um único arquivo. Assim, para os diversos modelos analisados, o melhor conjunto de parâmetros cinéticos foi determinado com base em avaliação visual dos gráficos teóricos quando comparados aos dados experimentais.

### 3.1.2 Utilizando o *SimulaFerm*

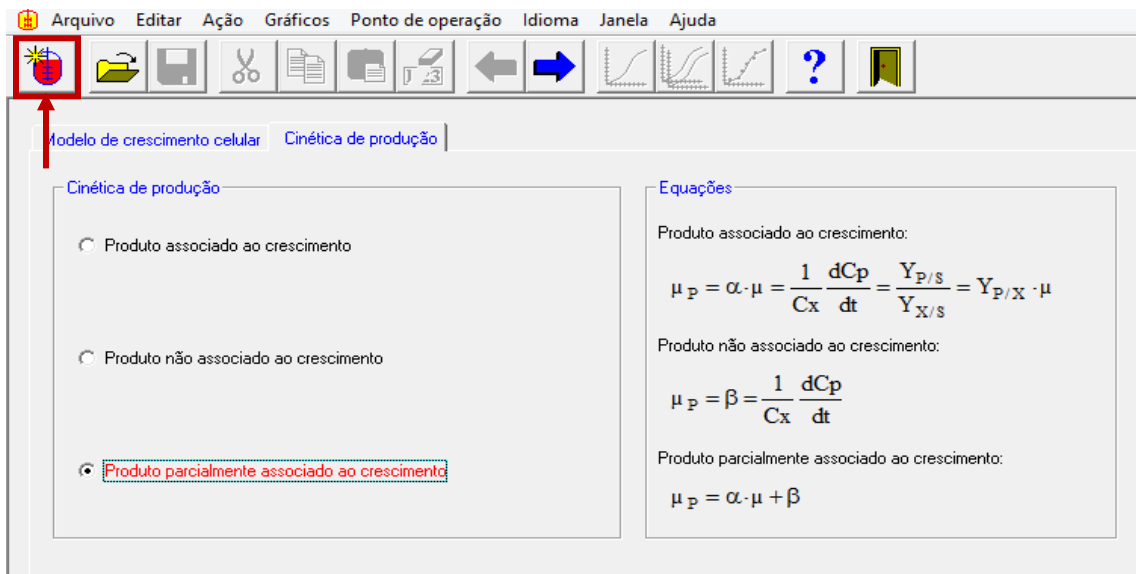
O software *SimulaFerm* apresenta interface amigável, com comandos intuitivos. Logo ao inicializar o programa, deve-se optar pelo tipo de experimento - se batelada ou em modo contínuo -, pelo modelo cinético de estudo e pela forma como o produto está associado ao metabolismo celular. Nas Figuras 3.1 e 3.2, foi ilustrado um caso em que se tem um experimento em batelada com formação de produto parcialmente associado ao crescimento do micro-organismo. Estas configurações podem ser acessadas ao longo das simulações no ícone destacado em vermelho (Figura 3.2), e alteradas conforme necessário.

**Figura 3.1: Escolha do tipo de experimento e análise.**



**Fonte:** Acervo pessoal.

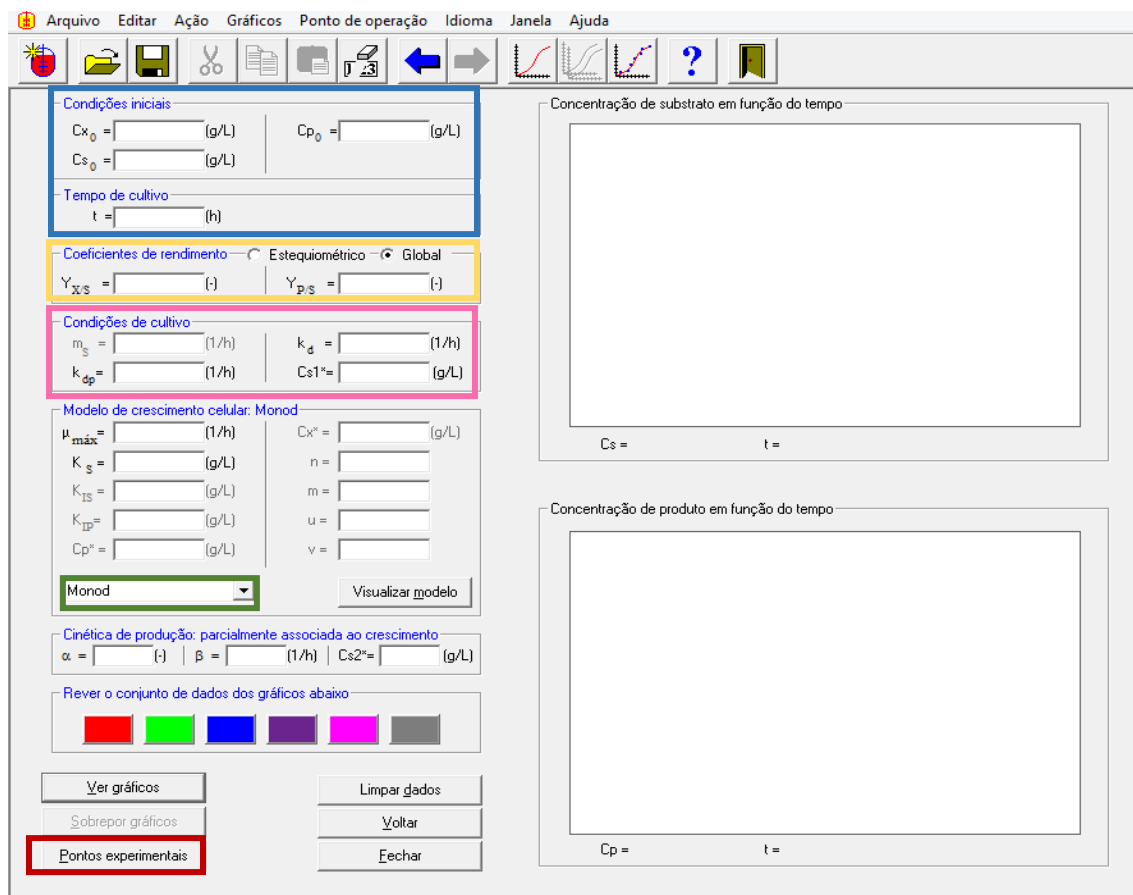
**Figura 3.2. Escolha do modelo de crescimento e cinética de produção.**



**Fonte:** Acervo pessoal.

O passo seguinte na configuração do *software* consistiu em informar tempo e condições iniciais do experimento (em azul na Figura 3.3), e os coeficientes de rendimento globais de produto e formação de biomassa,  $Y_{p/s}$  e  $Y_{x/s}$  (em amarelo, na mesma Figura). Também é necessário carregar o conjunto de dados experimentais a ser utilizado, acessando a opção “Pontos experimentais”, destacada em vermelho.

Figura 3.3. Página inicial do software *SimulaFerm.*



Fonte: Acervo pessoal.

Os coeficientes globais de rendimento podem ser calculados através das seguintes equações:

$$Y_{p/s} = - \frac{\Delta C_p}{\Delta C_s} \quad (3.1)$$

$$Y_{x/s} = - \frac{\Delta C_x}{\Delta C_s} \quad (3.2)$$

Em que:

$C_x$ : concentração de células no meio de fermentação,  $g.L^{-1}$ ;

$C_p$ : concentração de produto no meio de fermentação,  $g.L^{-1}$ ;

$C_s$ : concentração de substrato no meio de fermentação,  $g.L^{-1}$ ;

Ressalta-se que o *software* também comporta a opção por informar as taxas de morte celular, degradação de produto, e consumo de substrato para manutenção do micro-

organismo (em rosa na Figura 3.3). Entretanto, por se tratar de um estudo em fase inicial sobre fermentação, com limitação de dados disponíveis, tais valores foram desconsiderados da análise.

Uma vez carregadas todas as informações experimentais requeridas, pode-se realizar a avaliação dos modelos cinéticos, os quais são escolhidos na página inicial do programa (destaque em verde, na Figura 3.3). Os parâmetros relativos a cada modelo são automaticamente listados, e os campos devem ser preenchidos com estimativas iniciais a fim de gerar as curvas de concentrações teóricas. Estas podem ser observadas na mesma área que os dados experimentais, facilitando comparação.

### 3.2 Simulação do processo fermentativo

Conforme mencionado, a proposta deste trabalho foi avaliar o processo de produção de AF com auxílio de simuladores de processo. O *software* escolhido para este fim foi o *COCO (CAPE-OPEN to CAPE-OPEN)*, o qual se caracteriza como um simulador de processos químicos gratuito capaz de se comunicar com outros programas que façam uso das especificações *CAPE-OPEN*. Dentre as várias facetas deste conjunto de modelos, os mais importantes consistem em operações unitárias e propriedades termodinâmicas (Ribeiro, 2018).

Dentre os componentes disponíveis no ambiente do *COCO*, destacam-se:

- *COFE (CAPE-OPEN Flowsheet Environment)*: é a interface gráfica dos fluxogramas de processo, equipada com algoritmos de resolução sequencial. Nela é possível verificar propriedades de correntes e lidar com conversão de unidades, além de haver recursos para plotagem de gráficos.
- *TEA (COCO's Thermodynamics for Engineering Applications)*: baseada no código da biblioteca de dados termodinâmicos do *ChemSep*, compreende um banco com mais de 430 compostos químicos comuns. O pacote inclui aproximadamente 100 métodos para cálculo de propriedades através de soluções analíticas ou numéricas.
- *COUSCOUS (CAPE-OPEN Unit-Operations Simple)*: pacote de operações contendo divisor, misturador, trocadores de calor, bombas e



reatores. Inclui também o *ChemSep-LITE*, versão limitada do *ChemSep* capaz de simular colunas de destilação em equilíbrio com até 40 compostos e 300 estágios.

Apesar das várias funcionalidades, o programa não apresenta meios para lidar com problemas em estado transiente, apresentando em sua biblioteca apenas modelos de operações unitárias estacionárias. Isso constituiu um entrave para a utilização do *software*, uma vez que a fermentação de ácido fumárico dificilmente se processaria em modo contínuo, mesmo que a produção como um todo opere desta forma. Assim, para simulação do processo de modo mais representativo da realidade, fez-se uso da possibilidade de integrar etapas em batelada equacionadas no *Scilab* com os modelos de operações unitárias contínuas próprios do *COCO*.

### 3.2.1 Estudo do processo fermentativo em *Scilab*

O *Scilab* é um *software* livre para computação numérica semelhante ao *Matlab*. O programa inclui centenas de funções matemáticas e ferramentas, tais quais gráficos 2D e 3D, operações com polinômios, matrizes e equações não-lineares. O ambiente também engloba métodos numéricos para resolução de sistemas de EDOs explícitas, os quais podem ser acionados por meio da função “ode”. Caso o tipo de problema não seja definido, automaticamente a função acessa o pacote numérico “ODEPACK”, o qual seleciona o método preditor-corretor de Adams para problemas não-rígidos e a Fórmula de Diferenciação Retroativa (FDR) para rígidos (RIBEIRO, 2018).

Na rotina criada em *Scilab* devem ser inseridas todas as equações referentes aos balanços de massa e modelagem cinética, bem como os parâmetros ajustados previamente. As equações listadas abaixo representam parte do equacionamento necessário a esta etapa. Nota-se que as variações de concentração com o tempo equivalem, respectivamente, às taxas de crescimento celular ( $r_x$ ), acúmulo de produto ( $r_p$ ) e consumo de substrato ( $r_s$ ).

$$\frac{dC_x}{dt} = r_x = \mu \cdot C_x \quad (3.3)$$

$$\frac{dC_p}{dt} = r_p = \mu_p \cdot C_x \quad (3.4)$$

$$\frac{dC_s}{dt} = -r_s = -\left( \frac{\mu \cdot C_x}{(Y_{x/s})_V} + \frac{r_p}{(Y_{p/s})_V} \right) \quad (3.5)$$

Em que:

$\mu$ : velocidade específica de crescimento do micro-organismo,  $h^{-1}$ ;

$\mu_p$ : velocidade específica de produção de ácido fumárico,  $h^{-1}$ ;

$(Y_{x/s})_V$ : coeficiente de rendimento de substrato limitante a células, estequiométrico ou verdadeiro,  $g_{células}/g_{substrato}$ ;

$(Y_{p/s})_V$ : coeficiente de rendimento de substrato limitante a ácido fumárico, estequiométrico ou verdadeiro,  $g_{produto}/g_{Substrato}$ .

A respeito do equacionamento descrito para a variação da concentração de células (equação 3.3), foi desconsiderada a taxa de morte celular, a fim de reduzir a complexidade do problema abordado. O balanço de massa para o substrato limitante (equação 3.5) também consiste em uma abordagem simplificada, em que o mesmo é destinado somente ao crescimento celular (primeiro termo da equação) e à formação de produto (segundo termo). Não foram considerados gastos para manutenção da atividade metabólica.

Segundo Oliveira et al (2015a), para um caso em que estejam disponíveis somente os coeficientes globais ou observados de rendimento de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ) e em produtos ( $Y_{p/s}$ ), o cálculo do consumo total de substrato se resume à equação abaixo. Essa simplificação pode ser feita porque considera-se que a porcentagem de substrato consumido para formação de produto já está contida no coeficiente global de rendimento.

$$\frac{dC_s}{dt} = -r_s = -\left( \frac{\mu \cdot C_x}{Y_{x/s}} \right) \quad (3.6)$$

As equações referentes às velocidades específicas de crescimento do micro-organismo ( $\mu$ ) e produção de ácido fumárico ( $\mu_p$ ) devem ser aquelas determinadas através dos procedimentos elucidados na seção 3.1.2. Para a taxa de produção  $\mu_p$ , existem as possibilidades destacadas nas equações seguintes, em que  $\alpha$  e  $\beta$  são parâmetros cinéticos.

As equações se referem respectivamente à geração de produto associada, parcialmente associada, e não associada à geração de biomassa (Luedeking e Piret, 1959).

$$\mu_p = \alpha \cdot \mu \quad (3.7)$$

$$\mu_p = \alpha \cdot \mu + \beta \quad (3.8)$$

$$\mu_p = \beta \quad (3.9)$$

### 3.2.2 Integração da rotina em *Scilab* ao *COCO*

Uma vez que a rotina implementada em *Scilab* estivesse retornando os resultados esperados, a mesma é inserida no simulador na forma de operação unitária customizada, conforme procedimentos elucidados por Ribeiro (2018). O código inserido como operação é adaptado adicionando-se as funções *getFeedProp* e *setProduct*; enquanto a primeira permite obter uma propriedade física de uma corrente alimentada ao módulo, a segunda especifica as portas de produto, de acordo com resultados obtidos na rotina.

Destaca-se que a comunicação entre os programas se deu através da instalação dos *plug-ins* “*Scilab CAPE-OPEN Unit Operation*” e “*Scilab CAPE-OPEN Thermo Import*”. Estes possibilitam que a rotina seja acessada no fluxograma de processo do *COCO* e calculada no *Scilab*, com as propriedades termodinâmicas previamente escolhidas no simulador de processos.

Além da rotina customizada, é necessário indicar ao *COCO* o conjunto de componentes envolvidos nas transformações químicas. Caso os mesmos não estejam disponíveis na biblioteca de dados, é preciso criar uma base contendo algumas propriedades básicas, tais quais massa molecular, fórmula estrutural, *SMILES*, família e densidade (RIBEIRO, 2018).

Quando possível, o simulador estima os dados ausentes através do método UNIFAC, porém, quanto maior o número de informações experimentais fornecidas, maior a acurácia dos cálculos. Reforça-se que a disponibilidade destas informações, bem como a escolha apropriada dos modelos termodinâmicos a serem implementados na simulação, se configura como um passo crucial para garantir que os resultados obtidos sejam condizentes com a realidade.

Além da configuração dos componentes e suas propriedades físicas, ao simulador também precisam ser fornecidos os dados referentes às vazões mássicas de alimentação do processo; estas podem ser determinadas através da equação abaixo. Tal informação é introduzida somente na primeira operação unitária do fluxograma, de modo que o simulador calcula as saídas dos demais equipamentos presentes, e retorna os resultados de vazão do último.

$$\dot{m}_i = \frac{C_{i,tf} \cdot 0,001 \cdot V}{t_d} \quad (3.10)$$

Em que:

$\dot{m}_i$ : vazão mássica do componente  $i$ ,  $\text{kg.h}^{-1}$ ;

$C_{i,tf}$ : concentração do componente  $i$  ao término da batelada,  $\text{g.L}^{-1}$ ;

$V$ : volume do fermentador, L;

$t_d$ : tempo de descarga do fermentador, h.

### 3.3 Avaliação econômica

Com o objetivo de estimar quanto poderia ser ganho com a produção de ácido fumárico, foi realizada uma avaliação econômica preliminar do processo. Nesta foram considerados como gastos operacionais os custos com matéria-prima - no caso, apenas a glicose -, e como lucro a venda do ácido e dos demais sub-produtos obtidos.

Ademais, para verificar a ordem de grandeza do investimento a ser realizado na área de fermentação, o custo dos equipamentos simulados também foi levantado. Os mesmos podem ser obtidos em literatura, através de correlações e gráficos, ou por meio de sites especializados. Quando as informações obtidas não correspondem a um equipamento com as mesmas dimensões do equipamento estudado, é possível corrigir o custo utilizando a seguinte equação:

$$C_2' = C_1 \cdot \left(\frac{S_2}{S_1}\right)^n \quad (3.11)$$

Em que:

$S_1$ : dimensão característica de referência;

$S_2$ : dimensão característica do equipamento estudado;

$C_1$ : custo de referência do equipamento de dimensão  $S_1$ ;

$C_2'$ : custo do equipamento estudado;

$n$ : fator de escala.

Além disso, quando o custo obtido se encontra desatualizado, pode-se corrigir a estimativa pela inflação acumulada durante o tempo. Este procedimento é realizado através de uma relação simples, demonstrada na equação abaixo, na qual se usam os índices CEPCI (*Chemical Engineering Plant Cost Index*) dos anos correspondentes. O fator se caracteriza por ser um índice composto que compreende flutuações nos preços de equipamentos, supervisão, construção, dentre outros itens de Engenharia Química.

$$C_2 = C_2' \cdot \left( \frac{CEPCI_2}{CEPCI_1} \right) \quad (3.12)$$

Em que:

$C_2'$ : custo do equipamento antes da correção;

$C_2$ : custo corrigido do equipamento;

$CEPCI_i$ : índice correspondente ao ano em questão.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Dados cinéticos

Tendo em vista que durante as pesquisas não foi encontrado um artigo único que atendesse a todas as especificações desejadas, o processo fermentativo foi avaliado com base em estudos de duas referências distintas. O artigo de Rhodes (1962) continha o conjunto de dados cinéticos mínimos para descrição matemática da fermentação, enquanto o de Zhang (2012) foi destinado ao estudo da formação de sub-produtos, a qual será abordada separadamente.

#### 4.1.1 Modelagem e ajuste de parâmetros

O artigo de Rhodes (1962) reportou a fermentação de açúcares a ácido fumárico em tanques de 20 L. A transformação se deu em meio contendo solução comercial de glicose proveniente de milho, com cepa de *R. arrhizus* NRRL 2582; a concentração do carboidrato dentro dos tanques foi ajustada entre 10 e 16% (m/m) durante a realização dos experimentos.

O meio ainda continha mistura simples de sais,  $\text{CaCO}_3$  adicionado para neutralização do ácido fumárico formado, e polipropileno glicol inserido esporadicamente para controle da formação de espuma no reator. Condições detalhadas dos testes encontram-se resumidas no Quadro 4.1.

**Quadro 4.1. Condições de fermentação adotadas por Rhodes (1962).**

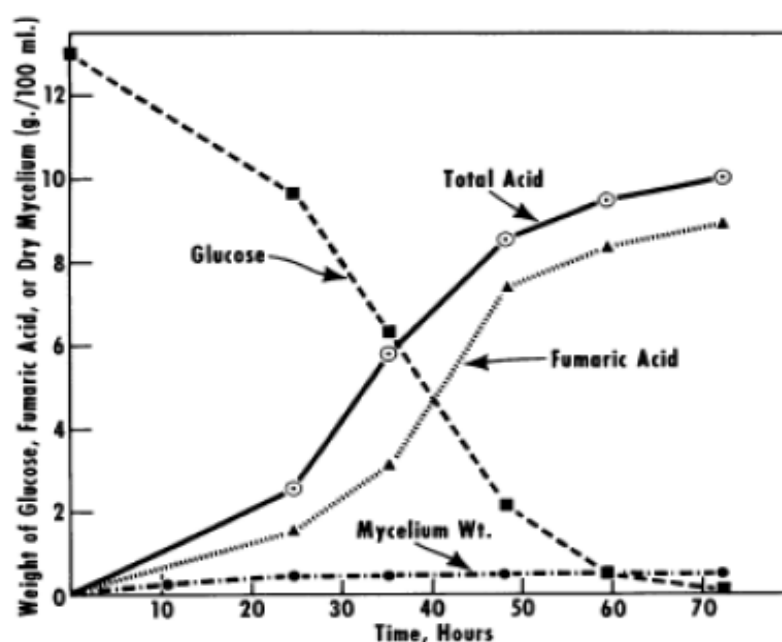
<b>Aeração</b>	0,50 vvm
<b>Agitação</b>	300 rpm
<b>Temperatura (°C)</b>	33
<b>pH</b>	5,8-6,2
<b>Formulação de sais e suplementos</b>	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,34-0,42 g/L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,40 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,40 g/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,044 g/L

Tartarato de ferro	0,010 g/L
Licor de milho	0,50 mL/L

**Fonte:** Adaptado de Rhodes (1962).

Através dos resultados reportados pelo artigo, foi possível obter os dados mínimos necessários para modelagem da cinética de reação. Estas informações foram encontradas na forma gráfica, o qual apresentava o perfil de consumo de substrato ao longo do tempo, bem como a variação nas concentrações de células e produto. O mesmo foi reproduzido na Figura 4.1. Nota-se que, apesar de o autor mencionar a produção concomitante de outros tipos de ácidos como sub-produtos, os mesmos não são identificados, de modo que este dado não poderia ser utilizado para síntese das operações de separação e purificação.

**Figura 4.1. Produção de ácido fumárico, consumo de glicose e formação de biomassa.**



**Fonte:** Rhodes (1962).

Tanto o substrato utilizado quanto o agente neutralizante e demais condições de fermentação estavam de acordo com práticas normalmente empregadas para produção de ácido fumárico. Portanto, o conjunto de dados foi considerado como representativo e adequado para a etapa posterior de modelagem.

Os três conjuntos de pontos necessários – variação nas concentrações de substrato, ácido fumárico e células - foram retirados do gráfico apresentado na Figura 4.1 com

auxílio do *software ScanIt*, o qual extrai dados de curvas apresentadas como imagens. A fim de uniformizar os valores de tempo para os pontos obtidos, os mesmos foram submetidos a um procedimento de reconciliação por interpolação. Na Tabela 4.1 foram organizados os dados mantidos para o estudo cinético.

**Tabela 4.1. Variação nas concentrações de glicose, substrato e produto ao longo do tempo.**

Tempo (h)	Glicose (g/L)	AF (g/L)	Biomassa seca (g/L)
0	135,00	0	0,086
10,90	133,70	7,02	2,86
24,60	99,56	15,60	4,60
35,30	64,31	31,90	4,63
48,00	22,20	75,56	4,85
59,00	5,55	85,52	4,90
71,90	1,12	91,20	5,10

**Fonte:** Adaptado de Rhodes (1962).

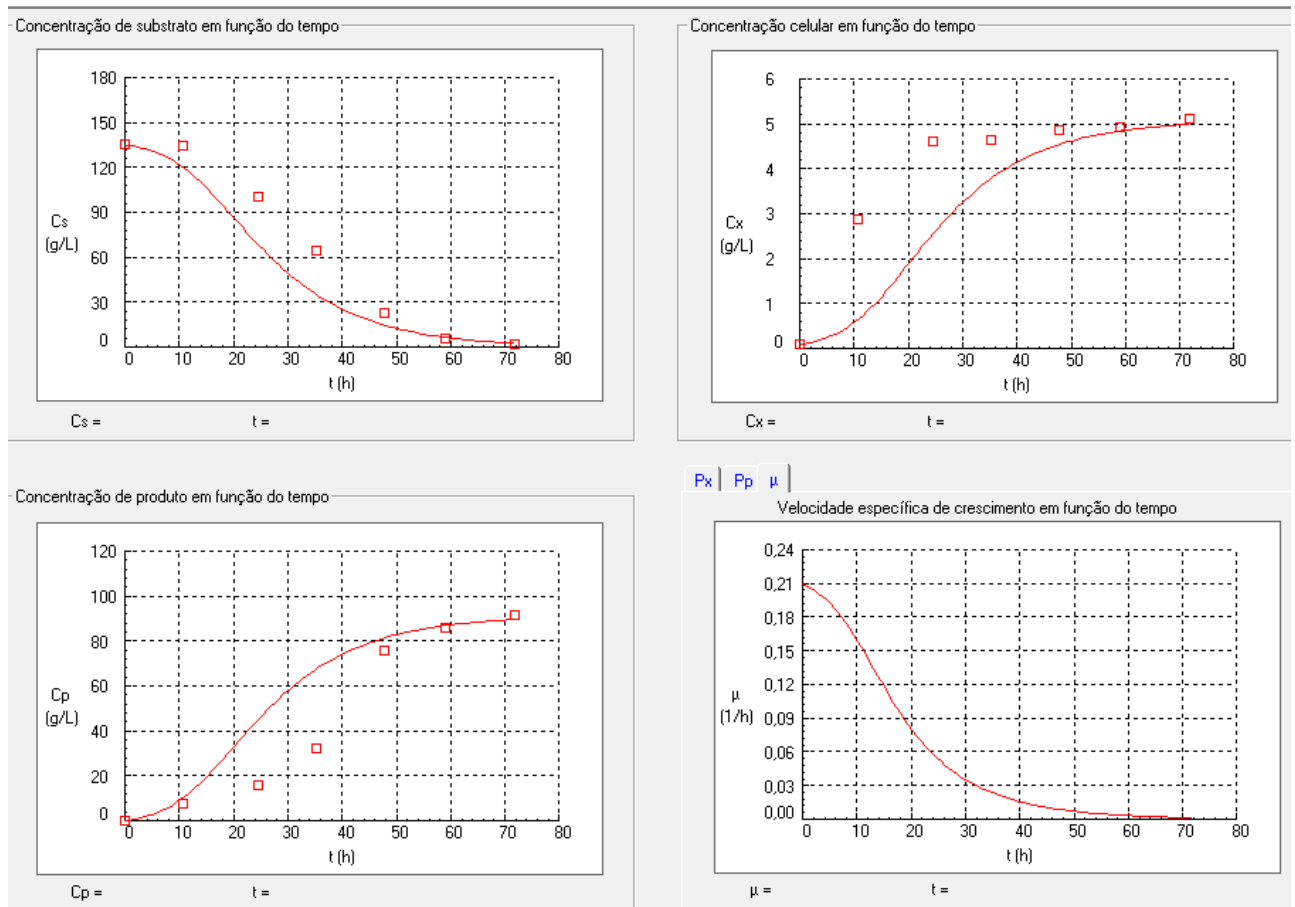
Com os dados apresentados acima, prosseguiu-se ao cálculo dos rendimentos globais  $Y_{x/s}$  e  $Y_{p/s}$ , necessários à avaliação dos modelos cinéticos. Os resultados obtidos após aplicação das equações (3.1) e (3.2) foram, respectivamente, 0,037 e 0,676. Dispondo destes valores, iniciaram-se os testes para validação de um modelo cinético adequado aos dados experimentais.

Dentre os diversos modelos testados nesta etapa, citam-se representantes de equações as quais consideram inibição por substrato, produto ou concentração crítica de células (Quadro 3.1). Juntamente a eles foram avaliados os diferentes modos de acumulação de produto pelo micro-organismo, a fim de validar também a representação matemática da taxa de acúmulo de produto ( $\mu_p$ ).

Os modelos cinéticos de crescimento que melhor se ajustaram aos três grupos de pontos experimentais em questão foram os de Contois (1959) e Lee, Polland e Coulman (1983), juntamente com modelo de acúmulo parcialmente associado ao crescimento (equação (3.8)). De modo geral, observa-se que os maiores desvios foram relativos ao perfil de concentração de células no início da batelada; entretanto, julgou-se que os modelos foram capazes de se aproximar razoavelmente da tendência apresentada pelos pontos empíricos, com boa previsão das concentrações ao fim do experimento. Os gráficos obtidos pelo *SimulaFerm* foram ilustrados nas Figuras 4.2 e 4.3.

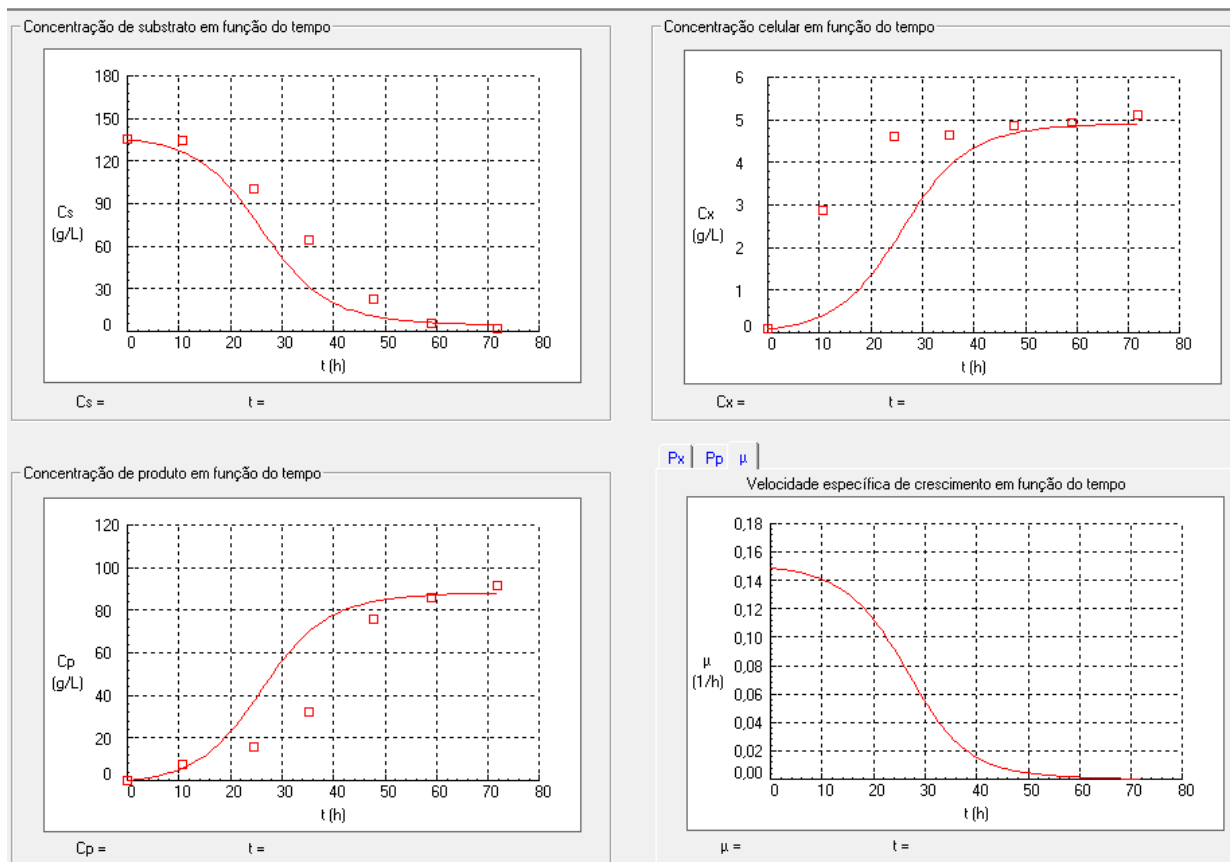


**Figura 4.2. Modelo de Contois- concentrações de substrato, células e produto ao longo do tempo.**



**Fonte:** Acervo pessoal.

**Figura 4.3. Modelo de Lee - concentração de substrato, células e produto ao longo do tempo.**



**Fonte:** Acervo pessoal.

A equação de Contois representada abaixo foi desenvolvida como um modelo empírico sem base mecanística bem definida, originalmente voltada a micro-organismos que consumissem substratos solúveis. O bom ajuste de dados experimentais, entretanto, fez com que a utilização do modelo se expandisse além do escopo inicial, sendo hoje usado inclusive para culturas com substratos insolúveis, tais quais celulose e resíduos sólidos urbanos (WANG, 2014).

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{C_s}{K_{sx} C_x + C_s} \quad (4.1)$$

Em que:

$K_{sx}$ : constante de saturação de Contois.

A equação tem formato semelhante à de Monod, representada a seguir, e descreve uma situação em que a taxa específica de crescimento do micro-organismo depende não

só da concentração de substrato limitante, mas também da concentração de células. A relação inversamente proporcional entre os termos, conforme ilustrado na equação (4.1), indica uma restrição ao crescimento celular em meio a altas concentrações de biomassa. Por este motivo, o modelo tem sido associado a sistemas com alta densidade de micro-organismos, em processos tanto aeróbios quanto anaeróbios (NELSON, 2009).

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{C_s}{K_s + C_s} \quad (4.2)$$

Em que:

$K_s$ : constante de saturação, g.L<sup>-1</sup>.

Já o modelo de Lee encontra-se no grupo de modelos com inibição por concentração de células. O modelo foi reportado pela primeira vez em um artigo tratando sobre a fermentação de etanol em reatores contínuos com reciclo de células, e apresenta formato análogo ao visto na equação de Levenspiel (1988). As equações referentes a ambos esses modelos foram ilustradas em sequência a seguir:

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{C_s}{K_s + C_s} \cdot \left(1 - \frac{C_x}{C_x^*}\right)^m \quad (4.3)$$

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{C_s}{K_s + C_s} \cdot \left(1 - \frac{C_p}{C_p^*}\right)^n \quad (4.4)$$

Em que:

$C_x^*$ : concentração crítica de células a partir da qual cessa o crescimento celular, g.L<sup>-1</sup>;

$m$ : parâmetro cinético;

$C_p^*$ : concentração crítica de produtos a partir da qual cessa o crescimento celular, g.L<sup>-1</sup>;

$n$ : parâmetro cinético.

Enquanto a equação de Levenspiel (4.4) se refere à ocorrência de inibição do crescimento celular a partir de determinada concentração de produto, o modelo de Lee prediz que a taxa de crescimento específica é limitada por uma concentração crítica de biomassa. Tal valor representa a máxima concentração de células que pode ser atingida sob condições de crescimento ideais, incluindo suprimento adequado de nutrientes e nenhuma inibição por produto observada. A potência  $m$  indica quão fortemente o termo de inibição afeta a taxa de crescimento (LEE ET AL, 1983).

Quanto à taxa de acúmulo de produto ( $\mu_p$ ), percebe-se que o modelo de produção parcialmente associado ao crescimento se configura como um híbrido. O mesmo descreve formação de produto quando o crescimento celular é menor, e também na fase estacionária. A melhor descrição dos dados experimentais através deste modelo condiz com informações encontradas em literatura. Estas mencionam que o ácido não se acumula em quantidades significativas durante o crescimento ativo, uma vez que é majoritariamente empregado para formação de constituintes da célula (ZHANG, 2012).

Os parâmetros cinéticos relativos a cada modelo encontram-se organizados no Quadro 4.2.2, tendo sido determinados com base em comparação com dados experimentais, como mencionado anteriormente. A utilização destes modelos para descrição do processo fermentativo foi tida como satisfatória, uma vez que o embasamento teórico de cada um era aplicável ao conjunto de dados, e os parâmetros de ajuste se apresentaram como valores coerentes.

**Quadro 4.2. Parâmetros cinéticos ajustados – modelos de Contois, Lee, e acúmulo de produto parcialmente associado ao crescimento.**

Contois		Lee				Produto	
$\mu_{m\acute{a}x}$ (h <sup>-1</sup> )	$K_{sx}$	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h <sup>-1</sup> )	$K_s$ (g/L)	$C_x^*$ (g/L)	$m$	$\alpha$	$\beta$
0,22	80	0,25	90	4,90	0,50	18,27	0,0008

**Fonte:** Acervo pessoal.

Observa-se também que os modelos de Contois e Lee são semelhantes entre si no sentido de prever uma limitação do crescimento celular pela própria concentração de células no meio. Este resultado pode estar relacionado à questão da morfologia das espécies *Rhizopus*, as quais são conhecidas por ocasionalmente crescer formando aglomerados densos nas paredes do reator e no agitador (ZHANG, 2012; STRAATHOF, 2016). Aliado à presença de carbonato de cálcio como agente neutralizante, o desenvolvimento de tais aglomerados pode levar a limitações na transferência de oxigênio, prejudicando a fermentação.

#### 4.1.2 Formação de sub-produtos

Os estudos conduzidos por Zhang (2012) eram voltados à otimização e escalonamento do processo fermentativo para produção de AF, bem como à síntese das

etapas de *downstream*. Em uma das etapas do trabalho, foram realizados experimentos de fermentação em batelada em frascos de 250 mL, a fim de verificar a performance de cepas de *R. oryzae* na produção do ácido a partir de glicose. A formulação do meio fermentativo foi resumida no Quadro 4.3.

**Quadro 4.3: Condições experimentais impostas para produção de ácido fumárico com *R. oryzae*.**

<b>Concentração de substrato (g/L)</b>	80-130
<b>Agente neutralizante CaCO<sub>3</sub> (g/L)</b>	80
<b>pH</b>	~5
<b>Formulação de sais e suplementos</b>	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25 g/L
MgSO <sub>4</sub>	0,25-0,4 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,3-0,6 g/L
ZnSO <sub>4</sub>	0,044-0,088 g/L
FeCl <sub>3</sub>	0,0075 g/L
Licor de milho	0,5 mL/L
Metanol	15 mL/L
Ácido tartárico	0,0075 g/L

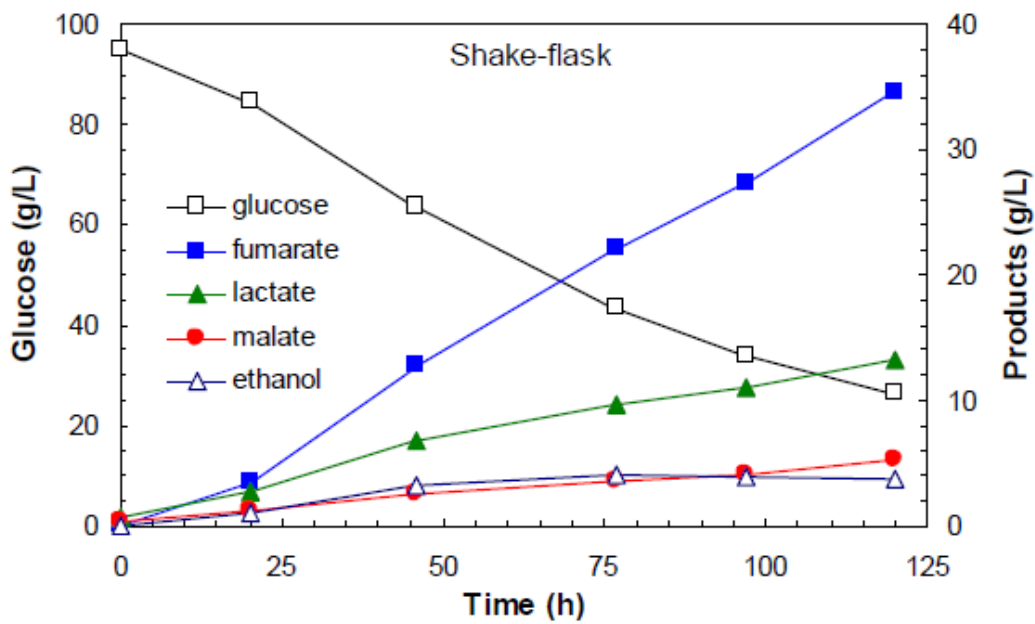
**Fonte:** Adaptado de Zhang (2012).

Apesar de as condições às quais os experimentos foram submetidos não serem iguais às reportadas por Rhodes (1962), os resultados obtidos pelo autor indicam possíveis sub-produtos encontrados durante fermentação com *Rhizopus*. Estes foram identificados como sendo etanol e os ácidos lático e málico (Figura 4.4).

Segundo o autor, a formação de quantidades expressivas de ácido lático condiz com o esperado, uma vez que este composto é formado em uma rota competidora à de ácido fumárico. O mesmo é válido para o etanol, porém sua formação pode ser minimizada com fornecimento suficiente de oxigênio, já que este é associado a uma rota de produção anaeróbia.

A presença destes sub-produtos também foi relatada por outros autores: em artigo publicado por Rhodes et al (1958), menciona-se que a produção de ácido fumárico com *Rhizopus* se dá conjuntamente com a formação de etanol e outros ácidos orgânicos. Por conta da quantidade expressiva em que tais sub-produtos podem ser encontrados, o autor cita ainda que a fermentação de AF não é necessariamente destinada à obtenção de um produto só.

**Figura 4.4. Resultados obtidos no experimento de Zhang (2012).**



Fonte: Zhang (2012).

Os rendimentos e concentrações finais apontados por Zhang (2012) foram adaptados aos dados anteriores para que o processo fermentativo pudesse ser simulado em sua forma mais completa. A correção foi feita com base na proporção entre o rendimento de sub-produtos  $Y_{spi/s}'$  e o rendimento de ácido fumárico  $Y_{p/s}'$  reportado por Zhang (2012) e o rendimento  $Y_{p/s}$  de Rhodes (1962), conforme exposto pela equação abaixo:

$$Y_{spi/s} = \frac{Y_{spi/s}'}{Y_{p/s}'} \cdot Y_{p/s} \quad (4.5)$$

Em que:

$Y_{spi/s}$ : coeficiente global de rendimento de substrato ao sub-produto  $i$  corrigido,  $\text{g}_{\text{sub-produto}}/\text{g}_{\text{substrato}}$ .

Observa-se que os coeficientes de rendimento dos sub-produtos foram calculados de maneira análoga ao demonstrado pela equação (3.1). Adicionalmente, aponta-se que a correção feita foi tida como razoável, uma vez que os experimentos conduzidos por Rhodes (1958) apontaram proporções praticamente constantes entre concentrações de AF e outros ácidos em fermentações com *Rhizopus*. Os rendimentos dos sub-produtos

calculados pelos dados de Zhang (2012), bem como aqueles retidos para a etapa de simulação, foram dispostos na Tabela 4.2.

**Tabela 4.2. Coeficientes de rendimento globais de sub-produtos – originais e corrigidos.**

Composto	$Y_{spi/s}$ - Zhang (2012)	$Y_{spi/s}$ - Corrigido
Ácido fumárico	0,529	-
Etanol	0,043	0,055
Ácido málico	0,086	0,11
Ácido láctico	0,2	0,256

**Fonte:** Acervo pessoal.

Para que a produção destes sub-produtos também fosse representada ao longo da fermentação, três equações adicionais precisariam ser incluídas aos balanços de massa, conforme ilustrado na equação a seguir. Esta representação simplificada se justifica pelo fato de que o interesse maior nos sub-produtos se encontra em suas concentrações finais, e não em seu perfil de formação ao longo da batelada.

$$\frac{dC_{spi}}{dt} = Y_{spi/s} \cdot \frac{dC_s}{dt} \quad (4.6)$$

Em que:

$C_{spi}$ : concentração do sub-produto  $i$ , g.L<sup>-1</sup>.

## 4.2 Simulação do processo fermentativo

### 4.2.1 Estudo do processo fermentativo em *Scilab*

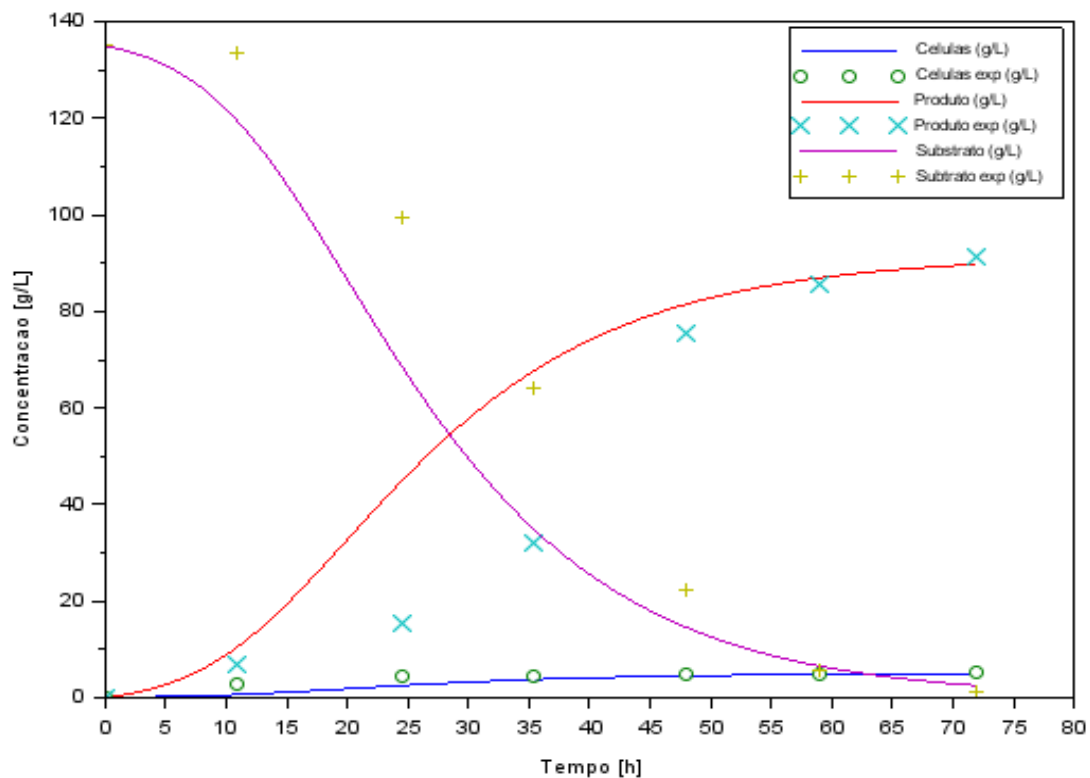
Na etapa de simulação do processo fermentativo de ácido fumárico, foram inseridas em uma rotina *Scilab* as expressões dos balanços de massa e formação de sub-produtos, modelos de crescimento celular e acúmulo de AF. Estas foram representadas pelas equações (3.3), (3.4), (3.6), (3.8), (4.1) e (4.3). As condições iniciais para resolução do sistema de EDOs também foram fornecidas, tendo estas sido compiladas na Tabela 4.3. O código escrito encontra-se em sua totalidade no Apêndice A, e os parâmetros utilizados no mesmo foram aqueles resumidos no Quadro 4.2 e na Tabela 4.2.

**Tabela 4.3. Condições iniciais fornecidas para resolução do sistema de EDOs.**

Componente	Concentração (g/L)
Glicose	135,00
Células	0,086
Ácido fumárico	0
Etanol	0
Ácido láctico	0
Ácido málico	0

**Fonte:** Acervo pessoal.

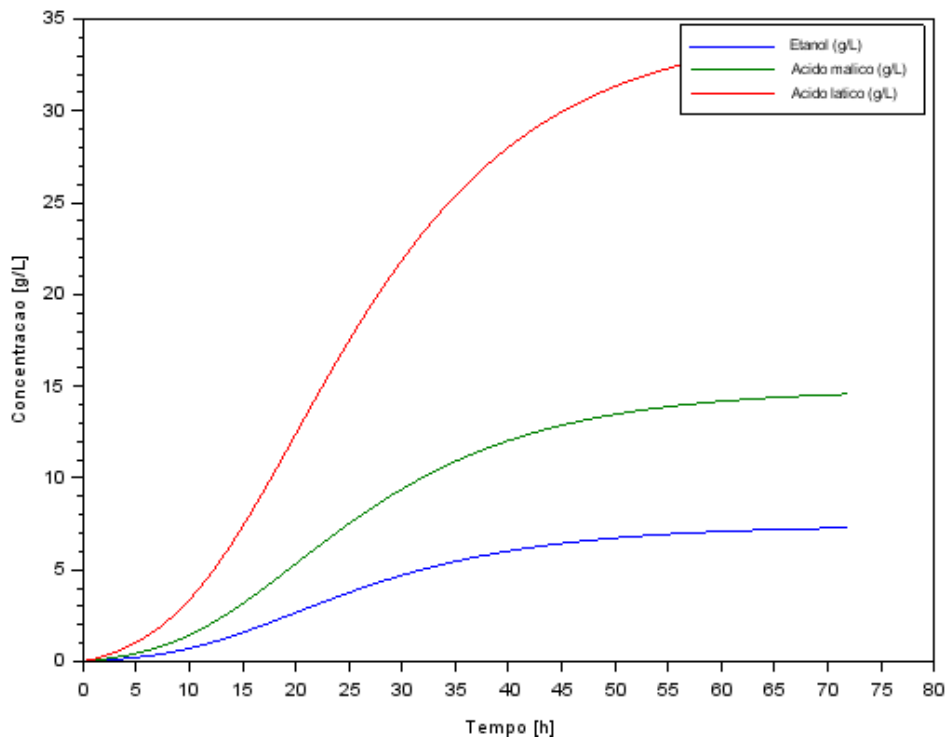
O código retornou os resultados na forma de gráficos de concentração ao longo do tempo, os quais foram reproduzidos nas Figuras 4.5-4.8. Os perfis de concentração dos sub-produtos foram apresentados em separado unicamente para tornar a visualização mais clara.

**Figura 4.5. Concentrações de substrato, células e ácido fumárico - modelo de Contois.**

**Fonte:** Acervo pessoal.



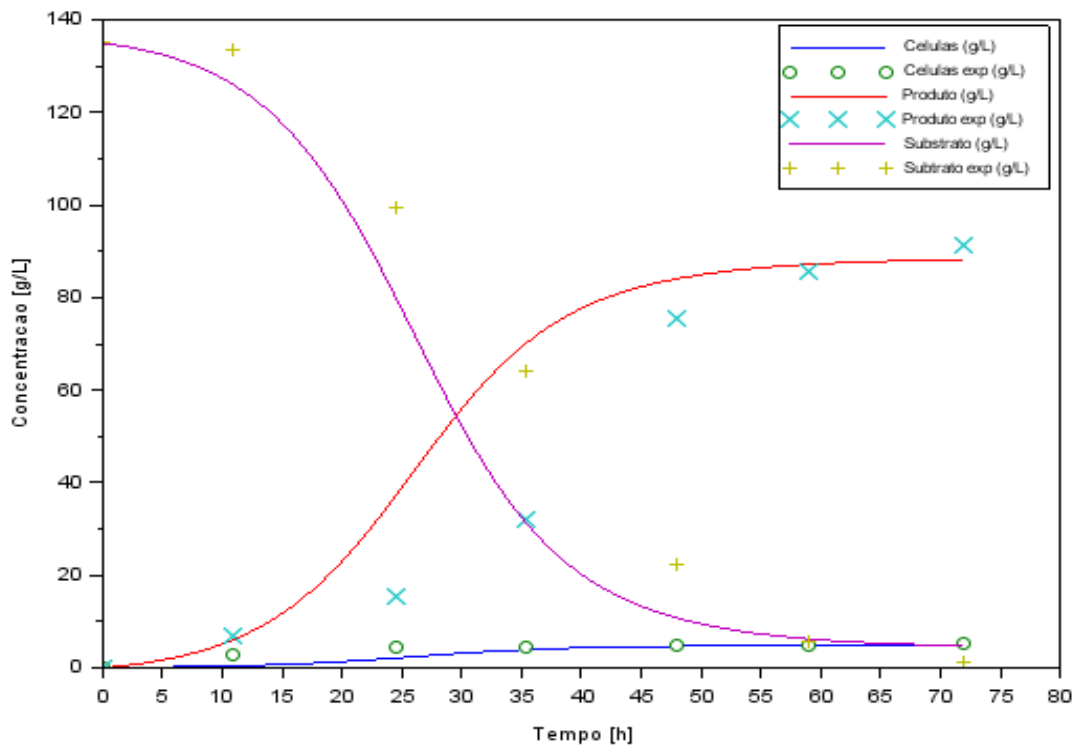
**Figura 4.6. Concentrações de sub-produtos - modelo de Contois.**



**Fonte:**

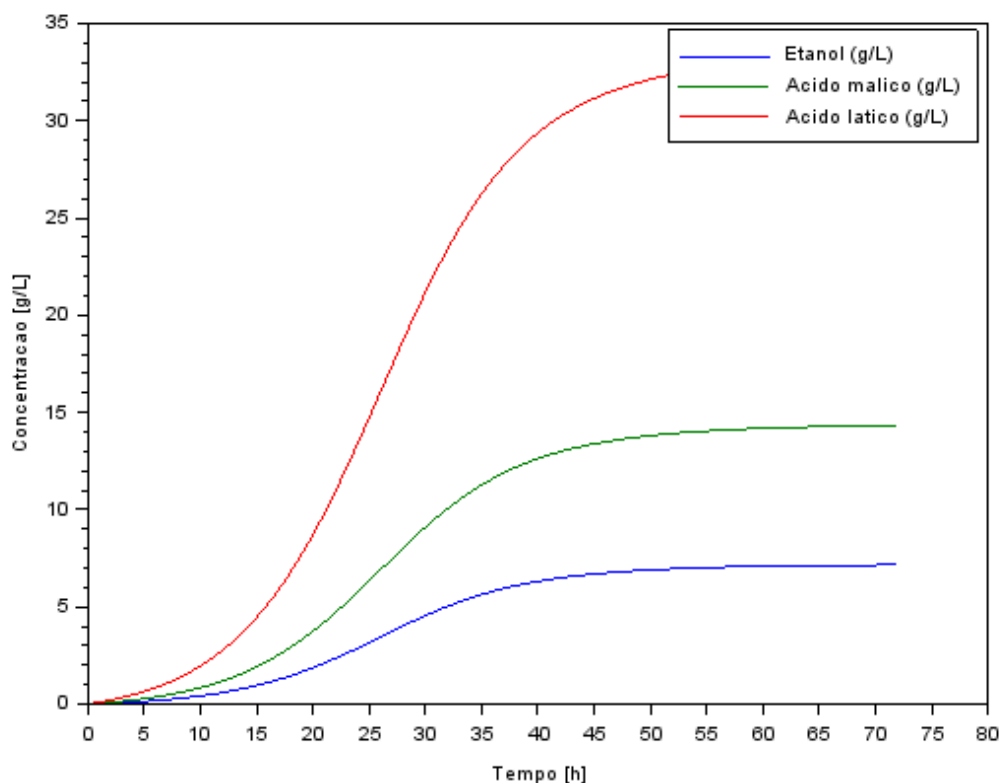
Acervo pessoal.

**Figura 4.7. Previsão das concentrações de substrato, células e ácido fumárico – modelo de Lee.**



**Fonte:** Acervo pessoal.

**Figura 4.8. Concentração de sub-produtos - modelo de Lee.**



**Fonte:** Acervo pessoal.

Os erros associados aos modelos de Contois e Lee na predição das concentrações finais de substrato, células e ácido fumárico foram calculados e dispostos no Quadro 4.4. Observa-se que os maiores erros foram aqueles relativos à concentração final de glicose, em ambos modelos, seguida pela previsão da concentração de células por Contois.

O erro alto associado ao substrato explica-se pelo baixo valor do mesmo, de modo que pequenas variações resultam em erros comparativamente grandes. Já a concentração final de células pelo modelo de Contois encontra-se distante do esperado ao observar os gráficos obtidos pelo *SimulaFerm* (Figura 4.2). Tal discrepância foi atribuída aos procedimentos de cálculos numéricos adotados pelos programas para resolução de EDOs.

**Quadro 4.4: Concentrações finais obtidas pela rotina em Scilab ( $C_f$ ) e erros relativos em comparação com valores experimentais ( $C_{exp}$ ).**

Componente	$C_{exp}$ (g/L)	Contois		Lee	
		$C_f$ (g/L)	Erro relativo	$C_f$ (g/L)	Erro relativo
Glicose	1,12	4,99	346%	4,9	338%
Ácido fumárico	91,2	89,72	2%	88,12	3%
Biomassa	5,2	2,54	51%	4,91	6%

**Fonte:** Acervo pessoal.

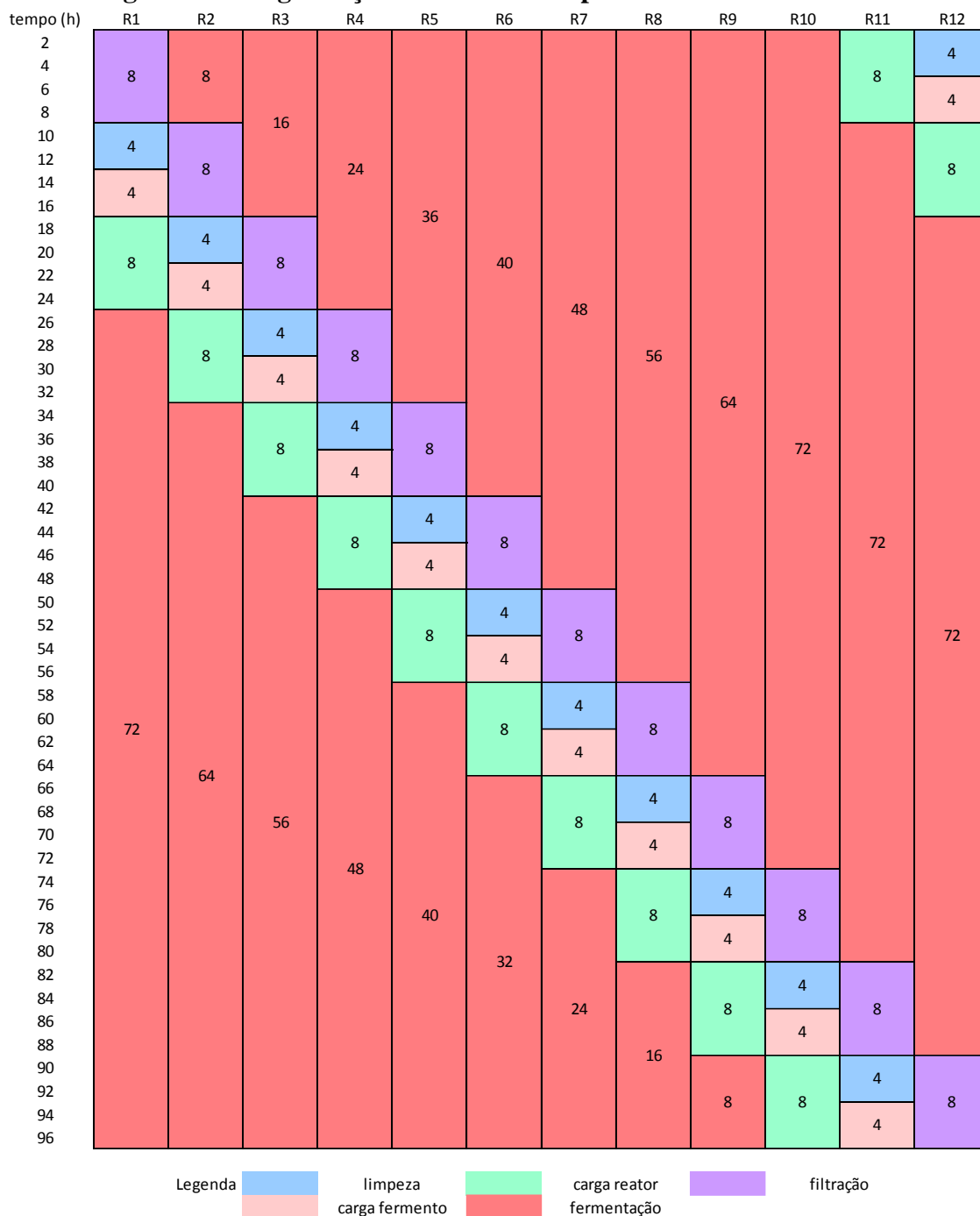
#### 4.2.2 Programação dos reatores

A programação do funcionamento dos fermentadores e operações auxiliares foi realizada previamente à integração da rotina em *Scilab* por influenciar o cálculo de vazões mássicas requeridas como *input* pelo simulador. Além disso, a etapa era importante para garantir que a unidade de *downstream* operasse de modo contínuo; para que isto ocorra, é necessário que um certo número de fermentadores funcione em paralelo, a fim de que a etapa posterior de separação esteja sempre recebendo a descarga de uma batelada.

Foram consideradas como operações auxiliares a carga de fermento ao reator - uma vez que em uma operação industrial as células seriam alimentadas antes da solução contendo substrato -, alimentação de substrato, descarga do fermentado, limpeza. O tempo destinado a cada um destes procedimentos, assim como aquele referente à separação de células, foi ajustado de modo que sempre existisse um reator em processo de descarga.

A escala planejada foi ilustrada na Figura 4.9, sendo os blocos azuis a limpeza do reator, rosa claro a carga de fermento, verde a alimentação dos reatores, rosa escuro a fermentação, e roxo a etapa de separação de células. Dentro de cada bloco foi escrito o tempo em horas pertinente a cada operação.

**Figura 4.9. Programação dos reatores e procedimentos auxiliares.**



**Fonte:** Acervo pessoal.

Com isso, tem-se que seria necessário operar com doze fermentadores em paralelo para que as etapas de separação funcionassem em modo contínuo. Este elevado número, bem como o tempo estendido dos processos de carga e descarga, foi significativamente influenciado pela duração da fermentação de ácido – aproximadamente três vezes superior ao tempo consumido para obtenção de etanol, à título de comparação.

### 4.2.3 Integração da rotina em *Scilab* ao *COCO*

Uma vez verificado que a rotina em *Scilab* fornecia resultados coerentes com os esperados, a mesma foi devidamente adaptada para a integração com o *COCO*; o script contendo as modificações realizadas também se encontra no Apêndice A. Além da adaptação do código, foi necessário organizar em um arquivo os componentes químicos presentes na fermentação, já que a maioria deles não se encontrava presente na biblioteca do *software*. Tal configuração foi realizada através da interface do *ChemSep*, conforme detalhado por Ribeiro (2018).

Inicialmente, considerou-se que todos os compostos mencionados por Zhang (2012) e Rhodes (1962) seriam adicionados, sendo eles: água, etanol, biomassa, glicose e os ácidos fumárico, málico e lático em suas respectivas formas de sais de cálcio. Destes, somente água e etanol estavam previamente definidos, de modo que para todos os demais seria preciso inserir dados de CAS, SMILES, família, estrutura, peso molecular, e densidade.

Ao configurar os dados básicos sobre os componentes, também deveriam ser preenchidos os campos relativos aos grupos funcionais; i.e., quantos grupos hidroxila, por exemplo, estão presentes na molécula. Isso é realizado para que o *software* consiga estimar as propriedades termodinâmicas ausentes, como parâmetros de interação binária, através do método UNIFAC.

Entretanto, ao configurar as propriedades dos sais orgânicos, verificou-se que não era possível contabilizar os íons de cálcio como grupos, já que os mesmos não eram reconhecidos como opção. Esta deficiência inviabilizaria a estimativa de propriedades ausentes, de modo que todos os parâmetros de interação binária precisariam ser fornecidos com base em dados experimentais.

Sabendo da dificuldade de encontrar tais dados em literatura, optou-se por representar a fermentação de ácido fumárico de forma simplificada, desconsiderando que os ácidos estariam presentes na forma de sais. Assim, foram inseridos no banco de dados os seguintes componentes: glicose, biomassa e os ácidos fumárico, málico e lático; as informações requeridas para cada um dos compostos foram organizadas nos Quadros 4.5 e 4.6. Ainda, observa-se que para biomassa foram utilizadas as informações referentes à *Saccharomyces cerevisiae*, em virtude da falta de dados para *Rhizopus arrhizus*.

**Quadro 4.5. Propriedades fornecidas para biomassa e glicose.**

Composto	Biomassa	Glicose
CAS	84604-16-0	50-99-7
SMILES	-	OCC1OC(O)C(O)C(O)C1O
Peso molecular (g/gmol)	23,82	180,16
Estrutura	CH <sub>1,66</sub> O <sub>0,52</sub> N <sub>0,13</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
Família	Sólido apenas	-
Densidade (kmol/m <sup>3</sup> )	45,78	8,6

Fonte: PubChem (2018), Ribeiro (2018).

**Quadro 4.6. Propriedades fornecidas para os ácidos fumárico, láctico e málico.**

Composto	Ácido fumárico	Ácido láctico	Ácido málico
CAS	110-17-8	50-21-5	6915-15-7
SMILES	C(=CC(=O)O)C(=O)O	CC(C(=O)O)O	C(C(C(=O)O)O)C(=O)O
Peso molecular (g/gmol)	116,07	90,00	134,09
Estrutura	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>
Família	Orgânicos polifuncionais	Ácidos alifáticos	Orgânicos polifuncionais
Densidade (kmol/m <sup>3</sup> )	14,09	13,4	12

Fonte: PubChem (2018).

Entende-se que o procedimento levou à perda de informações essenciais para a simulação das etapas de *downstream*, de modo que o estudo sobre o processo se limitou à integração do código em *Scilab* ao *COCO*, e à etapa de separação de células por filtração. Caso os sais orgânicos tivessem sido inseridos, na filtração seriam retidas também as frações de sais precipitados durante a fermentação, visto que os mesmos são pouco solúveis em água.

Outra ocorrência observada durante configuração das propriedades termodinâmicas foi que, mesmo optando pela estimativa de propriedades ausentes, o *software* não calculou parâmetros de interação binária necessários para uso de equações como UNIQUAC, NRTL ou Wilson na simulação. Por conta disso, os únicos modelos termodinâmicos viabilizados foram as equações de estado Peng-Robinson e Soave-Redlich-Kwong.

Novamente, sabe-se que a escolha do modelo termodinâmico adequado é fundamental para a obtenção de resultados representativos da realidade. Os modelos UNIQUAC, Wilson e NRTL citados são os mais empregados para descrever soluções líquidas não-ideais em que se tem mistura de compostos quimicamente distintos. As

equações de estado cúbicas, por outro lado, são mais apropriadas para descrição de sistemas em equilíbrio líquido-vapor, em particular aqueles compostos por uma substância pura, ou por mistura de compostos simples e quimicamente semelhantes entre si (SMITH ET AL, 2007).

Adicionalmente, também foi observado que, em testes realizados com os componentes, certas frações mássicas de glicose em mistura com água estavam supostamente associadas à formação de soluções em fase vapor em condições ambientes de temperatura e pressão. Por conta desta incoerência, propriedades físicas adicionais foram fornecidas ao banco de dados, como pressão crítica e tensão superficial líquida. O conjunto de parâmetros extras foi compilado no Quadro 4.7. Devido a estes ocorridos, reforça-se a opção por simular apenas a etapa de fermentação de ácido fumárico em detrimento do processo como um todo.

**Quadro 4.7. Informações adicionais fornecidas sobre glicose.**

<b>Temperatura crítica (K)</b>	1034,02
<b>Pressão crítica (Pa)</b>	6,63. 10 <sup>6</sup>
<b>Volume crítico (m<sup>3</sup>/kmol)</b>	0,46
<b>Fator de compressibilidade</b>	0,35
<b>Ponto de ebulição normal (K)</b>	844,48
<b>Ponto de fusão (K)</b>	423,00
<b>Fator acêntrico</b>	2,47
<b>Entalpia de formação de Gibbs (J/kmol)</b>	793,00
<b>Calor de formação (J/kmol)</b>	1035,02
<b>Tensão superficial (N/m)</b>	0,07

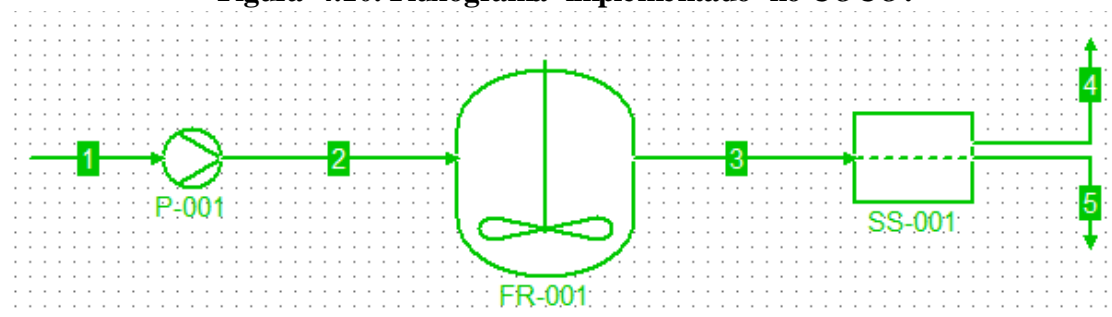
**Fonte:** PubChem, NIST WebBook (2018).

Passadas as etapas de inserção de componentes e propriedades termodinâmicas, prosseguiu-se com a configuração do fluxograma de processo (Figura 4.10). Nesta etapa, utilizou-se a rotina em *Scilab* referente ao modelo de crescimento celular de Lee, uma vez que o mesmo apresentava os menores erros relativos associados à concentração final de células. As operações unitárias simuladas para representar a fermentação de ácido fumárico foram, além do biorreator customizado (FR-001), uma bomba para alimentação (P-001), e um separador de células (SS-001).

Para a bomba, considerou-se um aumento de pressão de 2 bar, enquanto para o SS-001 foi imposta uma separação de 95% das células presentes na corrente 2. Este item, simulado como um bloco genérico no *COCO*, representa um filtro de tambor rotativo,

utilizado em separações de micélios e outros fungos filamentosos, como no caso da produção de ácido cítrico.

**Figura 4.10. Fluxograma implementado no COCO.**



**Fonte:** Acervo pessoal.

As vazões mássicas de alimentação da bomba P-001 foram calculadas conforme equação (3.10), tendo sido fornecidas ao simulador como disposto na Tabela 4.4. O volume dos fermentadores considerado na análise foi de 300 m<sup>3</sup>, sendo utilizado 85% da capacidade total para enchimento com líquido, e um tempo de alimentação de 8 horas, segundo abordado na seção 4.3.1.

**Tabela 2.4. Vazões e frações mássicas (FM) de alimentação da bomba P-001 (corrente 1).**

Componente	Vazões entrada (kg/hr)	FM
Água	22465,26	0,88
Glicose	3032,81	0,12
Ácido fumárico	0	0
Etanol	0	0
Ácido málico	0	0
Ácido láctico	0	0
Células	1,93	$7,58 \cdot 10^{-5}$

**Fonte:** Acervo pessoal.

As demais vazões mássicas foram calculadas pelo próprio *software*, tendo sido reproduzidas no Quadro 4.8. Nesta também foram dispostas informações sobre temperatura e pressão das correntes, bem como fração mássica dos componentes presentes.

**Quadro 4.8. Balanços de massa.**

Corrente	1	2	3	4	5
----------	---	---	---	---	---



<b>Temperatura (°C)</b>	33	33,01	33,01	33,01	33,01
<b>Pressão (bar)</b>	1	3	3	3	3
<b>Vazão mássica (kg/h)</b>					
Água	28081,57	28081,57	27007,81	2700,78	24307,03
Glicose	3791,01	3791,01	155,99	15,60	140,39
Ácido fumárico	0	0	2809,08	280,91	2528,18
Etanol	0	0	228,10	22,81	205,29
Ácido málico	0	0	456,19	45,62	410,57
Ácido láctico	0	0	1061,67	106,17	955,50
Células	2,42	2,42	156,17	148,36	7,81
<b>Fração mássica</b>					
<b>Corrente</b>	1	3	2	5	4
Água	0,88	0,88	0,85	0,85	0,85
Glicose	0,12	0,12	$4,92 \cdot 10^{-3}$	$4,92 \cdot 10^{-3}$	$4,92 \cdot 10^{-4}$
Ácido fumárico	0	0	$8,86 \cdot 10^{-2}$	$8,86 \cdot 10^{-2}$	$8,86 \cdot 10^{-3}$
Etanol	0	0	$7,19 \cdot 10^{-3}$	$7,19 \cdot 10^{-3}$	$7,19 \cdot 10^{-4}$
Ácido málico	0	0	$1,43 \cdot 10^{-3}$	$1,43 \cdot 10^{-3}$	$1,44 \cdot 10^{-3}$
Ácido láctico	0	0	$3,35 \cdot 10^{-2}$	$3,35 \cdot 10^{-2}$	$3,35 \cdot 10^{-2}$
Células	$7,58 \cdot 10^{-5}$	$7,58 \cdot 10^{-5}$	$4,91 \cdot 10^{-3}$	$4,93 \cdot 10^{-4}$	$2,74 \cdot 10^{-4}$

**Fonte:** Acervo pessoal.

### 4.3 Avaliação econômica

Para esta etapa, foram levantados os custos de glicose, ácido fumárico, etanol, ácido málico e ácido láctico, os quais foram organizados na Tabela 4.5. Também se encontram na tabela a quantidade de glicose necessária para obter 4.895,1 ton/ano de ácido fumárico – correspondente à média das importações anuais nos últimos dez anos -, e o total de sub-produtos obtidos a partir da mesma. Para cálculos, foram utilizados os coeficientes de rendimento globais.

**Tabela 4.3. Custos unitários de matéria-prima e sub-produtos, quantidade consumida ou produzida dos mesmos, despesas e lucros obtidos.**

<b>Componente</b>	<b>Preço (U\$/kg)</b>	<b>Quantidade (ton/ano)</b>	<b>Custo (U\$/ano)</b>
Glicose	0,81	7.241,21	-5.865.381,72
Ácido fumárico	1,88	4.895,06	9.202.710,92
Etanol	0,91	463,44	421.728,12
Ácido málico	9,49	796,53	7.559.101,02
Ácido láctico	2,07	1.853,75	3.837.262,50
<b>Lucro (U\$/ano)</b>			<b>15.155.420,84</b>

**Fonte:** Comex Stat (2018).

Considerou-se que todos os sub-produtos obtidos poderiam ser recuperados e vendidos juntamente com o ácido fumárico. Essa hipótese foi considerada razoável, uma vez que os sub-produtos gerados encontram aplicações, por exemplo, como solventes (etanol), acidulantes (ácido málico) e material de partida para fabricação de polímeros (ácido láctico). Subtraindo-se o custo requerido para compra de matéria-prima da receita proveniente das vendas, obteve-se que uma planta de AF geraria um lucro bruto de aproximadamente U\$ 15,2 milhões por ano.

Quanto aos equipamentos, conforme explicitado na seção 3.3, um dado de importância para levantamento do custo são suas dimensões características. Para os fermentadores, esta dimensão é o volume, enquanto para a bomba é a potência, e para os filtros rotativos é a área requerida para filtração. O volume de 300 m<sup>3</sup> dos fermentadores foi definido como premissa de projeto, e a potência da bomba foi obtida através do *COCO* como sendo 1.739 W por reator.

Por se tratar de um bloco genérico, e não especificamente de um filtro, o *COCO* não forneceu para este item uma estimativa da área necessária para realizar a separação de células. Desta forma, a fim de obter um dimensionamento preliminar para o equipamento, o mesmo foi isoladamente simulado no *software SuperPro Designer*, simulador de processos bem conhecido por conter operações e ferramentas voltadas à área de biotecnologia industrial.

A área máxima do tambor foi considerada como 100 m<sup>2</sup>, dimensão comumente encontrada em usinas de etanol, para filtração de lodo dos decantadores e recuperação. Segundo resultados obtidos, seria necessária uma unidade de 86 m<sup>2</sup> para processar toda a vazão mássica descarregada pelo fermentador em 8 horas.

Custos de referência de filtro rotativo e fermentadores foram levantados a partir de dados disponíveis no site “Matches”, com base no ano de 2014. Os custos obtidos foram corrigidos pela relação (3.11) e pelo CEPCI conforme equação (3.12). O preço da bomba foi obtido diretamente a partir de gráfico fornecido por Garrett (1989), uma vez que o site exigia além da potência o dimensionamento da descarga.

Os fatores de escala, custos e dimensões características de referência para cada um dos equipamentos simulados, bem como os índices CEPCI, foram dispostos no Quadro 4.9 e na Tabela 4.6. O total de capital a ser investido foi obtido após correção

com os índices foi equivalente a aproximadamente 7,99 milhões de dólares, somente para a seção de fermentação (Tabela 4.7).

**Quadro 4.9. Dimensões características  $S$ , fatores de escala  $n$ , custos de referência  $C_1$  e custos calculados  $C_2'$  para os equipamentos nos respectivos anos base.**

Equipamento	P-001	FR-001	SS-001
$S_1$	-	37,9	800 ft <sup>2</sup>
$S_2$	1.739 W	300 m <sup>3</sup>	926 ft <sup>2</sup>
$n$	-	0,40	0,60
$C_1$ (US\$)	-	256.600	444.900
$C_2'$ (US\$)	46.800	587.015,4	485.707,7

Fonte: Sinnott (1999), Garrett (1989).

**Tabela 4.6. Índices CEPCI utilizados nos cálculos.**

Ano	CEPCI
1989	355,4
2014	576,1
2018 (junho)	605,2

Fonte: Chemical Engineering Magazine (2018).

**Tabela 4.7. Custos corrigidos pela inflação ( $C_2$ ), número de unidades requeridas e custo total de investimento.**

Equipamento	$C_2'$ (US\$)	$C_2$ (US\$)	Unidades	Total
P-001	46.800	79.694,32	1	79.694,32
FR-001	587.015,40	616.666,70	12	7.400.000,70
SS-001	485.707,70	510.241,82	1	510.241,82
			<b>Soma</b>	<b>7.989.936,83</b>

Fonte: Acervo pessoal.

Reforça-se que não foram considerados na análise o custo dos demais equipamentos presentes no processo, uma vez que a seção de *downstream* não foi simulada. Também não estão presentes nesta avaliação preliminar os gastos variáveis de operação, relativos ao consumo de utilidades pela planta, tais quais eletricidade, água de resfriamento e vapor. Quando incluídos, certamente aumentariam de forma significativa os custos de capital.

Apesar destes fatores, nota-se pela receita bruta calculada que a fermentação de ácido fumárico se configura, a princípio, como um processo economicamente interessante. Mesmo com a dúvida remanescente sobre a viabilidade de implementar o

processo em escala comercial, decorrente de as etapas de purificação não terem sido simuladas, observa-se que há margem para redução dos custos de capital com estudos sobre otimização que levassem a maiores rendimentos de fermentação. Ainda, existe a possibilidade de se aumentar a eficiência do processo como um todo – Cao et al (1996), por exemplo, aponta que o uso de reatores do tipo RBC (*Rotary Biofilm Contactor*) acoplado à recuperação simultânea de ácido por colunas de adsorção levaria a um aumento de produtividade e número de equipamentos reduzido.

## 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Através da metodologia proposta, foi possível avaliar com maior profundidade diversos aspectos de importância ao se considerar a produção de ácido fumárico via fermentação. Nota-se que uma questão bastante significativa é ainda a dificuldade de obter, ao mesmo tempo, elevadas produtividade, concentração final de produto e rendimento. Este fator representa uma das maiores desvantagens quando se considera a competitividade do bio-produto em comparação com o equivalente derivado de matérias-primas fósseis.

Também se aponta como desafio as operações de *downstream*, as quais diferem dos métodos tradicionais para recuperação de outros ácidos orgânicos. Somado ao ponto anterior, isso pode explicar em parte porque o succínico ganhou tanto interesse na última década, enquanto o ácido fumárico, de estrutura semelhante, não foi ainda tão explorado.

Em relação aos procedimentos empregados para análise do processo, observa-se que os *softwares* escolhidos tiveram papel fundamental na análise, desde a escolha dos modelos cinéticos de Contois e Lee até a simulação do processo em batelada. Uma grande vantagem se encontra no fato de que, dos quatro programas mencionados ao longo do trabalho, três são de instalação livre, de modo que os mesmos se configuram como ferramentas muito úteis para pesquisas acadêmicas.

Nesse contexto, destaca-se a versatilidade do *COCO* no que diz respeito à possibilidade de implementar modelos customizados em interface com o *Scilab*. Em contrapartida, percebe-se que a maior desvantagem do simulador é a biblioteca limitada de dados, que inviabilizou a síntese das operações de *downstream*.

Com relação à avaliação econômica preliminar, ressalva-se que, em virtude de as operações de separação e purificação não terem sido simuladas, não foi possível estimar os custos de capital relativos às mesmas. Também foram desconsiderados os custos variáveis de operação, instalação e manutenção de equipamentos, por se tratar de uma etapa conceitual de projeto. Sabe-se que estas despesas impactam de maneira significativa o investimento a ser realizado na planta, de modo que talvez se configurassem como entraves à implementação do processo.

Apesar das dificuldades mencionadas, ressalta-se que a produção de ácido fumárico por fermentação se constitui, a princípio, como uma rota economicamente interessante. Ao se considerar uma produção de 4900 ton/ano, a análise econômica

preliminar estava associada a um lucro bruto de aproximadamente U\$ 16 milhões. Com relação aos equipamentos, verificou-se que a área de fermentação precisaria operar com doze reatores de 300 m<sup>3</sup> em paralelo, em conjunto com pelo menos uma bomba e um filtro rotativo. Estes itens foram cotados como um investimento inicial próximo a U\$ 7,99 milhões.

Para trabalhos futuros em simulação, sugere-se primeiramente a busca por informações mais acuradas com relação aos dados físico-químicos, a fim de que o uso do *software COCO* para as etapas de *downstream* seja viável. Também se propõem estudos sobre técnicas mais eficazes para isolamento e purificação do ácido fumárico, a fim de reduzir os custos associados a esta etapa. Em caso de trabalhos experimentais, sugere-se analisar a possibilidade de empregar outros agentes neutralizantes durante a fermentação, também com objetivo de otimizar as etapas de separação e purificação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASF. **Succinity produces first commercial quantities of biobased succinic acid.** <  
<https://www.basf.com/en/company/news-and-media/news-releases/2014/03/p-14-0303-ci.html>>. Acessado em: junho de 2018.

BIOFUELS DIGEST. **The DOE's 12 top biobased molecules – what became of them?**  
 <  
<http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2015/04/30/the-does-12-top-biobased-molecules-what-became-of-them/>>. Acessado em: junho de 2018.

BIOFUELS DIGEST. **Genomatica bio-BDO process reaches 10K tons as Novamont says “A-OK” on new plant.** <  
<https://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2017/06/28/genomatica-bio-bdo-process-reaches-10k-tons-as-novomont-says-a-ok-on-new-plant/>>. Acessado em: junho de 2018.

CAO, N., DU, J., GONG, C. S., TSAO, G. T. **Simultaneous production and recovery of fumaric acid from immobilized *Rhizopus oryzae* with a Rotary biofilm contactor and adsorption column.** Applied Microbiology Biotechnology, 62 (8), 2926-2931, 1996.

CHEMICAL ENGINEERING MAGAZINE. **Economic indicators.** Issue 928, outubro de 2018.

COMEX STAT. **Portal do Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços.** <  
<http://comexstat.mdic.gov.br/pt/home>>. Acessado em: novembro de 2018.

DAS, R. K. **Fumaric acid: production and application aspects.** Platform Chemical Biorefinery, 133-157, 2016.

DAS, R. K., BRAR, S. K. **Enhanced fumaric acid production from brewery wastewater and insight into the morphology of *Rhizopus oryzae* 1526.** Applied Microbiology Biotechnology, 172, 2974-2988, 2014.

DUPONT TATE & LYLE BIOPRODUCTS. **US 100 million plant is the world's first to produce propanediol from corn glucose.** <  
[http://www.duponttateandlyle.com/news\\_112706](http://www.duponttateandlyle.com/news_112706)>. Acessado em: junho de 2018.

JONG, E., HIGSON, A., WALSH, P., WELLSCH, M. **Bio-based chemicals: value added products from biorefineries.** IEA Bioenergy – Task 42 Biorefinery, 2011.

KRISTIASSEN, B., MATTEY, M., LINDEN, J. **Citric acid biotechnology.** Taylor and Francis, 1st edition, 1999.

- LEE, J. M. POLLARD, J. F., COULMAN, G. A. **Ethanol fermentation with cell recycling: computer simulation.** *Biotechnology and Bioengineering.* 25 (2), 497-511, 1983.
- MARTIN-DOMINGUEZ, V., ESTEVEZ, J., OJEMBARRENA, F. B., SANTOS, V. E., LADERO, M. **Fumaric acid production: a biorefinery perspective.** *Fermentation.* 4, 33, 2018.
- MATCHES. **Conceptual process, cost and optimization engineering services.** <<http://www.matche.com/equipcost/Exchanger.html>>. Acessado em: novembro de 2018.
- NIST WEBBOOK. **National Institute of Standards and Technology.** <<https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C50997&Type=THZ-IR-SPEC&Index=0>>. Acessado em: novembro de 2018.
- OLIVEIRA, C. M., JESUS, C. D. F., SILVA, F. H., CENEVIVA, L. V. S., CRUZ, A. J. G., COSTA, C. B. B., BADINO, A. C. **Arquivo de ajuda *OptimusFerm***, disponível juntamente com o *software*, 2015a.
- OLIVEIRA, C. M., JESUS, C. D. F., SILVA, F. H., CENEVIVA, L. V. S., CRUZ, A. J. G., COSTA, C. B. B., BADINO, A. C. **Arquivo de ajuda *SimulaFerm***, disponível juntamente com o *software*, 2015b.
- OLIVEIRA, C. M., JESUS, C. D. F., SILVA, F. H., CRUZ, A. J. G., COSTA, C. B. B., BADINO, A. C. **AnabioPlus: a new package for parameter estimation and simulation of bioprocesses.** *Brazilian Journal of Chemical Engineering.* 34 (4), 1065-1082, 2017.
- PUBCHEM. **Open chemistry database.** <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-glucose>>. Acessado em: novembro de 2018.
- RIBEIRO, C. T. **Simulação do processo de separação do xilitol proveniente da rota biotecnológica de fermentação da xilose utilizando os softwares livres *COCO* e *Scilab*.** Trabalho de Graduação, Universidade Federal de São Carlos, 2018.
- RHODES, R. A., MOYER, A. J., SMITH, M. L., KELLEY, S. E. **Production of fumaric acid by *Rhizopus arrhizus*.** *Applied Microbiology.* 7 (2), 74-80, 1958.
- RHODES, R. A., LAGODA, A. A., SMITH, M. L., ANDERSON, R. F., JACKSON, R. W. **Production of fumaric acid in 20-L fermenters.** *Applied Microbiology.* 10, 9-15, 1962.
- SINNOTT, R. K. **Coulson and Richardson's Chemical Engineering Design.** Butterworth Heinemann, vol 6, 3rd edition, 2003.



SMITH, J. M., VAN NESS, H. C., ABBOTT, M. M. **Introdução à termodinâmica para engenharia química**. McGraw-Hill, 7ª edição, 2007.

STRAATHOF, A. J. J, ROA, C. A. E., ZIJMANS, T. W., GULIK, W. M., WIELEN, L. A. M. **Fumaric acid production from fermentation**. Applied Microbiology Biotechnology. 78, 379-389, 2008.

WANG, Z., LI, Y. **A theoretical derivation of the Contois equation for kinetic modeling of the microbial degradation of insoluble substrates**. Biochemical Engineering Journal. 82, 134-138, 2014.

WERP, T., PETERSEN, G. **Top value added chemicals from biomass – volume I**. Pacific Northwest National Laboratory and National Renewable Energy Laboratory, 2004.

XU, Q., LI, S., HUANG, H., WEN, J. Key technologies for the industrial production of fumaric acid by fermentation. Biotechnology Advances. 30, 1685-1696, 2012.

ZHANG, K. **Fumaric acid fermentation by *Rhizopus oryzae* with integrated separation technologies**. Dissertação de doutorado, Ohio State University, 2012.

ZHOU, Y. **Fumaric acid fermentation by *Rhizopus oryzae* in submerged systems**. Dissertação de doutorado, Purdue University, 1999.

## APÊNDICE A

### A1) Código em Scilab – modelo de Lee

```

clear;
clc;

//-----SIMBOLOS E NOMENCLATURA-----
//Ks = constante de Lee [g/L]
//up = velocidade especifica de producao de acido fumarico [h-1]
//Yps = rendimento global de substrato a produto [g/g]
//Yxs = rendimento global de substrato a celulas [g/g]
//ux = velocidade especifica de crescimento celular [h-1]
//umax = maxima velocidade especifica de crescimento celular [h-1]
//Ccrit* = concentracao critica a partir da qual cessa crescimento celular [g/L]
//m = parametro cinetico de crescimento celular [-]
//A = parametro cinetico da formacao de produto [-]
//B = parametro cinetico da formacao de produto [h-1]
//y(1) = concentracao de celulas [g/L]
//y(2) = concentracao de acido fumarico [g/L]
//y(3) = concentracao de substrato [g/L]
//y(4) = concentracao de etanol [g/L]
//y(5) = concentracao de acido malico [g/L]
//y(6) = concentracao de acido latico [g/L]
//f(1) = variacao da concentracao de celulas com o tempo [g/L.h]
//f(2) = variacao da concentracao de acido fumarico com o tempo [g/L.h]
//f(3) = variacao da concentracao de substrato com o tempo [g/L.h]
//f(4) = variacao da concentracao de etanol com o tempo [g/L.h]
//f(5) = variacao da concentracao de acido malico com o tempo [g/L.h]
//f(6) = variacao da concentracao de acido latico com o tempo [g/L.h]

//-----DEFINIÇÃO DAS FUNÇÕES-----

function [f]=fun(t, y, umax, Ks, Ccrit, m, A, B, Yxs, Yps, YET, YAM, YAL)

//Modelo da taxa de crescimento celular
//Equacao de Lee
//ux=umax*(Cs/(Ks*Cs+Cs))*(1-Cx/Cx*)^m
ux=umax*(y(3,:)/(Ks+y(3,:)))*(1-y(1,:)/Ccrit)^m;
//Taxa de crescimento celular
//dCx/dt = rx = ux.Cx
f(1)=ux*y(1,:);

//Producao de acido fumarico

```

```

//Velocidade especifica de formacao de produto
//Produto parcialmente associado ao crescimento celular
//up = A.ux + B
up=A*ux+B;
//Taxa de producao de AF
//dCp/dt = rp = up*Cx
f(2) = up*y(1,:);

//Taxa de consumo de glicose
//dCs/dt = -ux*Cx/Yx
f(3)= -(1/Yxs)*f(1);

//Formacao de sub produtos
//Etanol
//dCsp/dt=Yps.dCs/dt
f(4)=- YET*f(3);
//Acido malico
f(5)=- YAM*f(3);
//Acido latico
f(6)=- YAL*f(3);
endfunction

//-----PROGRAMA PRINCIPAL-----
//PARAMETROS
//Lee
umax=0.25;
Ks=90.0;
Ccrit=4.9;
m=0.5;
//Producao AF e subprodutos
A=18.27;
B=0.0008;
Yxs=0.037;
Yps=0.676;
YET=0.055;
YAM=0.11;
YAL=0.256;
//Condicoes iniciais
t0=[0.0];
y0=[0.086;0.0;135.0;0;0;0];
t=[0:0.05:71.9];
flist=list(fun,umax,Ks,Ccrit,m,A,B,Yxs,Yps,YET,YAM,YAL);
y=ode(y0,t0,t,flist);
tempofinal=length(t);

disp(y(1,tempofinal));
disp(y(2,tempofinal));
disp(y(3,tempofinal));
disp(y(4,tempofinal));
disp(y(5,tempofinal));

```

```
disp(y(6,tempofinal));
```

```
//-----GRÁFICOS-----
clf;
//Dados do modelo x Dados experimentais
//Dados experimentais
t_cel=[0 10.9 24.6 35.3 48 59 71.9];
c_cel=[0 2.86 4.6 4.63 4.85 4.9 5.1];
t_sub=[0 10.9 24.6 35.3 48 59 71.9];
c_sub=[135 133.7 99.6 64.3 22.2 5.6 1.12];
t_AF=[0 10.9 24.6 35.3 48 59 71.9];
c_AF=[0 7.01 15.6 31.9 75.6 85.5 91.2];

subplot(221)
plot(t,y(1,:),'- ',t_cel,c_cel,'o',t,y(2,:),'- ',t_AF,c_AF,'x',t,y(3,:),'- ',t_sub,c_sub,'+');
xlabel("Tempo [h]");
ylabel("Concentracao [g/L]");
xtitle("Variacao das concentracoes com o tempo");
hl=legend(["Celulas (g/L)";"Celulas exp (g/L)";"Produto (g/L)";"Produto exp (g/L)";"Substrato (g/L)";"Subtrato exp (g/L)"]);

subplot (222)
plot(t,y(4,:),t,y(5,:),t,y(6,:));
xlabel("Tempo [h]");
ylabel("Concentracao [g/L]");
xtitle("Variacao das concentracoes com o tempo");
h2=legend(["Etanol (g/L)";"Acido malico (g/L)";"Acido latico (g/L)"]);
```

## A2) Código em Scilab – modelo de Contois

```
clear;
clc;
```

```
//-----SIMBOLOS E NOMENCLATURA-----
//Ksx = constante de Contois [g/L]
//up = velocidade especifica de producao de acido fumarico [h-1]
//Yps = rendimento global de substrato a produto [g/g]
//Yxs = rendimento global de substrato a celulas [g/g]
//ux = velocidade especifica de crescimento celular [h-1]
//umax = maxima velocidade especifica de crescimento celular [h-1]
//A = parametro cinetico da formacao de produto [-]
//B = parametro cinetico da formacao de produto [h-1]
//y(1) = concentracao de celulas [g/L]
//y(2) = concentracao de acido fumarico [g/L]
//y(3) = concentracao de substrato [g/L]
//y(4) = concentracao de etanol [g/L]
//y(5) = concentracao de acido malico [g/L]
//y(6) = concentracao de acido latico [g/L]
//f(1) = variacao da concentracao de celulas com o tempo [g/L.h]
```

```
//f(2) = variacao da concentracao de acido fumarico com o tempo [g/L.h]
//f(3) = variacao da concentracao de substrato com o tempo [g/L.h]
//f(4) = variacao da concentracao de etanol com o tempo [g/L.h]
//f(5) = variacao da concentracao de acido malico com o tempo [g/L.h]
//f(6) = variacao da concentracao de acido latico com o tempo [g/L.h]
```

```
//-----DEFINIÇÃO DAS FUNÇÕES-----
```

```
function [f]=fun(t, y, umax, Ksx, A, B, Yxs, Yps, YET, YAM, YAL)
```

```
//Modelo da taxa de crescimento celular
```

```
//Equacao de Contois
```

```
// $ux = umax * Cs / (Ksx * Cs + Cs)$ 
```

```
ux=umax*(y(3,:)/(Ksx*y(1,:)+y(3,:)));
```

```
//Taxa de crescimento celular
```

```
// $dCx/dt = rx = ux.Cx$ 
```

```
f(1)=ux*y(1,:);
```

```
//Producao de acido fumarico
```

```
//Velocidade especifica de formacao de produto
```

```
//Produto parcialmente associado ao crescimento celular
```

```
// $up = A.ux + B$ 
```

```
up=A*ux+B;
```

```
//Taxa de producao de AF
```

```
// $dCp/dt = rp = up * Cx$ 
```

```
f(2) = up*y(1,:);
```

```
//Taxa de consumo de glicose
```

```
// $dCs/dt = -ux * Cx / Yxs$ 
```

```
f(3)= -(1/Yxs)*f(1);
```

```
//Formacao de sub produtos
```

```
//Etanol
```

```
// $dCsp/dt = Yps.dCs/dt$ 
```

```
f(4)=- YET*f(3);
```

```
//Acido malico
```

```
f(5)=- YAM*f(3);
```

```
//Acido latico
```

```
f(6)=- YAL*f(3);
```

```
endfunction
```

```
//-----PROGRAMA PRINCIPAL-----
```

```
//PARAMETROS
```

```
//Contois
```

```
umax=0.22;
```

```
Ksx=80.0;
```

```
//Producao AF
```

```
A=18.27;
```

```

B=0.0008;
Yxs=0.037;
Yps=0.676;
YET=0.055;
YAM=0.11;
YAL=0.256;
//Condicoes iniciais
t0=[0.0];
y0=[0.086;0.0;135.0;0;0;0];
t=[0:0.05:71.9];

flist=list(fun,umax,Ksx,A,B,Yxs,Yps,YET,YAM,YAL);
y=ode(y0,t0,t,flist);
tempofinal=length(t);

disp(y(1,tempofinal));
disp(y(2,tempofinal));
disp(y(3,tempofinal));
disp(y(4,tempofinal));
disp(y(5,tempofinal));
disp(y(6,tempofinal));

//-----GRÁFICOS-----

clf;

//Dados do modelo x Dados experimentais
//Dados experimentais
t_cel=[0 10.9 24.6 35.3 48 59 71.9];
c_cel=[0 2.86 4.6 4.63 4.85 4.9 5.1];
t_sub=[0 10.9 24.6 35.3 48 59 71.9];
c_sub=[135 133.7 99.6 64.3 22.2 5.6 1.12];
t_AF=[0 10.9 24.6 35.3 48 59 71.9];
c_AF=[0 7.01 15.6 31.9 75.6 85.5 91.2];

subplot(221)
plot(t,y(1,:),'-',t_cel,c_cel,'o',t,y(2,:),'-',t_AF,c_AF,'x',t,y(3,:),'-',t_sub,c_sub,'+');
xlabel("Tempo [h]");
ylabel("Concentracao [g/L]");
xtitle("Variacao das concentracoes com o tempo");
h1=legend(["Celulas (g/L)","Celulas exp (g/L)","Produto (g/L)","Produto exp (g/L)","Substrato (g/L)","Substrato exp (g/L)"]);

subplot (222)
plot(t,y(4,:),t,y(5,:),t,y(6,:));
xlabel("Tempo [h]");
ylabel("Concentracao [g/L]");
xtitle("Variacao das concentracoes com o tempo");
h2=legend(["Etanol (g/L)","Acido malico (g/L)","Acido latico (g/L)"]);

```

### A3) Adaptações do código em *Scilab* incluídas no *COCO* (GUI).

```
//-----Componentes das correntes no COCO-----
//(1)Water, (2)Glucose, (3)Fumaric acid, (4)Ethanol, (5)Malic acid,
(6) Lactic acid, (7)Rhizopus

//-----Leitura dos dados da corrente de alimentação-----
formula=getCompoundConstant("chemicalFormula")
F1 = getFeedProp(1,"totalFlow"); // [mol/s]
f1=getFeedProp(1,"flow"); // [mol/s]
p1 = getFeedProp(1,"pressure"); // [Pa]
h1 = getFeedProp(1,"enthalpy"); // [J/mol]
t1= getFeedProp(1,"temperature"); // [K]
frac1 = getFeedProp(1,"fraction") ;//[molar]
MM = getCompoundConstant("molecularWeight"); // [g/mol]

densidadeAgua = 1000.0; // [g/L]
Conc_Glucose_0 = f1(2)*MM(2)/(f1(1)*MM(1)/densidadeAgua) // [g/L]
Conc_Rhizopus_0 = f1(7)*MM(7)/(f1(1)*MM(1)/densidadeAgua) // [g/L]

//-----Cálculo concentrações e vazões mássicas na saída-----
----
C(7)=(y(1,tempofinal)*1d-3) //concentracao em kg/L
m(7)=(C(7)*255000)/10; //kg/h
disp('*** Vazão mássica de células na saída [kg/h]***');disp(m(7));

C(6)=(y(6,tempofinal)*1d-3) //concentracao em kg/L
m(6)=(C(6)*255000)/10; //kg/h
disp('*** Vazão mássica de acido latico na saída
[kg/h]***');disp(m(6));

C(5)=(y(5,tempofinal)*1d-3) //concentracao em kg/L
m(5)=(C(5)*255000)/10; //kg/h
disp('*** Vazão mássica de acido malico na saída
[kg/h]***');disp(m(5));

C(4)=(y(4,tempofinal)*1d-3) //concentracao em kg/L
m(4)=(C(4)*255000)/10; //kg/h
disp('*** Vazão mássica de etanol na saída [kg/h]***');disp(m(4));

C(3)=(y(2,tempofinal)*1d-3) //concentração em kg/L
m(3)=(C(3)*255000)/10; //kg/h
disp('*** Vazão mássica de acido fumarico na saída
[kg/h]***');disp(m(3));
m(3)=(C(3)*255000)/10; //produtividade de acido fumárico em kg/h

C(2)=(y(3,tempofinal)*1d-3) //concentracao em kg/L
m(2)=(C(2)*255000)/10; //kg/h
disp('*** Vazão mássica de glicose na saída [kg/h]***');disp(m(2));

m(1)=(255000/10)-m(2)-m(3)-m(4)-m(5)-m(6)-m(7);
disp('*** Vazão mássica de agua na saída [kg/h]***');disp(m(1));

//-----Definição da corrente de produto-----
f2(1) = m(1)/MM(1)*1000/3600 // [mol/s]
f2(2) = m(2)/MM(2)*1000/3600 // [mol/s]
f2(3) = m(3)/MM(3)*1000/3600 // [mol/s]
```

```
f2(4) = m(4)/MM(4)*1000/3600 //[mol/s]
f2(5) = m(5)/MM(5)*1000/3600 //[mol/s]
f2(6) = m(6)/MM(6)*1000/3600 //[mol/s]
f2(7) = m(7)/MM(7)*1000/3600//[mol/s]

p=p1
h=h1
t=t1
totF=sum(f2) //totalFlow [mol/s]
F=f2/totF //molar fraction [molar]

setProduct(1,totF,F,"pressure",p,"temperature",t)
```