

Resultados Experimentais e Discussões

Felipe B. Pinto	MIEQB	61387
Rui Azevedo	LEQB	63265
Andre Crespo	MIEQB	59742

28 de novembro de 2023

1	Determinar o valor de k'_{L_a} de transferencia de Oxigênio no meio biológico antes da inoculação	1
2	Determinação da concentração celular máxima que poderia alcançar no sistema estudado (válida a equação logística). Simular a curva de crescimento e comparar com os dados experimentais.	3
3	Representar a velocidade específica e volumétrica de consumo de oxigénio em função do tempo. Calcular o coeficiente de rendimento de crescimento ($Y_{O_2/X}$).	7
4	Estimar o valor de K'_{L_a} durante a fase de crescimento celular	9
5	Comparar a velocidade máxima de transferência de massa com a velocidade máxima de consumo de oxigénio.	10
6	Estimar a velocidade de consumo de acetato ao longo do tempo com base na estequiometria de reação de oxidação do acetato	11
7	Estimar o rendimento verdadeiro ($Y'_{X/S}$) e o coeficiente de manutenção de acetato e compare com o rendimento observado ($Y_{X/S}$)	12

1 Determinar o valor de k'_{L_a} de transferencia de Oxigênio no meio biológico antes da inoculação

Através do *BioCTR* foi possível obter valores percentuais para a concentração de oxigénio. Nesta parte inicial queremos calcular o valor de k'_{L_a} antes de ocorrer a inoculação, ou seja, durante o arejamento do sistema com ar atmosférico após ter sido desejado com azoto. O arejamento começa quando a concentração de O_2 era zero.

Com as expressões:

$$Q_{O_2} = k'_{L_a}(C_{O_2}^* - C_{O_2}) = \frac{dC_{O_2}}{dt} \implies \ln(C_{O_2}^* - C_{O_2}) = \ln C_{O_2}^* - k'_{L_a} t$$

E considerando também que a concentração inicial de CO₂ era nula conseguimos traçar uma reta de $\ln(C^* - C_L)$ em função de tem que o $k'_{L,a}$ é o simétrico do declive e C^* o exponencial da ordenada na origem.

C^* Podemos calcular o valor para a concentração de O₂ na fase líquida de equilíbrio de forma teórica através da expressão:

$$C_{O_2}^* = 1.16 \frac{\text{mmol}_{\text{Ar}}}{\text{L}} \frac{20.95 \text{ mmol}_{O_2}}{100 \text{ mmol}_{\text{Ar}}} \frac{32 \text{ mg}}{\text{mmol}} \cong 7.78 \text{ mg/L}$$

Obtendo um valor de 7.78 mg/L.

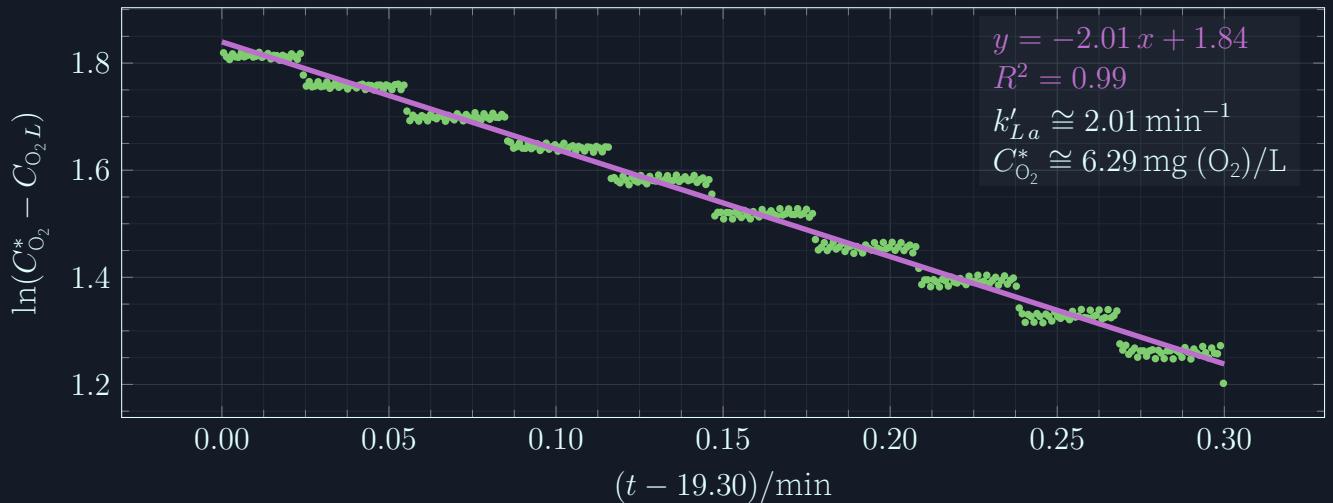


Figura 1: Grafico de $\ln(C^* - C_L) \times t - 19.30$, o tempo foi defasado para alinhar com o começo do arejamento, da regressão podemos derivar $k'_{L,a}$ e C^*

Do gráfico obtivemos que o valor de $k'_{L,a}$ é 2.01 min^{-1} e que o valor de C^* é de $6.29 \text{ mg (O}_2\text{)}/\text{L}$.

Podemos com estes valores traçar um gráfico para o Q_{O_2} em função do C_L e iremos usar o valor teórico de C^* para o cálculo de Q_{O_2} . O valor de C^* teórico também será considerado o padrão para C^* para o resto do relatório.

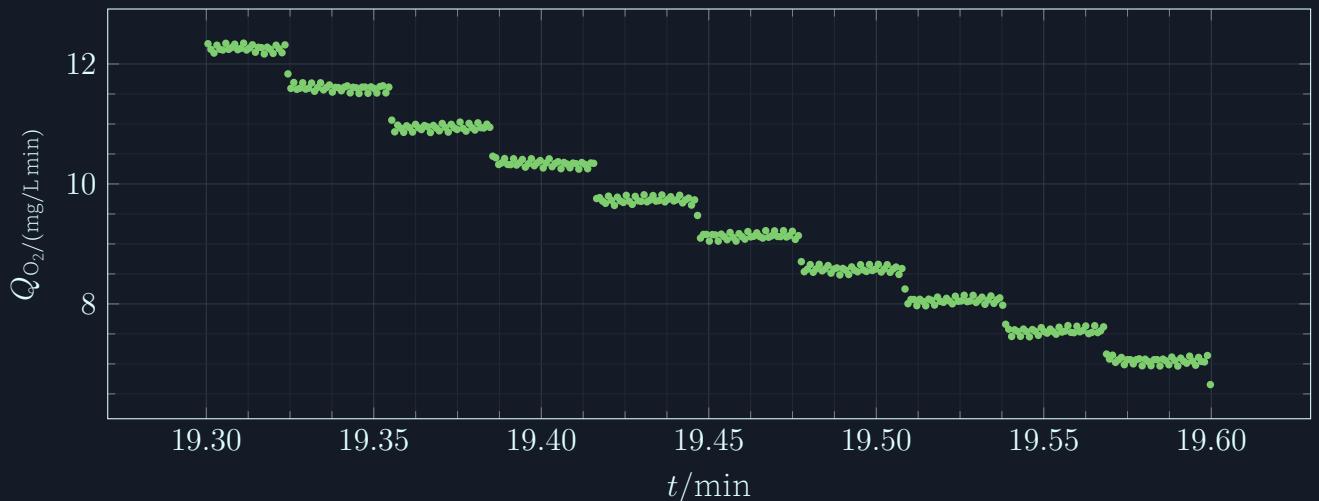


Figura 2: Grafico de $Q_{O_2} \times t$

Discussão

Através da reta que relaciona $\ln(C^* - C_L)$ com o tempo, retirámos um valor de $C^* = \exp(1.84) = 6.30 \text{ mg (O}_2\text{)/L}$ e um valor de $K'_{L,a} = 2.01 \text{ min}^{-1}$. Tendo um desvio percentual em relação ao valor teórico ($7.78 \text{ mg (O}_2\text{)/L}$) de 19.2%.

A velocidade de difusão máxima ocorre quando o C_L é nulo, e nesta atividade acontece no tempo inicial do arejamento. Assim pode ser calculado de $Q_{O_2 \text{ max}} = K'_{L,a} * C^*$, obtendo o valor de $Q_{O_2 \text{ max}}$ igual a 12.64 min^{-1} experimentalmente e com o uso de C^* teórico obtém-se o valor de 15.63 min^{-1} .

2 Determinação da concentração celular máxima que poderia alcançar no sistema estudado (válida a equação logística). Simular a curva de crescimento e comparar com os dados experimentais.

Com os valores das absorvâncias que foram medidos ao longo do tempo, foram calculadas as concentrações de Biomassa (X) através da equação:

$$X = 1171.8 * \text{Absorvância} + 1.5$$

Com isto podemos fazer um gráfico de X em função do tempo o que nos irá permitir ver a evolução do crescimento da cultura bacteriana ao longo do tempo.

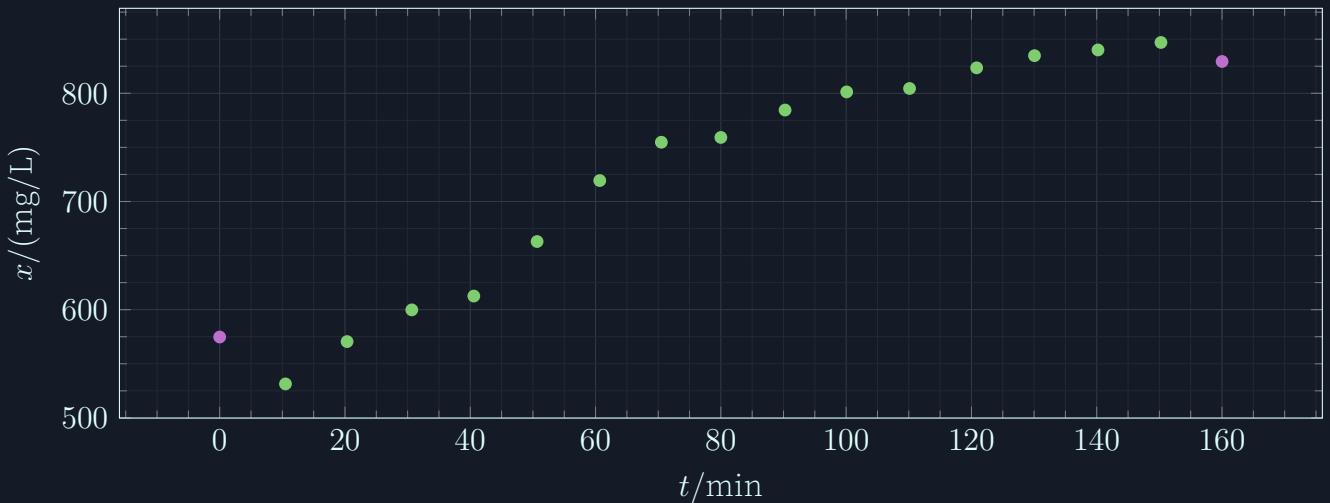


Figura 3: Progreção da concentração da biomassa no tempo, os pontos em rosa serão desconsiderados pelo resto do relatório

Dá observação do gráfico percebe-se que antes dos **10 minutos** pode existir uma fase lag ou o início de uma fase exponencial, contudo, devido a ainda não ter corrido uma homogeneização completa do reator quando foi realizada a primeira análise esse valor não poderá ser considerado. Dos **10 minutos aos 70 minutos** percebe-se a ocorrência de clara uma fase exponencial. Contudo entre os **80 e 120 minutos** já existe uma maior menor velocidade de crescimento, indicando assim a proximidade de um estado estacionário, contudo, é ainda percutível um crescimento considerável. A partir dos **130 minutos** pode ser considerado um estado estacionário, já que há o crescimento é praticamente inexistente.

Considerando que se verifica a existência de um estado estacionário, tem de ser considerado o modelo de Verhulst, já que o modelo de Malthus não prevê a existência de um estado estacionário.

Assim vamos verificar que método de análise se adequa mais ao nosso trabalho. Para isso iremos observar e analisar os métodos de Malthus, Euler, dos 3 pontos e o método polinomial, para assim obter o valor da velocidade de crescimento celular.

2.1 Modelo de Verhulst

$$x = \frac{x_{\max} x_0 \exp(\mu_{\max} t)}{x_{\max} - x_0(1 - \exp(\mu_{\max}) t)} = \frac{\exp(\mu_{\max} t)}{x_0^{-1} - x_{\max}^{-1}(1 - \exp(\mu_{\max} t))}$$

Encontrando μ_{\max} e x_{\max} para cada modelo podemos prever os respectivos valores de x e assim encontrar o que mais se aproxima dos valores experimentais.

2.2 Método de Malthus

O método de Malthus permite-nos analisar a fase exponencial, mesmo não sendo adequado analisar a curva inteira (tabela 1 do Anexo).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \implies \ln X = \mu t + \ln X_0; \quad \mu = \mu_{\max}$$

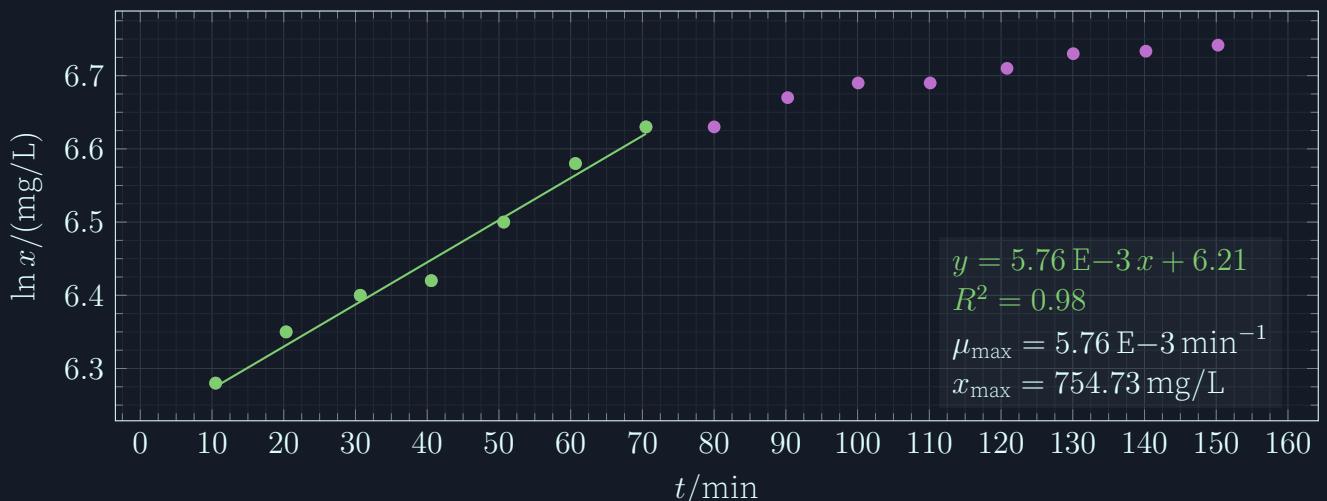


Figura 4: Curva aplicando o modelo de Malthus de onde pela porção exponencial no tempo de $\ln x$ podemos traçar uma regreção linear que segue o método de Malthus

O método de Euler e o dos 3 pontos são bastante similares. Através do tempo e da concentração de X calculou-se μ (Tabela 3 do Anexo). Desses gráficos retirou-se os valores de μ_{\max} através da ordenada na origem e de X_{\max} quando a μ é nula.

2.3 Método de Euler

$$\mu_i = \frac{x_i - x_{i-1}}{t_i - t_{i-1}} x_i^{-1} \quad \mu = \mu_{\max} - \frac{\mu_{\max}}{x_{\max}} x$$

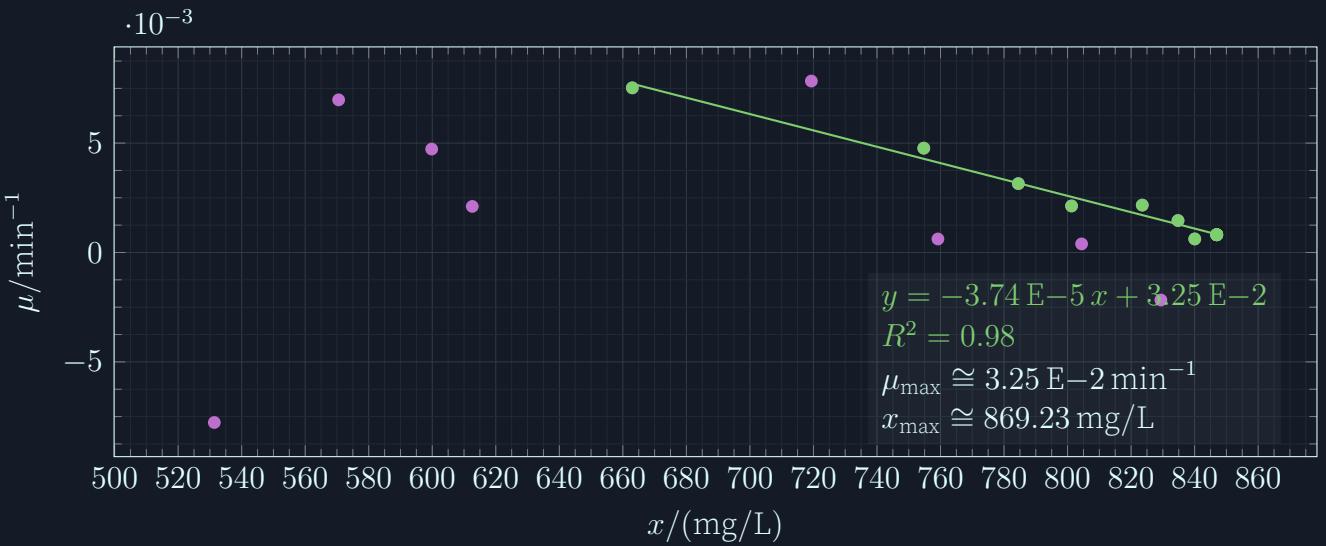


Figura 5: Gráfico $\mu \times x$ para encontrar a regressão linear segundo o método de Euler para aplicar no modelo de Verhulst

2.4 Método dos 3 pontos

$$\mu_i = \frac{x_{i+1} - x_{i-1}}{t_{i+1} - t_{i-1}} x_i^{-1} \quad \mu = \mu_{\max} - \frac{\mu_{\max}}{x_{\max}} x$$

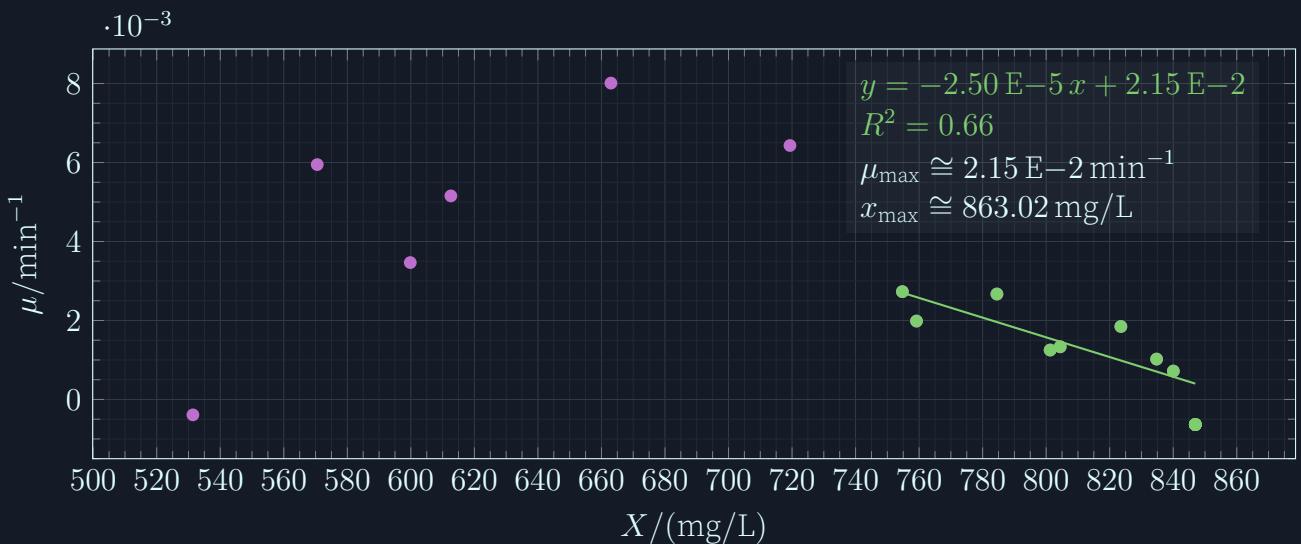


Figura 6: Gráfico $\mu \times x$ para encontrar a regressão linear segundo o método dos 3 pontos para aplicar no modelo de Verhulst

2.5 Método Polinomial

No método do polinómio ajustou-se uma regressão polinomial à curva de crescimento que relaciona o tempo com a concentração de biomassa para se calcular μ (tabela 2 do anexo) e obteve-se valores de μ_{\max} através da ordenada na origem e de X_{\max} quando a μ é nula.

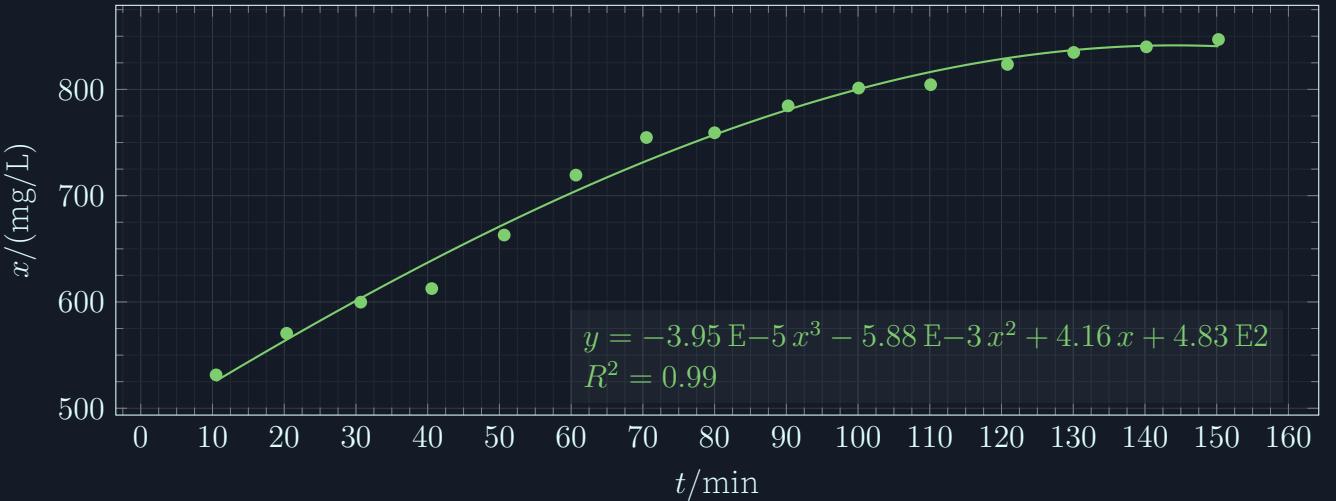


Figura 7: Grafico $X/(\text{mg/L}) \times t/\text{min}$ apresentando o método polinomial com um polinômio de 3º grau, pelo método polinomial $dx/dt = y$.

$$\mu = \frac{dx/dt}{x} = \frac{-11.85 \text{E}-5 t^2 - 11.76 \text{E}-3 t + 4.16}{x}$$

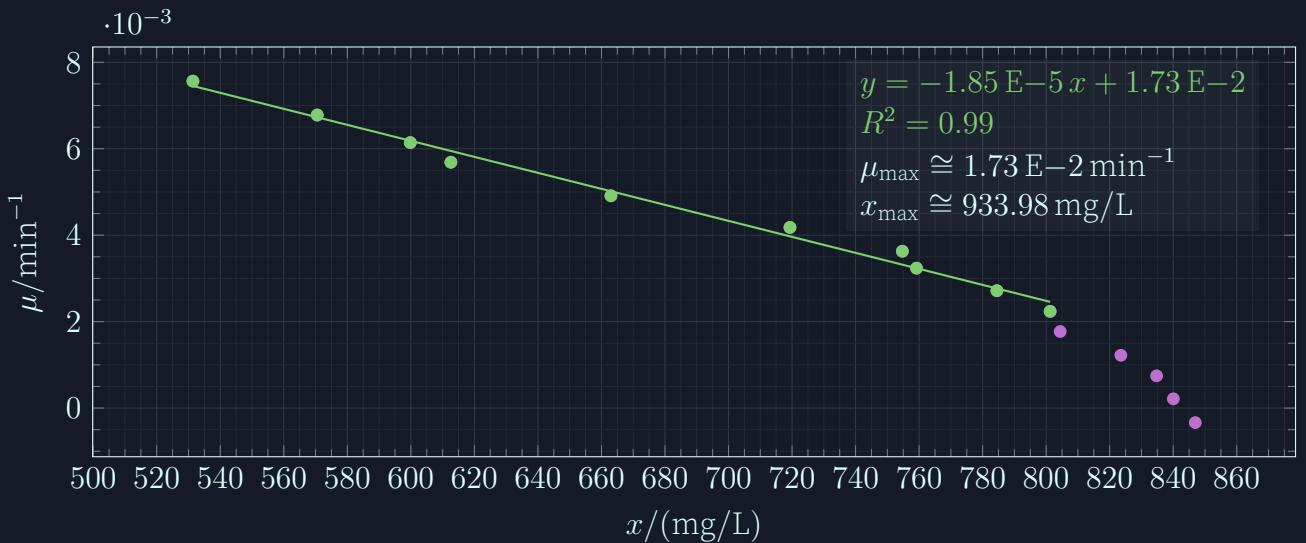


Figura 8: Grafico $\mu \times x$ para valores obtidos de μ a partir da equação polinomial de 3º grau obtida no método polinomial, os valores para $x \geq 804.42$ foram desconsiderados para maximizar R^2

2.6 Comparando

Para se poder verificar qual o melhor método calculou-se a Raiz do erro quadrático médio (em inglês *Root-mean-square error*, RMSE) para se descobrir qual deles tem menor variação para com o experimental. Quanto menor o valor mais próximo ele estará do experimental (Tabela 4 do Anexo).

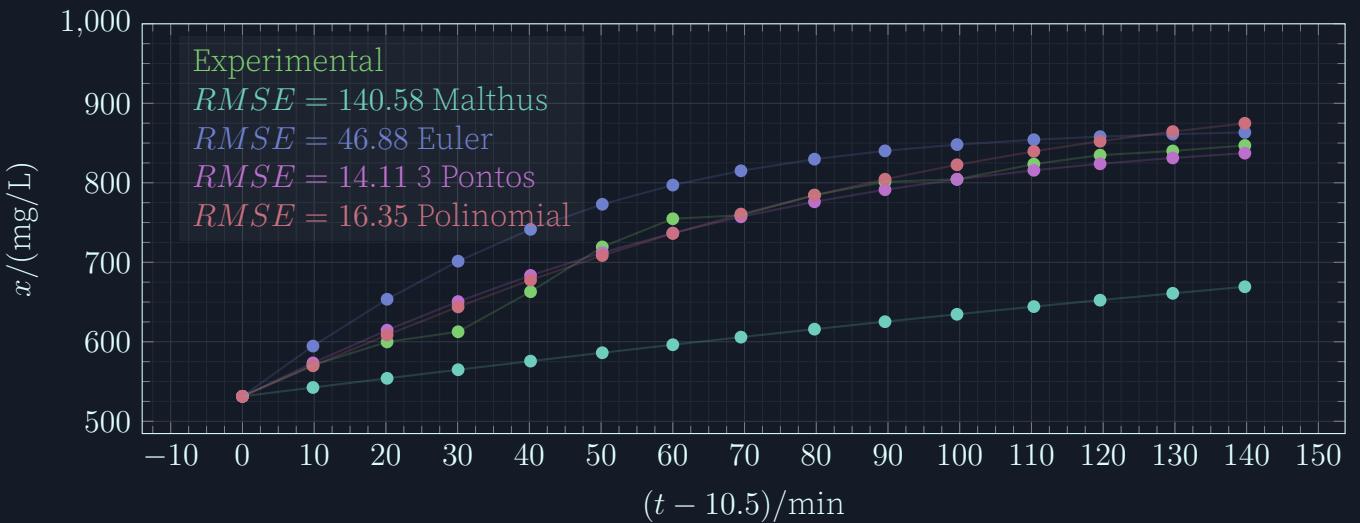


Figura 9: Gráfico $x \times t$ para valores experimentais e valores previstos pelos modelos estudados, o valor de 10.5 foi reduzido de t para eliminar o *outliner* e acomodar a previsão dos modelos

Discussão

Depois de processar os dados usando quatro métodos diferentes, ficou evidente que o método dos três pontos é o mais apropriado. Embora matematicamente esse método se tenha mostrado o mais representativo, ao observar o gráfico que compara as curvas do experimento com o método escolhido, percebe-se que ele não reflete completamente o crescimento celular de maneira precisa.

Sendo assim, a velocidade de crescimento celular máxima observada é 0.0215 min^{-1} e a concentração máxima observada é 863 mg (X)/L.

3 Representar a velocidade específica e volumétrica de consumo de oxigénio em função do tempo. Calcular o coeficiente de rendimento de crescimento ($Y_{O_2/X}$).

A medição do oxigénio foi realizada com o eletrodo ligado ao respirómetro. Para poder realizar a análise do consumo ao longo do tempo realizaram-se paragens da bomba peristáltica a cada 10 minutos, até que se verificou uma descida da concentração percentual do oxigénio de cerca de 30% onde se voltava a ligar a bomba. Obteve-se o gráfico Figura 12 em que representa as descidas verificadas e a Figura 13 que exprime os declives de cada uma das descidas de concentração de O₂.

Com esses declives foi calculado os valores para a velocidade volumétrica (r_{O_2}) e de velocidade específica de consumo de oxigénio com o tempo (V_{O_2}) através das fórmulas :

$$r_{O_2} = -C_{O_2}^{\%} * C^* / 100 \quad V_{O_2} = r_{O_2} / X$$

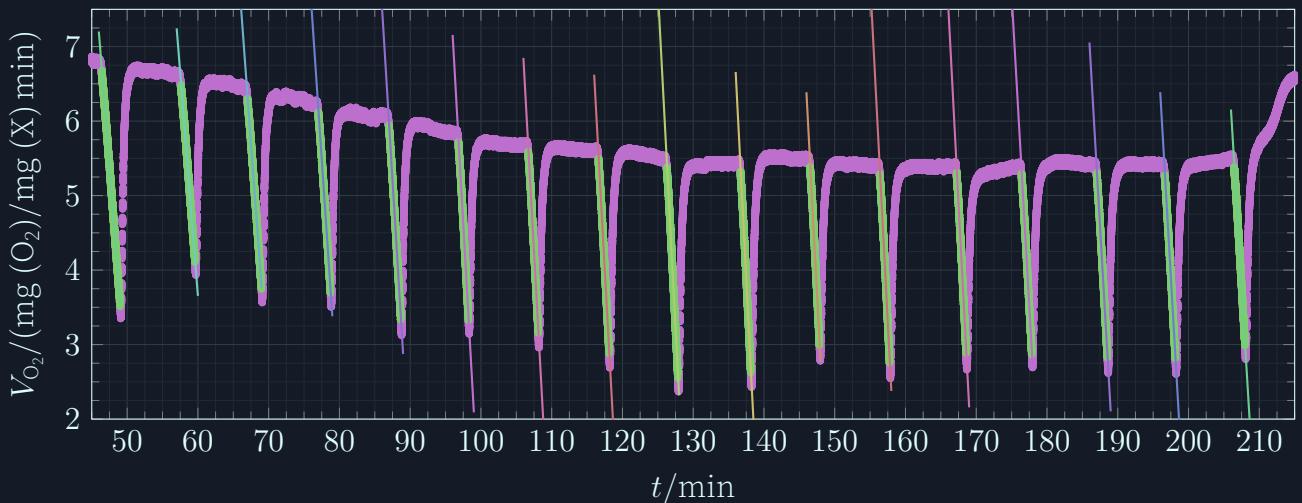


Figura 10: Apresentação das regressões para a primeira parte os vales de $V_{O_2} \times t$ durante o experimento, cada declive está representado na tabela asseguir com sua cor correspondente

	Declive	R^2		Declive	R^2
1	-1.2117	0.9989	10	-1.8602	0.9973
2	-1.1973	0.9979	11	-1.8071	0.9966
3	-1.2939	0.9980	12	-1.8353	0.9964
4	-1.4073	0.9976	13	-1.8218	0.9965
5	-1.5610	0.9977	14	-1.6727	0.9964
6	-1.6891	0.9970	15	-1.6504	0.9972
7	-1.7326	0.9968	16	-1.6514	0.9973
8	-1.7423	0.9973	17	-1.5805	0.9975
9	-1.8129	0.9973			

Figura 11: Declives e R^2 referentes as regreções lineares no gráfico anterior

Podemos assim traçar os gráficos de r_{O_2} e de V_{O_2} em função do tempo (Figura 14) para poder analisar a evolução do consumo de oxigénio e o aumento da concentração da biomassa. (Tabela 5 do Anexo)

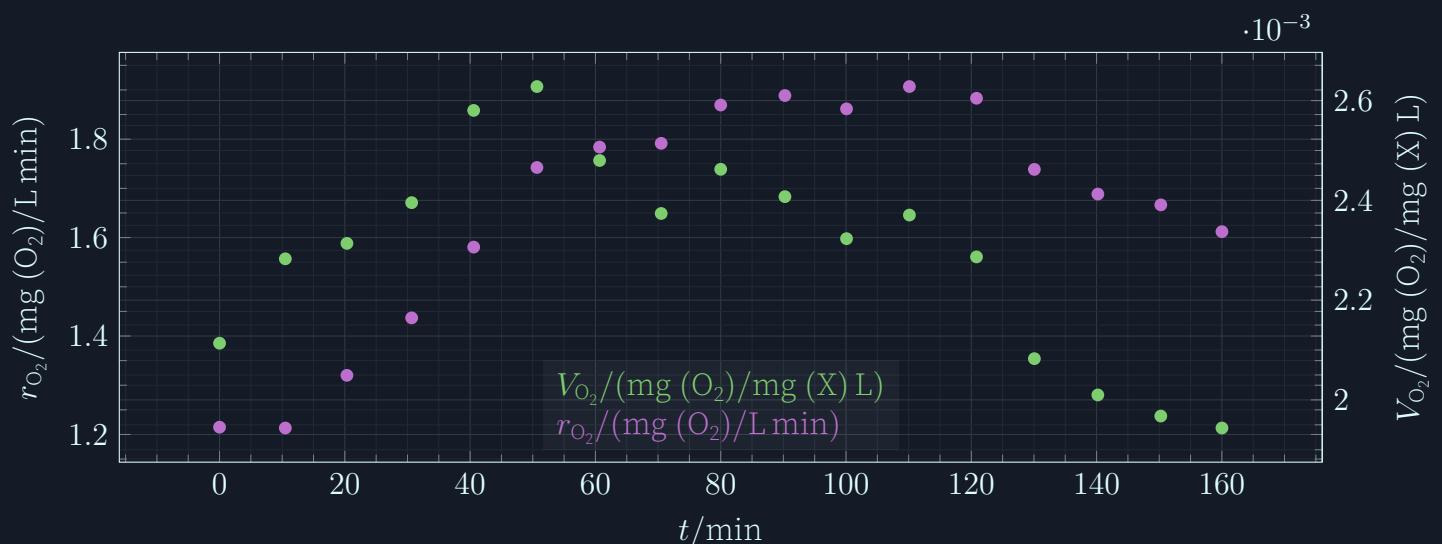


Figura 12: Gráfico da velocidade específica e volumétrica de consumo de oxigénio em função do tempo

Já ao realizarmos o gráfico de V_{O_2} em função da velocidade específica de crescimento (μ) que obtivemos com o método dos 3 pontos, conseguimos determinar o coeficiente de rendimento de crescimento a partir do declive.

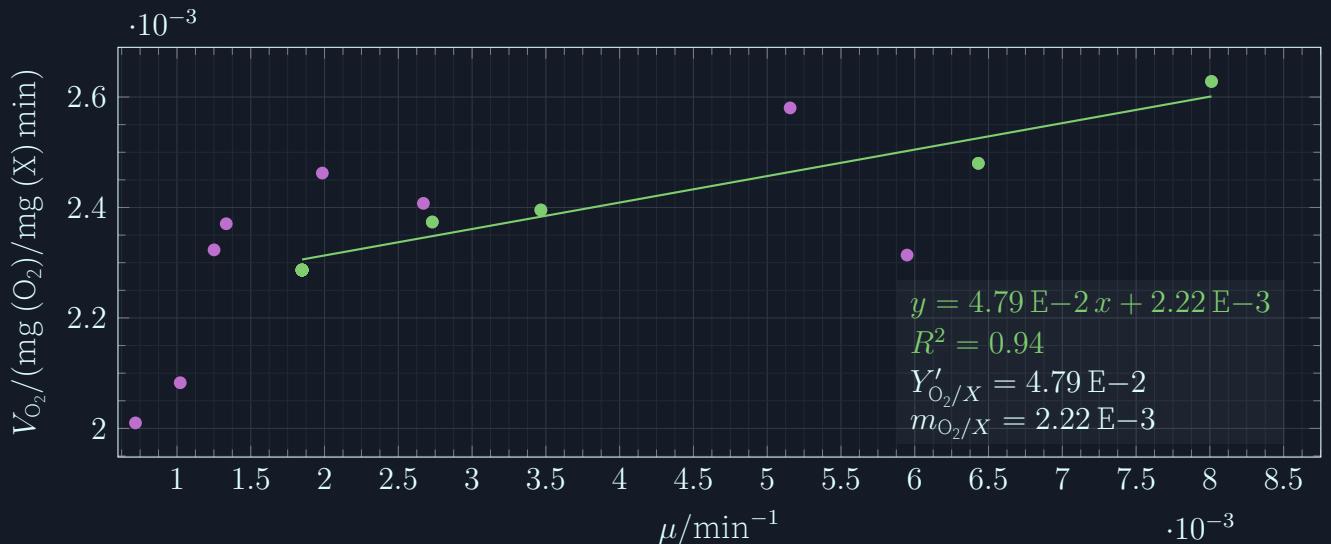


Figura 13: Gráfico da velocidade específica de consumo de oxigénio (V_{O_2}) em função da taxa específica de crescimento (μ)

Discussão

No gráfico da figura 14 deveríamos observar uma velocidade específica de consumo de oxigénio constante ao longo do tempo, mas tal não acontece. Deveria acontecer, pois esta velocidade retrata a quantidade de oxigénio necessária às células. Por isso, como estamos na fase exponencial, as células necessitam da máxima quantidade de O_2 para crescimento celular. No entanto, quando atingimos a fase estacionária, há uma descida ligeira da velocidade específica. Deveria haver uma grande diminuição porque como se esgotou o substrato, não há crescimento, apenas manutenção celular.

Nesse mesmo gráfico verificamos um aumento do consumo de oxigénio, durante a fase exponencial. Durante a fase estacionária, há uma diminuição pois não existe grande quantidade de oxigénio a ser consumida.

Através do gráfico da figura 15, retirámos um valor baixo de coeficiente de rendimento de crescimento ($m = 0.022 \text{ mg(O}_2\text{)/mg(X) min}$). Logo concluímos que a maioria do oxigénio foi utilizado no crescimento celular. Para obtermos a melhor linearização possível selecionámos alguns pontos pois havia uma variedade de valores. Apesar de tudo, sabemos que estes valores ficam aquém do esperado.

4 Estimar o valor de K'_{L_a} durante a fase de crescimento celular

Para obter o valor de k'_{L_a} na fase de crescimento celular é necessário considerar que o O_2 não se encontra dissolvido no meio, ou seja, que todo o oxigénio transferido pelo dispersor para o sistema é diretamente consumido pela cultura.

Assim podemos considerar que a velocidade de transferência de O₂ nesse período é igual à velocidade volumétrica de O₂, o que nos permite chegar a equação:

$$(C^* - C_L) = r_{O_2}/k_{La}$$

O declive da função de $C^* - C_L$ em função de r_{O_2} , com o declive (m) igual ao inverso de k_{La} permite-nos chegar ao valor do declive. (Tabela 6 do Anexo)

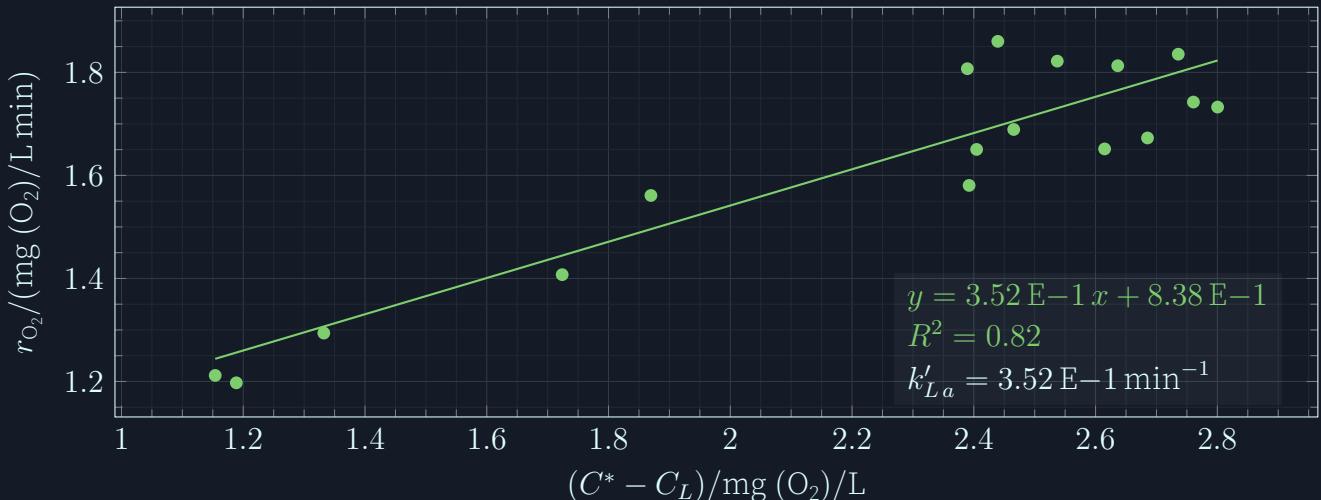


Figura 14: Gráfico $r_{O_2} \times (C^* - C_L)$ usado para obter o valor de k'_{La}

Discussão

O valor de K'_{La} obtido antes da inoculação é de 2.01 min^{-1} , o que significa que o valor durante a fase exponencial é cerca de 6 vezes menor ($K'_{La} = 0.352 \text{ min}^{-1}$). Esta diferença pode ser explicada pela dificuldade na transferência de oxigénio da fase gasosa para a líquida, devido à existência de microrganismos no sistema e também devido ao aumento de viscosidade do reator.

5 Comparar a velocidade máxima de transferência de massa com a velocidade máxima de consumo de oxigénio.

Para podermos analisar se existe algum oxigénio no meio teremos de verificar se a velocidade de transferência de O₂, Q_{O_2} nesse período é igual à velocidade volumétrica de O₂, r_{O_2} . Para isso calcula-se os valores máximos para cada uma delas da forma exposta abaixo:

$$Q_{O_2} = K'_{La} C^* \cong 3.52 \text{ E-1} * 7.78 \cong 2.74 \text{ mg/L min}$$

$$-r_{O_2} = Y_{O_2/X} \mu_{\max} X_{\max} \cong 0.05 * 2.15 \text{ E-2} * 863.02 \cong 0.90 \text{ mg/L min}$$

Discussão

Os valores que obtivemos para a velocidade de transferência de massa máxima e para a velocidade de consumo de oxigénio máxima foram respetivamente, $Q_{O_2 \max} = 2.74 \text{ mg/L min}$ e $-r_{O_2 \max} = 0.90 \text{ mg(O}_2)/\text{L min}$. Verificamos que $Q_{O_2 \max}$ é aproximadamente o triplo de $-r_{O_2 \max}$, ou seja, a cultura não está a consumir o oxigénio transferido. Verificamos assim que esta situação se trata de uma limitação cinética por metabolismo celular.

De forma a otimizar o sistema deve-se tentar aproximar o valor de $Q_{O_2 \text{ max}}$ ao valor de $-r_{O_2 \text{ max}}$.

6 Estimar a velocidade de consumo de acetato ao longo do tempo com base na estequiométria de reação de oxidação do acetato

O Acetato de Potássio tem a seguinte reação de dissociação:



O agora ácido acético irá reagir com o oxigénio, através de uma reação de oxidação:



Assim, através desta última reação, para cada mole de acetato consumida, são consumidas duas moles de oxigénio. Portanto, a velocidade de consumo de O_2 é o dobro da de consumo de acetato.

Essa comparação só pode ser realizada através da unidade de quantidade química (moles) e não em unidades de massa. Assim a equação de r_{O_2} para racetato fica:

$$-r_{CH_3COOH} = \frac{-r_{O_2}}{2} \frac{M_w CH_3COOH}{M_w O_2}$$

A massa molecular (M_w) $M_w CH_3COOH$ tem o valor de 60.00 E3 mg/mol e o valor de $M_w O_2$ é 32.00 E3 mg/mol

Podemos com isso realizar o gráfico de racetato em função do tempo (Figura 17). (Tabela 6 do Anexo)

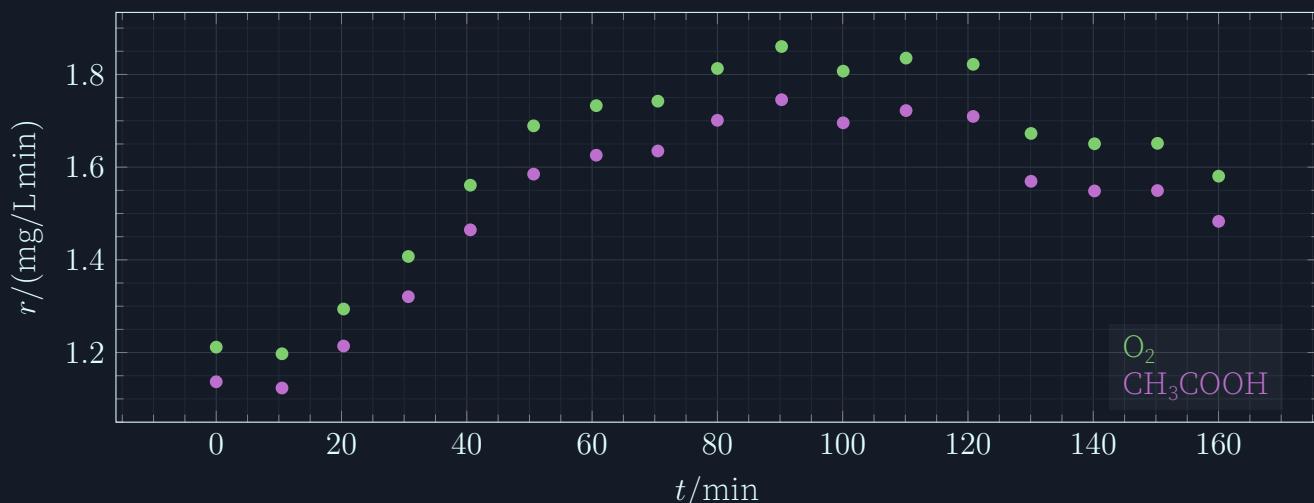


Figura 15: Gráfico comparando r de O_2 e CH_3OOH

Discussão

Ao analisar o gráfico, percebemos que tanto a velocidade de consumo do acetato quanto a velocidade de consumo do oxigénio aumentam até atingir um ponto máximo. Após esse ponto, ocorre uma diminuição lenta tal como vimos na alínea C, indicando que o substrato (acetato) foi completamente utilizado (fase estacionária). Nessa fase, o acetato é exclusivamente consumido para a manutenção celular, assim como o oxigénio.

Ao aplicar a estequiométria da reação, concluímos que há uma relação de 2:1, o que significa que, para cada duas moles de oxigénio consumidas, uma mole de acetato é consumida. Essa relação é corroborada pelo gráfico que representa as velocidades de consumo de substrato e oxigénio.

7 Estimar o rendimento verdadeiro ($Y'_{X/S}$) e o coeficiente de manutenção de acetato e compare com o rendimento observado ($Y_{X/S}$)

Como já sabemos que o coeficiente do rendimento verdadeiro (Y') só irá ter em conta o substrato usado para o crescimento celular e que este se deu apenas usando o acetato como fonte de carbono. Já o coeficiente de rendimento aparente (Y) tem também em conta o consumo de substrato para manutenção.

Através do Y' e relacionando-o com o r_{Ac} podemos chegar a equação:

$$r_S = \frac{r_X}{Y'_{X/S}} + m \quad X \wedge v_S r_X = \frac{dx}{dt} = r_S/X \wedge \mu = \frac{dX}{dt} X^{-1} = r_X/X \implies \\ \implies v_s = Y'^{-1}_{X/S} \mu + m$$

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S}$$

$$\Delta S = S_f - S_i = \frac{m_{acetato}}{V_{reator}} - 0 = \frac{9.5 * 2 * 10^3 / 100}{0.5 * 0.002 * 0.1(\text{inóculo})} \cong 1.90 \text{ E} 6 \implies \\ Y_{X/S} \cong \frac{846.95 - 531.39}{1.9 \text{ E} 6} \cong 1.66 \text{ E} -4 \text{ mg (X)/mg (S)}$$

Podemos então realizar um gráfico dessa equação (Figura 18) e obtemos do inverso do declive o Y' e o coeficiente de manutenção da ordenada na origem E para chegarmos ao valor coeficiente aparente precisamos de calcular o quociente entre variação de biomassa e a variação de substrato. (Tabela 7 do Anexo)

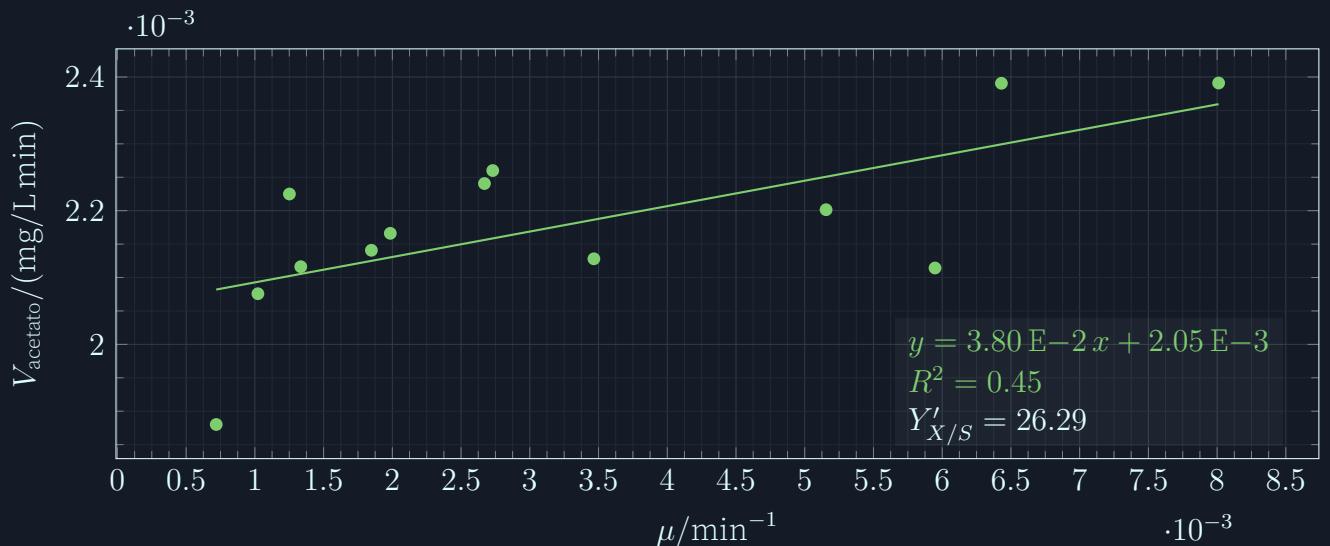


Figura 16: Gráfico da velocidade específica de consumo de acetato (V_{CH_3COOH}) em função da velocidade específica de crescimento (μ)

Discussão

De acordo com os cálculos realizados, o coeficiente de rendimento verdadeiro

$Y'_{X/S} = 26.29 \text{ mg (X)/mg (Ac)}$, o coeficiente de manutenção (m) é de $2.05 \times 10^{-3} \text{ mg (Ac)/mg (X)}$ e o coeficiente de rendimento aparente ($Y_{X/S}$) é $1.66 \times 10^{-4} \text{ mg (X)/mg (Ac)}$.

Ao analisar ambos os valores, observa-se que o coeficiente de rendimento verdadeiro é maior do que o aparente, o que é esperado. Isso ocorre porque o coeficiente de rendimento verdadeiro leva em consideração o acetato consumido para o crescimento celular, manutenção e formação de produtos, enquanto o coeficiente de rendimento aparente considera apenas o crescimento celular.