

**UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS
MISSÕES – CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

MARCIO ANTONIO MAZUTTI

**MODELAGEM MATEMÁTICA DA PRODUÇÃO DE INULINASE EM
BIORREATOR BATELADA**

ERECHIM, RS – BRASIL

MARÇO DE 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

URI – CAMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**MODELAGEM MATEMÁTICA DA PRODUÇÃO DE INULINASE EM
BIORREATOR BATELADA**

MARCIO ANTONIO MAZUTTI

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos da URI – Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

ERECHIM, RS – BRASIL

MARÇO DE 2007

**MODELAGEM MATEMÁTICA DA PRODUÇÃO DE INULINASE EM
BIORREATOR BATELADA**

Marcio Antonio Mazutti

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Fernanda de Castilhos Corazza, D. Sc.
(Orientadora)

Helen Treichel, D. Sc.
(Orientadora)

Marcos Lúcio Corazza, D. Sc.
(Membro)

Francisco Maugeri Filho, D. Sc.
(Membro)

Erechim, 02 de março de 2007.

ESTE ESPAÇO ESTÁ RESERVADO PARA A FICHA CATALOGRÁFICA

“Only dead fish go with the flow”

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

Ao sentar para escrever estes agradecimentos, dei-me conta de como é difícil enumerar todos aqueles a quem devo agradecer. São muitas as pessoas que fazem parte das nossas vidas e que acabam nos ajudando, seja em projetos ou no crescimento enquanto pessoa. Tentei não esquecer de ninguém, muito embora saiba que fatalmente deixarei de enumerar aqui algumas pessoas que fazem parte da minha vida.

Aquele que acredita não pode deixar de agradecer a DEUS, pois sem Ele não teríamos os dons, as condições e a vida para realizarmos nosso trabalho.

Não posso nunca esquecer de agradecer aos meus pais Darci e Cleudes. Sem o amor incondicional e o suporte em toda a minha vida eu com certeza não estaria aqui. Este título é o meu presente a vocês por todas as dificuldades vencidas para que eu pudesse estudar e vencer na vida.

Ao meu irmão Cleovane pela amizade e compreensão em momentos difíceis que passamos juntos.

Às professoras Dra. Fernanda Corazza e Dra. Helen Treichel pela orientação, confiança, paciência, dedicação, ensinamentos e, principalmente, pela amizade que foi cultivada, fazendo deste ano de mestrado um ambiente maravilhoso de trabalho.

Aos meus grandes amigos João Paulo e Bernardo, que me acompanham desde a Graduação para concretizar mais um dos nossos tantos objetivos. Obrigado pela paciência, dedicação e companheirismo. Somos grandes vencedores e, principalmente, amigos inseparáveis. Obrigado por vocês existirem e fazerem parte da minha vida.

Ao Wagner pela amizade de longos anos e por me auxiliar nos meses em que passei em Campinas. Com certeza tudo se tornou mais fácil e acessível.

Ao professor e amigo Dr. Altemir Mossi pelos conselhos, pela solidariedade nos momentos em que passei por dificuldades no início do mestrado e por propiciar um dos momentos mais felizes da minha vida. Nada melhor do que ver o Inter ser campeão da Libertadores e do Mundo. Valeu Altemir!

Ao professor e amigo Dr. Marco Di Luccio por ser um incentivador e sempre me fazer acreditar que nada é impossível. Obrigado pela sua amizade e por tudo o que você um dia me ensinou. Pode ter certeza da minha admiração e respeito por você.

Ao professor e amigo Dr. Marcos Corazza pelo incentivo, encorajamento e auxílio na realização desta dissertação. Obrigado pela sua amizade e por toda a experiência de vida e profissional que aprendi convivendo ao seu lado.

Ao professor Dr. Francisco Maugeri Filho por permitir que eu pudesse realizar parte da dissertação no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Unicamp e por me auxiliar nos momentos em que enfrentei dificuldades na realização do trabalho.

Aos professores do Programa por contribuir para a minha formação e crescimento profissional.

A todos os meus amigos dos laboratórios de Termodinâmica e Biotecnologia, pelo convívio e disposição de tornar nosso local de trabalho um ambiente agradável.

Aos meus colegas de mestrado que se fizeram presentes, com amizade, ajuda e companheirismo: Adriana, Cilda, Karina, Elisângela, Pihetra e João. Foi muito bom ter convivido com vocês.

Aos amigos do “cafezinho”, em especial: Cansian, Elton, Altemir, Malyzs, Renata, Ieda, Alencar, Clarissa, Gabriela. Demos muitas risadas ao redor dessa famosa, porém, limitada térmica de café. Agora irá sobrar mais café.

A Aline pelos inúmeros favores prestados. Não sei o dia em que poderei pagar todos.

A CAPES pelo apoio financeiro, sem o qual a realização desse trabalho seria impossível.

Ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos da URI – Campus de Erechim por possibilitar a realização deste trabalho.

Obrigado a todas essas pessoas que fazem a minha vida valer a pena. É por causa delas que eu tenho ânimo para dar cada passo adiante.

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

MODELAGEM MATEMÁTICA DA PRODUÇÃO DE INULINASE EM BIORREATOR BATELADA

Marcio Antonio Mazutti

Março/2007

Orientadoras: Fernanda Castilhos Corazza

Helen Treichel

O desenvolvimento de modelos matemáticos de bioprocessos tem um importante papel no aumento de escala, controle e otimização do processo. O objetivo principal deste trabalho foi a aplicação de modelos matemáticos para descrever quantitativamente o crescimento microbiano, o consumo de substrato e a produção de inulinase em biorreator batelada, a partir de resíduos agroindustriais como substrato. No trabalho são apresentados três modelos como alternativa de representar o processo: fenomenológico, empírico e híbrido. Na modelagem fenomenológica são apresentadas três estratégias: a primeira consiste na seleção do conjunto de modelos cinéticos adequado; a segunda apresenta um modelo de 2 fase; e a terceira propõe uma modificação na equação de balanço para representação do produto. Para a modelagem empírica foi adotada uma abordagem com, redes neurais artificiais (RNAs), onde são apresentadas a influência do número de entradas para a RNA, o número de neurônios internos e a função de ativação no ajuste dos dados

experimentais. Na modelagem híbrida, RNAs são usadas para fornecer os parâmetros do modelo, e as equações de balanço são usadas como modelos de tendência. Em relação a descrição fenomenológica é investigada a influência do modelo cinético e na descrição empírica são investigados o número de entradas e o número de neurônios internos. O modelo fenomenológico apresentou resultados pouco satisfatórios. O modelo empírico apresentou bom ajuste para concentração celular e a concentração de substrato. No entanto, as RNAs não apresentaram um ajuste satisfatório para concentração de produto. Neste trabalho, o modelo híbrido apresentou os melhores resultados para o ajuste das três variáveis de estado: concentração celular, concentração de ART e concentração de inulinase.

Palavras Chave: Modelo fenomenológico; RNAs; Modelo Híbrido; *Simulated Annealing*; Modelos Cinéticos; Inulinase; *Kluyveromyces marxianus*.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering program as a partial fulfillment of the requirements for the Master in Food Engineering.

MATHEMATICAL MODELING OF INULINASE PRODUCTION IN BATCH BIOREACTOR

Marcio Antonio Mazutti

March /2007

Advisors: Fernanda Castilhos Corazza

Helen Treichel

The development of mathematical models of bioprocess has an important whole in the scale-up, control and optimization of industrial processes. The main objective of this work was modeling inulinase production from agroindustrial residues as substrate. The modeling concerning the microbial growth, substrate consumption, and inulinase production in batch bioreactor was used, in which the application of three modeling techniques were employed: phenomenological, empirical and hybrid. In the phenomenological modeling three approaches were used: the first one consists in the choice of an adequate kinetic model; the second was the application of two-phase model; and in the third, a modification on product mass balance was proposed. In the empirical modeling the influence of the inputs to the artificial neural network (ANN), the number of the hidden units and the activation function were investigated. In the hybrid modeling the ANN was used to supply the parameters of the model and the equations of mass balance were used as tendency model. In the phenomenological part the influence of kinetic model was investigated, and in the empirical part the influence of ANN inputs and the number of hidden units were also investigated. The best results were achieved with the hybrid model, with a satisfactory fitting for the three state variables: microbial growth, substrate consumption and product formation.

Key words: Phenomenological model; ANN; Hybrid model; Simulated Annealing ; Kinetic Models; Inulinase; *Kluyveromyces marxianus*.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
SUMÁRIO.....	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
NOMENCLATURA.....	xvi
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
II.1 INULINASE	6
II.2 MODELAGEM MATEMÁTICA DE BIOPROCESSOS.....	10
II.3 MODELOS CINÉTICOS DE CRESCIMENTO MICROBIANO	12
II.4 ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS	14
II.6 MODELOS HÍBRIDOS	20
CAPÍTULO III - MODELAGEM FENOMENOLÓGICA DA PRODUÇÃO DE INULINASE.....	22
III.1 INTRODUÇÃO.....	23
III.2 MODELAGEM MATEMÁTICA E ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS	23
III.2.1 Estratégia 1: Seleção Preliminar dos Modelos Cinéticos	28
III.2.2 Estratégia 2: Modelo de Duas fases.....	29
III.2.3 Estratégia 3: Modificação do Balanço para Produto	29
III.3 RESULTADOS DA MODELAGEM FENOMENOLÓGICA	30
III.3.1 Estratégia 1: Seleção Preliminar dos Modelos Cinéticos	30
III.3.1.1 Perspectivas Futuras	35
III.3.2 Estratégia 2: Modelo de 2 Fase.....	36
III.3.2.1 Perspectivas Futuras	42
III.3.3 Estratégia 3: Modificação no Balanço para Produto	43
III.4 CONSIDERAÇÕES	48
CAPÍTULO IV - MODELAGEM EMPÍRICA DA PRODUÇÃO DE INULINASE	50

IV.1 INTRODUÇÃO	51
IV.2 MODELAGEM EMPÍRICA.....	52
IV.2.1 Arquitetura da Rede Neural.....	52
IV.2.2 Dados de Entrada para a Rede Neural.....	52
IV.2.3 Treinamento da Rede Neural.....	52
IV.3 RESULTADOS DA MODELAGEM EMPÍRICA	53
IV.4 CONSIDERAÇÕES.....	59
CAPÍTULO V - MODELAGEM HÍBRIDA DA PRODUÇÃO DE INULINASE.....	61
V.1 INTRODUÇÃO.....	62
V.2 DESENVOLVIMENTO DO MODELO HÍBRIDO	63
V.2.1 Parte Fenomenológica	63
V.2.2 Parte Empírica	65
V.2.2.1 Arquitetura da Rede Neural	65
V.2.2.2 Dados de Entrada para a Rede Neural	65
V.2.2.3 Treinamento da Rede Neural: Determinação dos parâmetros do modelo	65
V.2.3 Modelo Híbrido	66
V.3 RESULTADOS DA MODELAGEM HÍBRIDA.....	67
V.4 CONSIDERAÇÕES	77
CAPÍTULO VI - COMPARAÇÃO DAS DIFERENTES TÉCNICAS DE MODELAGEM: MODELO FENOMENOLÓGICO, EMPÍRICO E HÍBRIDO.	79
VI.1 INTRODUÇÃO	80
VI.2 COMPARAÇÃO QUALITATIVA DAS TÉCNICAS DE MODELAGEM	81
VI.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE AS TÉCNICAS DE MODELAGEM.....	85
VI.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O <i>SIMULATED ANNEALING</i>	88
VI.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
CAPÍTULO VII - CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS ...	91
VII.1 CONCLUSÕES	92
VII.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	93
CAPÍTULO VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
ANEXO I: DADOS EXPERIMENTAIS	104

LISTA DE FIGURAS

Figura II.1	Estrutura de uma rede neural do tipo “feedforward”.....	18
Figura III.1	Resultados da simulação para os melhores modelos de crescimento para um único substrato limitante ($ART = 100 \text{ g.L}^{-1}$).....	32
Figura III.2	Resultados da simulação para os melhores modelos de crescimento com termos de inibição por substrato e produto ($ART = 100 \text{ g.L}^{-1}$).....	33
Figura III.3	Resultados da simulação para os modelos de 2 fases ($ART = 85 \text{ g.L}^{-1}$)....	38
Figura III.4	Resultados da simulação para os modelos de 2 fases ($ART = 110 \text{ g.L}^{-1}$)...	40
Figura III.5	Resultados da simulação para os modelos do G-5 com modificação no balanço para produto ($ART = 85 \text{ g.L}^{-1}$).....	45
Figura III.6	Resultados da simulação para os modelos do G-5 com modificação no balanço para produto ($ART = 110 \text{ g.L}^{-1}$).....	47
Figura IV.1	Resultados da simulação com os experimentos do treinamento da rede neural.....	57
Figura IV.2	Resultados da simulação para a validação da rede neural.....	59
Figura V.1	Diagrama esquemático do funcionamento do modelo híbrido.....	66
Figura V.2	Influência do número de neurônios internos no valor da FO para o modelo híbrido.....	68
Figura V.3	Influência do número de neurônios internos na qualidade do ajuste: (a) 5 neurônios internos; (b) 8 neurônios internos.....	69
Figura V.4	Influência do modelo cinético na qualidade do ajuste do modelo híbrido.	71
Figura V.5	Simulação dos resultados do treinamento do modelo híbrido.....	74
Figura V.6	Simulação dos resultados da validação do modelo híbrido: (a) $ART = 90 \text{ g.L}^{-1}$ e (b) $ART = 110 \text{ g.L}^{-1}$	75
Figura VI.1	Ajuste dos modelos fenomenológico (a), empírico (b) e híbrido (c) ($ART = 80 \text{ g.L}^{-1}$).....	82
Figura VI.2	Ajuste dos modelos fenomenológico (a), empírico (b) e híbrido (c) ($ART = 85 \text{ g.L}^{-1}$).....	83
Figura VI.3	Ajuste dos modelos fenomenológico (a), empírico (b) e híbrido (c) ($ART = 100 \text{ g.L}^{-1}$).....	84

Figura VI.4 Ajuste dos modelos fenomenológico (a), empírico (b) e híbrido (c) (ART = 110 g.L⁻¹)..... 85

LISTA DE TABELAS

Tabela II.1	Resumo dos trabalhos recentes publicados referentes a produção de inulinase.....	8
Tabela III.1	Limites dos parâmetros de entrada para o <i>simulated annealing</i> (SA)....	25
Tabela III.2	Modelos cinéticos para um único substrato limitante.....	26
Tabela III.3	Modelos cinéticos com inibição pelo substrato.....	27
Tabela III.4	Modelos cinéticos com inibição pelo produto.....	28
Tabela III.5	Valor da função objetivo (FO) para os 27 modelos cinéticos.....	31
Tabela III.6	Valores dos parâmetros estimados para os modelos cinéticos do G-8...	35
Tabela III.7	Valor da FO e o tempo de mudança de fase para os modelos de 2 fases.....	36
Tabela III.8	Valores dos parâmetros estimados para os modelos de 2 fases.....	42
Tabela III.9	Valor da FO para o G-8 com modificação no balanço para produto.....	44
Tabela III.10	Valores dos parâmetros estimados para os modelos do G-5.....	48
Tabela IV.1	Influência da função de ativação no valor da FO.....	54
Tabela IV.2	Influência do número de entradas no valor da FO.....	56
Tabela V.1	Modelos cinéticos de crescimento microbiano utilizados na modelagem híbrida.....	64
Tabela V.2	Limites dos parâmetros de entrada para o SA.....	64
Tabela V.3	Influência do número de entradas no valor da FO para o modelo híbrido.....	70
Tabela V.4	Influência do modelo cinético no valor da FO para o modelo híbrido...	70
Tabela V.5	Valores dos parâmetros estimados pelas redes neurais no modelo híbrido.....	77
Tabela IX.1	Dados experimentais da produção de inulinase com ART inicial = 60 g.L ⁻¹ , AMM = 69 g.L ⁻¹ , Melaço = 200 g.L ⁻¹	105
Tabela IX.2	Dados experimentais da produção de inulinase com ART inicial = 70 g.L ⁻¹ , AMM = 50 g.L ⁻¹ , Melaço = 250 g.L ⁻¹	105

Tabela IX.3	Dados experimentais da produção de inulinase com ART inicial = 80 g.L ⁻¹ , AMM = 69 g.L ⁻¹ , Melaço = 300 g.L ⁻¹	106
Tabela IX.4	Dados experimentais da produção de inulinase com ART inicial = 85 g.L ⁻¹ , AMM = 80 g.L ⁻¹ , Melaço = 180 g.L ⁻¹	106
Tabela IX.5	Dados experimentais da produção de inulinase com ART inicial = 90 g.L ⁻¹ , AMM = 101 g.L ⁻¹ , Melaço = 200 g.L ⁻¹	106
Tabela IX.6	Dados experimentais da produção de inulinase com ART inicial = 100 g.L ⁻¹ , AMM = 80 g.L ⁻¹ , Melaço = 250 g.L ⁻¹	107
Tabela IX.7	Dados experimentais da produção de inulinase com ART inicial = 110 g.L ⁻¹ , AMM = 101 g.L ⁻¹ , Melaço = 300 g.L ⁻¹	107
Tabela IX.8	Dados experimentais da produção de inulinase com ART inicial = 120 g.L ⁻¹ , AMM = 110 g.L ⁻¹ , Melaço = 250 g.L ⁻¹	107
Tabela IX.9	Dados experimentais da produção de inulinase com ART inicial = 130 g.L ⁻¹ , AMM = 80 g.L ⁻¹ , Melaço = 320 g.L ⁻¹	108

NOMENCLATURA

Letras Romanas:

c, d: Constantes nos modelos cinéticos, h^{-1} .

FO: Função objetivo.

J: Índice de performance ou Função Objetivo.

k_d : constante de inibição, $g.L^{-1}$.

k_i : constante de inibição para o crescimento microbiano em ART, $g.L^{-1}$.

k_s : Constante de Monod para ART, $g.L^{-1}$.

k_p : Constante de inibição pela formação de inulinase, $U.mL^{-1}$.

n: Constante no modelo cinético, adimensional.

P: Concentração de Inulinase, $U.mL^{-1}$.

p^L : Vetor dos limites inferiores para os parâmetros do modelo.

p^U : Vetor dos limites superiores para os parâmetros do modelo.

P_{max} : Máxima concentração de enzimas, $U.mL^{-1}$.

S: Concentração de ART, $g.L^{-1}$.

S_m : Concentração máxima de ART, $g.L^{-1}$.

t: tempo de fermentação, h.

t_0 : tempo inicial de fermentação, h.

t_f : tempo final de fermentação, h.

X: Concentração de células, $g.L^{-1}$.

X_{max} : Máxima concentração de células, $g.L^{-1}$.

Y: Vetor das variáveis de estado calculados pelos modelos.

Y_{exp} : Vetor das variáveis de estado determinados experimentalmente.

$Y_{x/s}$: Coeficiente de rendimento de substrato em células, adimensional.

W, w: Pesos e bias para as redes neurais, adimensional.

Letras Gregas:

α : Coeficiente de formação de produto associado ao crescimento, $U.mL^{-1}$.

β : Coeficiente de formação de produto não-associado ao crescimento, $U.mL^{-1}.h^{-1}$.

θ : Parâmetro associado ao peso de cada variável de estado no cálculo da FO, adimensional.

λ : Coeficiente de desnaturação enzimática, h^{-1} .

μ : Taxa de crescimento específico, h^{-1} .

μ_{max} : Taxa máxima de crescimento específico, h^{-1} .

Abreviações:

AMM: Água de Maceração de Milho.

ART: Açúcar Redutor Total.

FES: Fermentação em Estado Sólido.

FS: Fermentação Submersa.

RNAs: Redes Neurais Artificiais.

SA: *Simulated Annealing*.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A tendência atual no desenvolvimento de novos produtos alimentícios é de que os mesmos apresentem propriedades funcionais e que o seu consumo proporcione algum benefício à saúde. As indústrias de geléias, balas e chocolates, atentas a esta nova tendência de mercado, estão reformulando seus produtos de maneira que atendam às exigências do consumidor. Um dos aspectos diretamente relacionado à saúde humana diz respeito à quantidade de açúcar e gordura presentes nesses alimentos. Uma alternativa para a redução da quantidade de açúcar sem que ocorra perdas no sabor é a adição de frutooligossacarídeos (FOS) como única fonte adoçante (SANGEETHA *et al.*, 2005; POORNA *et al.*, 1995).

Os FOS apresentam inúmeras propriedades funcionais e sua síntese é obtida a partir da sacarose, através da transfrutossilacção, catalisada pela inulinase ou pela β -frutossiltransferase. Nesse sentido, há grande apelo na produção de inulinase para ser usada na síntese dos FOS. Na última década alguns trabalhos têm sido publicados com ênfase na produção dessa enzima (MAZUTTI *et al.*, 2006a, 2006b; SILVA-SANTISTEBAN *et al.*, 2005; ETTALIBI *et al.*, 2001). No entanto, os resultados obtidos referentes à quantidade de enzima produzida não despertou um interesse no aumento da escala de produção. Outra razão que dificulta o aumento de escala para produção de inulinase é o valor dos substratos empregados, os quais elevam muito o custo de produção.

O trabalho de TREICHEL (2004) abordou a produção de inulinase substituindo os meios sintéticos por resíduos agroindustriais empregando a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y – 7571. O desenvolvimento do trabalho possibilitou a obtenção de uma produção de aproximadamente 1300 U.mL⁻¹, apresentando um aumento de 32% na produção em comparação com os meios sintéticos. No entanto, a utilização de resíduos como substrato dificulta a etapa de purificação e separação da enzima. Porém, o trabalho de TREICHEL (2004) mostrou que o pré-tratamento do caldo antes da fermentação facilita a etapa de *downstream* do processo, o que implica na viabilidade econômica do aumento de escala do processo de produção da inulinase.

Uma das ferramentas importantes no aumento de escala de bioprocessos é o desenvolvimento de modelos matemáticos como uma alternativa no projeto, controle e otimização do processo. Tendo em vista os elevados custos da realização de fermentações em escala industrial, torna-se indispensável ter um modelo que consiga descrever

quantitativamente as variáveis relevantes do processo, pois, em muitos casos, o modelo pode minimizar os altos custos e complexidade dos experimentos (VOLESKY e VOTRUBA, 1991).

A partir dos resultados do trabalho de TREICHEL (2004) e com a necessidade de desenvolvimento de modelos matemáticos que possam descrever satisfatoriamente a produção de inulinase, esta dissertação apresenta como seu principal objetivo a modelagem matemática da cinética deste processo. Serão abordadas três técnicas distintas de modelagem: fenomenológica; empírica, baseada em redes neurais artificiais (RNAs); e híbrida, onde as redes neurais fornecem os parâmetros do modelo cinético. Este trabalho se propõe ainda em abordar as principais vantagens e desvantagens de cada técnica de modelagem, através da comparação dos resultados obtidos. Visando atender aos objetivos acima descritos, o presente trabalho está organizado conforme descrito a seguir.

O Cap. II apresenta uma breve revisão bibliográfica sobre os principais assuntos abordados nesta dissertação, com o objetivo de mostrar a necessidade do desenvolvimento de modelos matemáticos na produção de inulinase. São apresentados temas como a importância da inulinase para as indústrias de alimentos, formas de obtenção da enzima e a importância do desenvolvimento de modelos matemáticos. Além disso, são discutidos aspectos relacionados aos métodos de estimação de parâmetros, redes neurais e modelos híbridos.

O Cap. III apresenta o desenvolvimento do modelo fenomenológico, o qual está dividido em três abordagens distintas. Na primeira estratégia é investigado o ajuste de 27 modelos cinéticos de crescimento microbiano, com o objetivo de selecionar o conjunto de modelos que melhor representa o processo. Na segunda estratégia é apresentado o desenvolvimento de um modelo de 2 fases, onde a primeira fase corresponde até 15h e a segunda fase o restante do tempo da fermentação. Os parâmetros do modelo são estimados em cada uma das fases. Na terceira estratégia é apresentada uma modificação na equação de balanço para produto, com o intuito de prever o efeito de desnaturação sofrida pela inulinase em algumas condições experimentais.

O Cap. IV apresenta o desenvolvimento da modelagem empírica do processo, baseada no emprego de RNAs. Será apresentada a influência do número de neurônios internos, número de entradas para a rede e a função de ativação.

O Cap. V apresenta o desenvolvimento da modelagem híbrida do processo. As equações de balanço atuam como o modelo de tendência do processo e as redes neurais fornecem os valores dos parâmetros do modelo. Na parte fenomenológica será apresentada a influência do modelo cinético na qualidade do ajuste e na parte empírica serão apresentados a influência do número de neurônios na camada intermediária e o número de entradas que melhor represente os dados.

O Cap. VI apresenta uma comparação qualitativa dos resultados obtidos nas três técnicas de modelagem. Serão apresentadas as limitações e as principais vantagens de cada método, além de mostrar a evolução na qualidade do ajuste obtida com o desenvolvimento deste trabalho.

No Cap. VII são apresentadas as conclusões obtidas a partir deste trabalho. No Cap. VIII são apresentadas as referências bibliográficas.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II.1 INULINASE

Inulinases são 2,1- β -D frutano furohidrolase (EC 3.2.1.7), as quais hidrolisam a inulina, um polímero de frutose ligadas em β -2,1 encontrada em tubérculos e raízes de plantas, liberando as moléculas de frutose. Além disso, a inulinase possui ação hidrolítica sobre a sacarose (ETTALIBI e BARATTI, 2001). A inulinase encontra aplicação na produção de xaropes com alta concentração de frutose e na produção de frutooligossacarídeos (FOS), os quais têm assumido grande importância como agentes responsáveis pela doçura em alimentos e bebidas (POORNA e KULKARNI, 1995).

O processo convencional da produção de xarope de frutose a partir do amido necessita de três etapas enzimáticas: a ação da α -amilase, amiloglucosidase e glicose isomerase, produzindo apenas 45% de solução de frutose, devido à estequiometria da reação (ETTALIBI e BARATTI, 2001; MAZUTTI *et al.*, 2006b). A separação da frutose desta solução é cara, tornando o processo pouco viável economicamente (SHARMA *et al.*, 2006). A produção de xarope de frutose a partir da hidrólise enzimática da inulina, empregando inulinase como catalisador, possibilita a obtenção de xaropes com até 95% de frutose numa única etapa (ETTALIBI e BARATTI, 2001).

O maior interesse na obtenção de inulinase para as indústrias de alimentos é o potencial desta enzima na produção de frutooligossacarídeos (FOS), principalmente a partir da sacarose, através da transfrutossilacção, catalisada pela inulinase ou pela β -frutossiltransferase (SANTOS, 2002). Os FOS apresentam um número de propriedades funcionais importantes, além de atributos nutricionais que melhoram a “vida de prateleira” e sabor de vários produtos, tornando-os importantes ingredientes na formulação de novos produtos (SANGEETHA *et al.*, 2005).

Em virtude das suas estruturas, os FOS não sofrem atuação das enzimas humanas e, em muitos países, eles são considerados fibras (SANGEETHA *et al.*, 2005). Os efeitos nutricionais e benéficos dos FOS à saúde humana estão relacionados ao estímulo da microflora intestinal, melhora na absorção de minerais, entre outros (ROBERFROID, 1998).

De acordo com SANGEETHA *et al.* (2005), alguns exemplos da aplicação de FOS em alimentos incluem:

- Produção de geléias *light*. Os FOS podem ser adicionados como única fonte adoçante, ocasionando uma redução de 34% no teor calórico comparado com o uso de sacarose.
- Produção de sorvetes. Os FOS podem ser usados para substituir o açúcar e reduzir o teor de gordura. No entanto, o ponto de congelamento do sorvete com FOS é menor comparado quando da adição (ou uso) de açúcar, o que poderá conferir uma textura mais dura.
- Indústria de balas e chocolates. A adição de FOS está associada, principalmente, à redução do valor energético desses alimentos.

Existem duas alternativas para a obtenção da inulinase: extração de vegetais ou produção através de processos fermentativos. A extração de vegetais apresenta um baixo rendimento, o que aumenta o valor comercial da enzima. Uma alternativa para esse impasse é a produção de inulinase através de processos fermentativos, uma vez que bioprocessos apresentam como principais vantagens a facilidade de produção das enzimas, produção contínua durante todo o ano, possibilidade da utilização de substratos de baixo custo, entre outros (TREICHEL, 2004).

A produção industrial de enzimas através de bioprocessos pode ser influenciada por diversos fatores, tais como: seleção de um bom microrganismo, escolha do substrato adequado e controle das variáveis operacionais (físicas, químicas e bioquímicas). A manipulação adequada desses fatores pode levar a um aumento na produção (MAZUTTI *et al.*, 2006a).

Um aspecto muito importante no emprego de microorganismos em processos alimentícios diz respeito ao fato destes pertencerem ao grupo GRAS (Generally Recognized as Safe) e serem aceitos pelo FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos para produtos alimentícios (MAZUTTI *et al.*, 2006b). As Inulinases têm sido produzidas por diversos microorganismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos. A Tabela II.1 apresenta um resumo dos principais microorganismos produtores de inulinase publicados nos últimos anos. A Tabela apresenta ainda os principais substratos empregados e a produção máxima alcançada em cada trabalho.

Tabela II.1: Resumo dos trabalhos recentes publicados referentes a produção de inulinase.

Microorganismos	Substratos	Formas de Cultivo	Produção	Referência
Bactérias				
<i>Staphylococcus</i> sp.	Inulina	FS	618 U/L	SELVAKUMAR <i>et al.</i> (1999b)
<i>Bacillus</i> sp. 11	Inulina, peptona e extrato de levedura	FS	0,4 U/mL	UZUNOVA <i>et al.</i> (2002)
<i>Streptomyces</i> sp. GNDU 1	Inulina, frutose, glicose, sacarose, extrato de levedura, uréia, peptona	FS	0,552 U/mL	GILL <i>et al.</i> (2003)
<i>Streptomyces</i> sp.	Chicória, dália, alho, bagaço de banana, cebola, grãos de trigo e arroz, Inulina pura	FS	524 U/L	SHARMA <i>et al.</i> (2006)
<i>Staphylococcus</i> sp.	Farelo de trigo, arroz, farinha de milho	FES	107.64 U/g	SELVAKUMAR <i>et al.</i> (1999a)
Fungos				
<i>Aspergillus niger</i> 20 Osm	Sacarose, extrato de levedura, NaNO ₃	FS	22,1 U/mL	SKOWRONEK <i>et al.</i> (2006)
<i>Aspergillus ficuum</i> JNSP5-06	Inulina, extrato de levedura	FS	11 U/mL	JING <i>et al.</i> (2003)
Leveduras				
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 16045	Sacarose, peptona, extrato de levedura	FS	127 U/mL	KALIL <i>et al.</i> (2001)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 16045	Sacarose, Extrato de levedura, peptona, K ₂ HPO ₄	FS	176 U/mL	SILVA-SANTISTEBAN <i>et al.</i> (2005)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	Bagaço de cana, AMM	FES	392 U/g	MAZUTTI <i>et al.</i> (2006b)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	Melaço de Cana, AMM, extrato de levedura	FS	1300 U/mL	TREICHEL (2004)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	Melaço de Cana, AMM, extrato de levedura	FS	974 U/mL	MENDES (2006)

Os microrganismos do gênero *Kluyveromyces* têm despertado grande interesse na produção de inulinase por pertencerem ao grupo GRAS e, principalmente, por serem retratados como bons produtores desta enzima. Nos trabalhos apresentados na Tabela II.1 as maiores produções foram alcançadas com estes microrganismos. É importante salientar

o trabalho de TREICHEL (2004), no qual a máxima produção de inulinase foi de 1300 U/mL. Esta produção é aproximadamente 8 vezes maior que a encontrada por SANTISTEBAN-SILVA e MAUGERI (2005) em fermentação submersa e aproximadamente 4 vezes maior que a obtida por MAZUTTI *et al.* (2006b) empregando fermentação em estado sólido. O trabalho de TREICHEL (2004) apresenta uma excelente perspectiva da produção industrial de inulinase empregando resíduos agroindustriais.

Atualmente, as inulinases comerciais são obtidas empregando inulina como substrato, a qual é uma matéria-prima com um alto valor agregado. Os trabalhos apresentados na Tabela II.1 mostram uma forte tendência da substituição da inulina e outros substratos sintéticos por substratos agroindustriais, visando uma diminuição nos custos de produção da enzima. Dentro dos substratos industriais destacam-se os resíduos gerados pelas indústrias de processamento da cana de açúcar e milho, onde o Brasil é conhecido como um dos maiores produtores mundiais.

A produção de cana de açúcar em 2004 foi de 410 milhões de toneladas, enquanto que a produção de milho foi de 42 milhões de toneladas (IBGE, 2004). A produção de cana de açúcar é principalmente direcionada para a produção de álcool etílico, açúcar e aguardente. A produção de milho é direcionada para a produção de ração animal e amido. Durante o processamento do milho e da cana de açúcar são geradas quantidades expressivas de resíduos como bagaço de cana, melaço e água de maceração de milho, os quais apresentam bom potencial para a aplicação em bioprocessos, incluindo a produção de inulinase (GARCIA, 2002).

É importante ressaltar que os trabalhos publicados por MAZUTTI *et al.* (2006a; 2006b) e TREICHEL (2004) usaram resíduos das indústrias de cana de açúcar e milho, obtendo as maiores produções de inulinase, quando comparado com os trabalhos de SILVA-SANTISTEBAN e MAUGERI (2005) e KALIL *et al.* (2001) empregando substratos sintéticos. O trabalho de TREICHEL (2004) reduziu os custos do substrato para a produção de inulinase de R\$ 14,00/L para R\$ 0,28/L, empregando melaço de cana, água de maceração de milho (AMM) e extrato de levedura como substratos. Isto mostra que a produção de inulinase é economicamente atrativa, devido à alta produção de enzima, o baixo custo desses substratos e a grande disponibilidade de matéria-prima.

II.2 MODELAGEM MATEMÁTICA DE BIOPROCESSOS

Um dos objetivos da engenharia bioquímica é o desenvolvimento de métodos para melhorar a capacidade metabólica de microorganismos industrialmente relevantes. Para alcançar este objetivo é necessário fazer uso de processos de manipulação genética do metabolismo celular, bem como melhorar as condições de operação do processo. Dentro de uma perspectiva de engenharia, o desenvolvimento de modelos matemáticos é de fundamental importância para a realização de tais tarefas (WIECHERT, 2002).

Com o desenvolvimento científico e industrial de modernos bioprocessos, melhores métodos de medidas, monitoramento e modelagem tornam-se necessários. Isto é feito com o intuito de gerar informações mais detalhadas sobre o processo, melhorando o controle e o entendimento do mesmo (MANDENIUS, 2004). Nos processos biológicos ao menos duas características são bem distinguíveis: o meio de cultivo e a biomassa. As propriedades das células individuais são determinadas pelos mecanismos de transporte da membrana extracelular, a qual separa o meio extracelular do interior das células, e pelos mecanismos de transportes das membranas intracelulares, as quais são responsáveis pelo metabolismo celular. O metabolismo intracelular é caracterizado por um grande número de etapas de reações reguladas por enzimas intracelulares (HAAG *et al.*, 2005).

Em contraste com a alta complexidade do metabolismo celular, modelos matemáticos simples têm sido desenvolvidos, baseados principalmente, em observações experimentais dos fenômenos, tais como: limitação, ativação, inibição, saturação, consumo de múltiplos substratos, limitações do processo, múltiplos estados estacionários. Estes modelos são geralmente válidos para uma limitada, mas freqüentemente ampla faixa de condições operacionais. O nível de complexidade da descrição matemática do sistema depende da aplicação. Se a proposta de controle do sistema é manter a variável controlada num único valor de referência, geralmente o uso de um modelo linear é suficiente. Porém, mudanças nesse valor de referência necessitariam a derivação de um novo modelo. Em outras aplicações, como no controle de um processo dinâmico, onde há um grande número de condições operacionais, é necessária a formulação de um modelo não linear mais abrangente.

Muito freqüentemente, as propriedades do sistema, tais como constantes de Michaelis ou taxas de reações, não são conhecidas quantitativamente nem qualitativamente. Nesses casos, uma abordagem matemática flexível e sistemática é requerida para encontrar as características do processo. Por outro lado, o modelo deve ser suficientemente geral, com um conjunto de parâmetros capaz de representar bem o fenômeno observado. No entanto, o modelo não deve ter um número excessivo de parâmetros, o que facilita o ajuste aos dados experimentais, porém não confere ao mesmo uma característica geral (HAAG *et al*, 2005b). Um modelo deve ser sempre o mais simples possível e tão complexo quanto o necessário. A complexidade de um modelo crescerá se a abrangência e a eficiência são estendidas. Assim, a complexidade do modelo sempre estará relacionada com o problema a ser resolvido (WIECHERT, 2002).

Segundo VOLESKY e VOTRUBA (1991) a análise do sistema é um método básico para a descrição de fenômenos complexos e interações entre variáveis observadas do processo sob estudo. Na prática, para um sistema fermentativo, a análise do processo é representada pelas seguintes etapas:

- Especificação matemática do problema para dadas condições físico-químicas, bioquímicas e fisiológicas;
- Desenvolvimento de estratégias detalhadas resultando na obtenção de adequados modelos matemáticos representando o processo;
- Síntese dos resultados e projeto das estratégias de otimização para o controle do processo.

No desenvolvimento de modelos matemáticos de bioprocessos devem-se especificar alguns itens que necessitam serem identificados para melhorar a precisão e qualidade dos modelos, tais como (WIECHERT, 2002):

- Compreensão estrutural: Modelos matemáticos devem fornecer todas as informações para que se possa conhecer o comportamento do processo, principalmente, partes essenciais do sistema;
- Simulação: A maior aplicação dos modelos é a exploração do possível comportamento do sistema. A simulação do processo pode levar ao correto

entendimento do comportamento do processo, eliminando hipóteses que possam reproduzir resultados ruins;

- **Análise do sistema:** Baseado num dado modelo matemático é possível obter informações da estrutura do sistema e seu comportamento qualitativo;
- **Predição e Projeto:** Baseado num modelo validado, experimentos futuros podem ser previstos sem a realização dos mesmos. O objetivo desta ferramenta é fornecer embasamento para um projeto racional e eficiente do bioprocessos;
- **Otimização:** Uma vez que os modelos são preditivos e estão disponíveis, o último objetivo da engenharia bioquímica é o cálculo de um projeto metabólico ótimo.

II.3 MODELOS CINÉTICOS DE CRESCIMENTO MICROBIANO

O desenvolvimento de um modelo matemático de um processo fermentativo normalmente inicia a partir de um simplificado esquema de reações advindas do conhecimento das rotas metabólicas envolvidas. Cada etapa da reação metabólica é caracterizada pela reação estequiométrica ou pelo fluxo de componentes, representada pela velocidade de reação ou pela taxa. As taxas de reações em bioprocessos são aproximadas por relações originadas da teoria enzimática ou reações químicas (VOLESKY e VOTRUBA, 1991).

Na literatura são reportados diversos modelos de crescimento microbianos não estruturados e não segregados, ou seja, que consideram uma população homogênea de células com propriedades médias. Os modelos cinéticos não estruturados são equações matemáticas propostas para representar a velocidade específica de crescimento (μ), dispondo de poucas informações a cerca do metabolismo microbiano. De uma maneira geral, os modelos cinéticos são funções da concentração de substrato limitante. No entanto, alguns modelos propostos levam em conta a concentração de células dentro do biorreator, concentração de produto e concentração de inibidor (VOLESKY e VOTRUBA, 1991).

Os modelos cinéticos de crescimento microbiano são divididos em três grandes grupos: único substrato limitante, inibição por substrato e inibição por produto. Dependendo das condições operacionais, do microorganismo, e da forma de operação do

bioprocesso, um ou outro modelo apresenta um melhor desempenho. No entanto, é necessário investigar qual o melhor modelo para representar um determinado processo, uma vez que existem inúmeros modelos não estruturados. Muitos trabalhos publicados têm por objetivo selecionar o melhor modelo cinético.

BIROL *et al.* (1998), trabalhando com a produção de etanol a partir de fermentação de glicose em processo batelada através de células imobilizadas de *Saccharomyces cerevisiae*, testou onze modelos diferentes encontrados na literatura para cultivo com células suspensas livres e a aplicabilidade destes modelos para cultivos com leveduras imobilizadas. Os autores verificaram que os modelos de Monod e de Hinshelwood foram os mais apropriados para descrever o comportamento do crescimento microbiano em concentrações de glicose inicial de 8 a 10%, respectivamente.

ZELIC *et al.* (2004) investigaram a aplicação de 10 modelos cinéticos não estruturados no ajuste do crescimento celular, consumo de substrato e formação de piruvato através de *Escherichia coli* YYC202 em biorreator batelada alimentada. O modelo que melhor descreveu o processo levava em conta a inibição pela formação de produto.

BURHAN *et al.* (2005) determinaram o modelo cinético que melhor representasse o processo de produção da enzima ciclodextrina-glicanotransferase (CGTase). Foram investigados dois modelos cinéticos com inibição pelo substrato: modelo de Andrews e modelo de Aiba. Os resultados apresentados mostraram que o modelo de Andrews melhor representa os dados experimentais, sendo escolhido como o modelo cinético do processo de produção da CGTase.

A literatura é relativamente escassa em relação à modelagem matemática da produção de inulinase. A carência de trabalhos é influenciada, principalmente, pela dificuldade de se estimar os parâmetros do modelo cinético, uma vez que o microrganismo utiliza vários substratos durante a fermentação (MENDES, 2006). O desconhecimento da utilização desses metabólitos primários impede um bom ajuste, mesmo com a utilização de um modelo cinético não estruturado. HENSING *et al.* (1995) desenvolveram um modelo baseado na equação de Monod, descrevendo a relação entre taxa de crescimento específico e taxa de produção de inulinase num biorreator batelada alimentada com alta densidade celular. O modelo descreveu adequadamente a produção de biomassa no biorreator batelada

alimentada. Porém, a produção de enzima foi maior que a predita pelo modelo. Os autores não apresentaram a dinâmica do consumo de substrato do meio, onde a sacarose foi considerada como sendo a única fonte de carbono.

II.4 ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS CINÉTICOS

A estimação de parâmetros cinéticos de modelos biológicos é geralmente muito complexa, principalmente devido a não-linearidade do sistema, grande número de parâmetros e interações entre eles, pouco conhecimento inicial sobre os coeficientes estequiométricos, além de que a grande parte dos problemas de otimização trabalha com funções não convexas (RIVERA *et al.*, 2006). Uma abordagem sistemática é necessária para encontrar a melhor estrutura do modelo e o melhor conjunto de valores para os parâmetros desse modelo, com relação a algumas restrições (HAAG *et al.*, 2005).

A estimação de parâmetros de sistemas dinâmicos não lineares está baseada na minimização da função objetivo (FO), a qual determina o quão bom esta o ajuste do modelo em relação aos dados experimentais, sujeita as restrições da dinâmica do sistema (conjunto de equações diferenciais) e a outras restrições (equações algébricas). Segundo MOLES *et al.* (2003) a formulação matemática do problema de estimação de parâmetros de modelos cinéticos pode ser definida como:

$$\min J \quad (\text{II.2})$$

Sujeita à:

$$\mathbf{f}(\mathbf{z}, \mathbf{y}, \mathbf{p}, t) = 0 \quad (\text{II.3})$$

$$\mathbf{y}(t_0) = \mathbf{y}_0 \quad (\text{II.4})$$

$$\mathbf{h}(\mathbf{z}, \mathbf{y}, \mathbf{p}) = 0 \quad (\text{II.5})$$

$$\mathbf{g}(\mathbf{z}, \mathbf{y}, \mathbf{p}) \leq 0 \quad (\text{II.6})$$

$$\mathbf{p}^L \leq \mathbf{p} \leq \mathbf{p}^U \quad (\text{II.7})$$

onde J é a FO a ser minimizada, \mathbf{p} é o vetor dos parâmetros a serem estimados, \mathbf{y}_{exp} é o vetor dos dados experimentais, $\mathbf{y}(\mathbf{p}, t)$ é o vetor das variáveis de estado calculados pelo modelo, \mathbf{z} é o vetor diferencial das variáveis de estado, \mathbf{f} é o conjunto de equações diferenciais e algébricas descrevendo a dinâmica do sistema e \mathbf{h} e \mathbf{g} são as restrições de igualdade e desigualdade que estão relacionadas com restrições de rota metabólica ou restrições físicas. Finalmente, \mathbf{p} é mantido dentro de um limite inferior e superior, \mathbf{p}^L e \mathbf{p}^U , respectivamente (BIEGLER e GROSSMANN, 2004a).

A formulação acima com restrições algébrico-diferenciais forma um problema de programação não linear. Devido a esta natureza não linear e restrita da dinâmica do sistema, estes problemas apresentam com frequência mínimos locais, apresentado uma FO não convexa. Dessa forma, a resolução desse problema através de métodos locais, provavelmente, a solução encontrada será de natureza local (MOLES *et al.*, 2003). Uma solução para esse impasse é o emprego de métodos globais para a resolução desse problema, os quais tem sido amplamente estudados a partir dos anos 90. Muitos trabalhos publicados retratam as inúmeras vantagens desses métodos em relação aos métodos de otimização local (BANGA *et al.*, 1997; HAAG *et al.*, 2003; FABER *et al.*, 2005).

Métodos de otimização global podem ser classificados em dois grandes grupos: determinísticos e estocásticos. Métodos estocásticos trabalham com uma abordagem probabilística, ou seja, há o envolvimento de elementos aleatórios. Estes métodos somente têm uma garantia probabilística de convergência para a solução global (MOLES *et al.*, 2003; BIEGLER e GROSSMANN, 2004b). A principal vantagem dos métodos estocásticos é a facilidade de implementação e são muito usados em problemas onde há poucas avaliações da FO. Soluções refinadas requerem um alto custo computacional (BANGA *et al.*, 2005). Uma vasta revisão bibliográfica contemplando os métodos estocásticos pode ser encontrada em SCHWAAB (2005).

Métodos determinísticos são aqueles que provém um nível de garantia de convergência, porém não apresenta garantia que o ótimo global será encontrado. Estes métodos apresentaram avanços importantes em certos tipos de problemas de otimização global. Porém, deve ser notado que, apesar dos métodos determinísticos poderem garantir encontrar o ótimo global de alguns tipos de problemas, o esforço computacional associado

umenta rapidamente (frequentemente exponencialmente) com o tamanho do problema, tornando difícil a sua utilização prática e o seu fácil entendimento dentro da indústria (MOLES *et al.*, 2003).

Dentre as técnicas estocásticas de otimização global, o método de *Simulated Annealing* (SA) tem sido amplamente empregado para uma ampla gama de aplicação nas mais diferentes áreas do conhecimento (GENOVESE *et al.*, 2005). O SA é um método de busca direto que pode ser conectado a pacotes de simulação disponíveis. O SA tem sido empregado no projeto e controle de processos químicos, biológicos e alimentícios, mas sua integração com *softwares* comerciais ainda não foi reportada na literatura (LI *et al.*, 2000).

O método do SA foi desenvolvido em 1980 por KIRKPATRICK *et al.* (1983) e é consideravelmente mais simples que abordagens baseadas no gradiente. Particularmente, o SA tem um número de abordagens promissoras (FABER *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2000):

- O algoritmo somente usa o valor da função objetivo, sem o uso de derivadas, não sendo afetado pela descontinuidade do modelo;
- O algoritmo tem um grande potencial de encontrar o ótimo global;
- Sua complexidade é baixa;

FABER *et al.* (2005) apresentam dois estudos de caso da aplicação do SA na otimização de processos. No primeiro estudo de caso é apresentada a otimização dinâmica de um reator batelada visando maximizar a produção de um produto B qualquer. Os resultados mostraram que o SA encontra o mínimo global com um número menor de iterações, quando comparado com os métodos determinísticos.

KOOKOS (2004) usou o *Simulated Annealing* para encontrar o perfil ótimo da vazão de alimentação num biorreator batelada alimentada para a produção de etanol. Além disso, apresenta a possibilidade de utilizar o SA para maximizar o potencial econômico da produção de penicilina. No primeiro caso os resultados obtidos foram significativamente melhores que os reportados na literatura. No segundo caso o SA exibiu uma excelente robustez e a solução foi facilmente encontrada apesar da complexidade da função objetivo.

No trabalho de LI *et al.* (2000) o SA foi acoplado a uma rotina de simulação de processos para determinar a operação ótima de uma coluna de destilação de uma solução

binária. O desenvolvimento desta abordagem permitiu a predição da taxa de refluxo minimizando o tempo de operação para a recuperação do produto.

O uso do SA em bioprocessos está restrito basicamente à determinação do perfil ótimo de alimentação em biorreatores operando no modo batelada alimentada. No entanto, não há na literatura, até o presente, trabalhos que reportam o emprego do SA para a otimização de parâmetros cinéticos de processos biológicos.

II.5 REDES NEURAIS

A aplicação de redes neurais na modelagem e controle de processos vem aumentando nos últimos anos. Seu uso é especialmente útil na modelagem de sistemas complexos ou que apresentam alguma incerteza quanto à cinética ou parâmetros do modelo. Em indústrias químicas e alimentícias, modelos não lineares são requeridos para controle, otimização e predição do comportamento de processos. O desenvolvimento desses modelos é uma tarefa difícil, principalmente quando o processo é complexo ou quando o mesmo é pouco compreendido. A maior vantagem em elaborar um modelo matemático baseado em redes neurais artificiais reside no fato que sua síntese não requer o conhecimento detalhado do processo. Tipicamente, o principal objetivo em desenvolver modelos com redes neurais é o de prever de forma confiável comportamentos transientes e permanentes, de forma a monitorar e melhorar a performance do processo (SIMÕES, 2001).

Redes neurais são métodos matemáticos baseados na estrutura neurológica do cérebro utilizada para criar modelos de entrada/saída do tipo “caixa preta”. Trata-se, portanto de uma técnica de inteligência artificial, cuja característica é o “aprendizado” de uma lógica existente num determinado conjunto de dados e com isso ser capaz de prever valores diferentes daqueles utilizados para o treinamento da rede (SIMÕES, 2001). Os modelos são construídos juntando-se várias funções em camadas ou níveis. Estas funções são chamadas de neurônios e são funções não lineares da combinação linear de entradas (SALAS, 2003).

Cada função ou neurônio tem vários parâmetros que necessitam serem ajustados, para que a rede possa representar devidamente o modelo. O ajuste destes parâmetros é feito

treinando-se a rede neural com dados de entrada e saída do sistema a ser modelado. Os parâmetros são ajustados de modo a reproduzir o sistema a ser modelado, utilizando-se uma técnica de otimização que tem como variáveis independentes os parâmetros e, como função objetivo, a minimização do erro entre o valor de saída medido do sistema e o valor calculado pela rede (SALAS, 2003).

Uma vez atendidos os critérios para o ajuste dos parâmetros, o modelo reproduzirá o comportamento do sistema. No entanto, ressalta-se que a falta de condições para a extrapolação dos dados é uma das principais desvantagens da utilização de redes neurais (SALAS, 2003).

Na definição da arquitetura do modelo podem ser utilizados três tipos de ligações entre neurônios: ligações entre neurônios de uma mesma camada; ligações entre neurônios de camadas diferentes e ligações recorrentes do próprio neurônio. A arquitetura da rede mais utilizada para modelagem de processos químicos, alimentícios e biotecnológicos é a do tipo *feedforward*, com conexão de neurônios de um nível anterior para o posterior. Uma rede neural típica apresenta três camadas de neurônios: camada de entrada (*input*), intermediária (*hidden*) e de saída (*output*). A Figura II.1 apresenta um diagrama esquemático de uma arquitetura de rede do tipo *feedforward* com 3 entradas, 4 neurônios na camada intermediária e 3 saídas (SALAS, 2003).

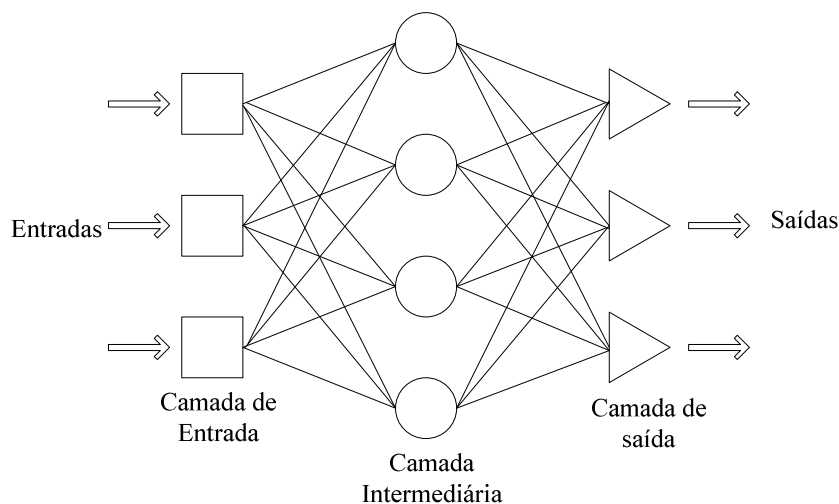


Figura II.1: Estrutura de uma rede neural do tipo *feedforward*

As redes neurais encontraram nos processos biotecnológicos uma vasta área de atuação, devido à dinâmica altamente complexa e não linear. LINKO *et al.* (1997) usaram três diferentes funções de transferência na estimação da atividade de lipase. Com a tangente hiperbólica como função de transferência e variando o número de neurônios na camada intermediária de 5 – 9 houve pouca diferença nos resultados; com uma função sigmoidal mono-polar, 5 neurônios apresentaram melhor efeito; com uma função sigmoidal bipolar 9 neurônios apresentou melhores resultados. No entanto, o R^2 foi próximo a 0,9 em todos os casos.

YE *et al.* (1994) usaram uma rede neural com 5 camadas em combinação com controle *fuzzy feedforward-feedback* de um biorreator batelada alimentada contendo *Escherichia coli* para a produção de β -galactosidade. A mudança no pH do meio de cultura e o crescimento específico foram usados como entradas para a rede neural *fuzzy* calcular a taxa de alimentação de glicose.

BAS *et al.* (2007a) descreveram a aplicação de redes neurais para a determinação da cinética de reações enzimáticas e estimar constantes cinéticas. Uma reação enzimática modelo, a hidrólise da maltose catalisada pela amiloglucosidade, foi realizada num reator batelada. As redes neurais foram treinadas com dados de sete cinéticas e a validação foi realizada com 8 cinéticas. Os resultados obtidos mostraram que as redes neurais foram eficientes na estimação de parâmetros, apresentando melhores resultados em comparação com o método convencional. BAS *et al.* (2007b) usaram redes neurais para estimar a taxa de reação enzimática sem a existência de um modelo cinético. O estudo foi realizado no mesmo sistema descrito acima. A rede neural usada foi do tipo *feedforward* com três entradas, 4 neurônios na camada interna e uma saída. Os resultados obtidos mostraram boa eficiência das redes na regressão dos dados experimentais, apresentando um coeficiente de regressão superior a 0,90 para todas as cinéticas.

DESAI *et al.* (2005) usaram redes neurais para modelar o crescimento de *Sacharomyces cerevisiae* e a produção de β -glucano. As entradas para a rede foram: concentração de glicose, peptona, extrato de levedura, extrato de malte, Mn^{2+} e Mg^{2+} . O erro encontrado entre os valores preditos e experimentais foi inferior a 5% para as duas variáveis de estado.

II.6 MODELOS HÍBRIDOS

Genericamente, um modelo fenomenológico pode ser uma ferramenta poderosa devido a sua ampla faixa de aplicabilidade. Contudo, a necessidade de estimar um grande número de parâmetros e resolver complexos sistemas de equações constitui uma grande desvantagem na sua aplicação (SIMÕES, 2001).

O modelo híbrido busca superar as desvantagens apresentadas nos modelos fenomenológicos e puramente empíricos. A modelagem híbrida visa à fusão de todo o conhecimento do processo com a metodologia das redes neurais. O conhecimento pobre ou desconhecimento de propriedades do processo, como cinéticas reacionais, podem ser minimizados, ou superados, com a adição de metodologias de inteligência artificial, como as redes neurais (SIMÕES, 2001).

A inclusão prévia do conhecimento é investigada como uma maneira de melhorar as predições da rede. O conhecimento prévio do sistema, nesse caso, são as equações do balanço dos fenômenos que se quer representar. A utilização desse modelo fenomenológico, juntamente com uma rede neural, ajuda a controlar a precisão dos resultados dentro da faixa de aceitabilidade de treinamento da rede. De acordo com a literatura, a utilização de conhecimentos prévios aumenta a capacidade de generalização do modelo puramente neural. Sabe-se ainda que a modelagem híbrida necessita de menos dados para a estimativa de parâmetros, produz predições mais consistentes e precisas, além de fornecer predições mais realísticas (SIMÕES, 2001).

ZORZETTO *et al.* (2000) apresentaram uma comparação entre o emprego de redes neurais e modelos híbridos na modelagem do processo de produção de cerveja. Um modelo fenomenológico foi usado para simular o comportamento de uma planta real, sendo adicionados níveis de ruídos aos dados gerados para o modelo com o objetivo de tornar os mesmos mais reais possíveis. Primeiramente, foram usadas 2 redes neurais distintas para modelar o processo. No segundo momento, as equações de balanço foram incorporadas em cada um dos dois modelos baseados nas redes, com o objetivo de gerar modelos híbridos. As redes neurais foram usadas para estimar a taxa de crescimento microbiano. O modelo híbrido apresentou melhores resultados comparados com as redes neurais puras ou modelo fenomenológico.

TEIXEIRA *et al.* (2005) desenvolveram um modelo híbrido com objetivo de minimizar as complexidades do metabolismo de produção do BHK-21 e otimizar as condições de produção. Devido às incertezas apresentadas pelo modelo cinético, as redes neurais foram usadas em paralelo para fornecer um fator de correção desse desvio. Sendo assim, a taxa de reação era fornecida para as equações fenomenológicas. Os resultados obtidos foram satisfatórios, mostrando que o uso de redes neurais como uma alternativa de correção de desvios do modelo cinético do processo é interessante.

COSTA *et al.* (1999) propuseram um modelo híbrido, combinando as equações de balanço de massa com redes neurais do tipo FLN (*Functional Link Networks*) para estimar a taxa de reação da produção de penicilina e etanol em biorreator do tipo batelada alimentada. O modelo híbrido conseguiu prever a dinâmica do processo com precisão.

SILVA *et al.* (2000) propuseram o desenvolvimento de um modelo híbrido como uma alternativa de medidas diretas de processos fermentativos. O processo estudado foi à produção de cefalosporina C em biorreator batelada alimentada. As equações de balanço de massa foram acopladas a uma rede neural do tipo *feedforward*, onde a rede foi usada para estimar o crescimento celular e a taxa de formação de produto, as quais são inseridas nas equações de balanço. Os resultados obtidos encorajam o uso de modelos híbridos no desenvolvimento de algoritmos de controle de processos.

CAPÍTULO III

**MODELAGEM FENOMENOLÓGICA DA
PRODUÇÃO DE INULINASE**

III.1 INTRODUÇÃO

Neste trabalho serão usados os dados experimentais obtidos por TREICHEL (2004). O trabalho abordou a otimização da produção de inulinase em biorreator batelada empregando resíduos agroindustriais como substratos. Os resíduos empregados no trabalho foram: água de maceração de milho (AMM) e melão de cana, além de extrato de levedura. A concentração ótima desses substratos foi determinada empregando a metodologia de planejamentos de experimentos.

O objetivo deste capítulo é apresentar o desenvolvimento e os resultados obtidos com a modelagem fenomenológica para a produção de inulinase em biorreator batelada. Serão apresentadas três estratégias de modelagem. Na primeira será investigada a capacidade de predição de 27 modelos cinéticos, visando a seleção do conjunto de modelos que melhor representa o processo. Na segunda estratégia será investigada a eficácia do emprego de um modelo de 2 fases para o conjunto de modelos selecionados anteriormente. Na terceira estratégia será proposta uma modificação na equação de balanço para produto. Os resultados referentes à otimização dos parâmetros e a simulação para cada uma das estratégias serão apresentados a seguir.

III.2 MODELAGEM MATEMÁTICA E ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS

O desenvolvimento do modelo matemático fenomenológico que descreve a produção de inulinase em biorreator batelada é baseado nas seguintes hipóteses:

- Ausência de gradientes de concentrações dentro do biorreator;
- O balanço energético foi desconsiderado, uma vez que todos os experimentos foram realizados a 36°C;
- O único substrato limitante no meio é a concentração de açúcares redutores totais (ART). Todos os outros nutrientes, tais como: nitrogênio e fatores de crescimento estão em excesso, não incluídos nas equações de balanço;
- O crescimento celular ocorre exclusivamente devido ao consumo de ART;
- A produção de inulinase é parcialmente associada ao crescimento microbiano.

O modelo matemático proposto consiste de um conjunto de equações diferenciais levando em consideração o crescimento microbiano, o consumo de substrato e a produção de enzima, conforme descrito pelas equações III.1 a III.4:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (\text{III.1})$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \mu X \quad (\text{III.2})$$

$$\frac{dP}{dt} = (\alpha\mu + \beta) X \quad (\text{III.3})$$

$$\mu = \mathbf{f}(X, S, P, \mathbf{p}) \quad (\text{III.4})$$

Os parâmetros das equações (III.1 – III.4) foram estimados usando o algoritmo *Simulated Annealing* (SA) (KIRKPATRICK *et al.*, 1983), o qual vem sendo modificado pelo grupo de Modelagem e Simulação de Processos da URI – Campus de Erechim. As equações do modelo foram resolvidas numericamente através do pacote LIMEX (DEUFLHARD *et al.*, 1987), usando o conjunto de parâmetros manipulados pelo SA. Os valores calculados para cada variável de estado ($\mathbf{y}_{i,calc}$) foram comparados com os dados experimentais (\mathbf{y}_i) de maneira a minimizar o erro quadrático. A formulação do problema de estimação de parâmetros está colocado na forma de III.5:

$$FO = \sum_{i=1}^n (\mathbf{y}_i - \mathbf{y}_{i,calc})^2 \quad (\text{III.5})$$

Os valores das variáveis de estado calculados e experimentais usados no cálculo da FO foram normalizados entre 0 e 1, devido a diferenças na ordem de grandeza. Durante a etapa de estimação dos parâmetros foi usado um conjunto experimental composto por 7 experimentos com concentração de ART variando de 60 g.L⁻¹ a 130 g.L⁻¹. Para a validação do modelo foram usados 2 experimentos adicionais com concentração de ART de 80 g.L⁻¹ e 110 g.L⁻¹. Os dados experimentais usados no desenvolvimento deste trabalho encontram-se detalhados no Anexo I.

A Tabela III.1 apresenta os intervalos especificados para os valores dos parâmetros dos modelos usados no ajuste. Os limites dos parâmetros $Y_{x/s}$, α , β , P_{\max} , S_m e S_{crit} foram determinados a partir da observação dos resultados experimentais. Em virtude da limitação de trabalhos focando a modelagem da produção de inulinase, os limites dos demais parâmetros foram ajustados a partir da modelagem da produção de outras enzimas. Sendo assim, para garantir que os valores desses parâmetros apresentem um significado condizente com o processo da produção de inulinase a faixa escolhida foi suficientemente ampla.

Tabela III.1: Limites dos parâmetros de entrada para o *Simulated Annealing* (SA)

Parâmetros	Limite Inferior	Limite Superior
$Y_{x/s}$ (-)	0,1	0,8
α (U.mL ⁻¹)	2,5	35,0
β (U.mL ⁻¹ .h ⁻¹)	0,0	12,0
λ (-)	0,0	2,0
μ_{\max} (h ⁻¹)	0,0	1,5
k_s (g.L ⁻¹)	0,0	100,0
k_i (g.L ⁻¹)	0,0	100,0
k_p (U.mL ⁻¹)	0,0	100,0
S_{crit}, S_m (g.L ⁻¹)	60,0	130,0
P_{\max} (U.mL ⁻¹)	100,0	1500,0
n (-)	0,0	2,5

Os modelos cinéticos de crescimento microbianos investigados neste trabalho foram selecionados da literatura. A Tabela III.2 apresenta os modelos cinéticos para um único substrato limitante, totalizando 12 modelos. Os modelos 1 a 8, além dos modelos 10 e 11 levam em conta a concentração de substrato no meio, baseado na concentração de ART. O modelo 9 é uma relação empírica para o crescimento microbiano que leva em conta o tempo de fermentação. O modelo 12 é uma equação logística baseada na máxima concentração de células dentro do biorreator.

Tabela III.2: Modelos cinéticos para um único substrato limitante

Modelos	Modelo Cinético	Referência
1	$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{k_s + S} \right)$	GONZÁLEZ, 2004
2	$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \exp \left(\frac{-S}{k_s} \right) \right)$	GONZÁLEZ, 2004
3	$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S^n}{k_s + S^n} \right)$	GONZÁLEZ, 2004
4	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{k_s X + S}$	SCHIMIDELL, 2001
5	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{k_s + k_d + S}$	SCHIMIDELL, 2001
6	$\mu = \mu_{\max} \left(\exp \left(\frac{-S}{k_s} \right) \right)$	VOLESKY e VOTRUBA, 2001
7	$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{k_s}{k_s + S} \right)$	VOLESKY e VOTRUBA, 2001
8	$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{k_s}{k_s + S^n} \right)$	VOLESKY e VOTRUBA, 2001
9	$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{1}{1 + \frac{c \cdot \exp(d \cdot t)}{\mu_{\max} - c}} \right)$	AMRANE <i>et al.</i> , 1999
10	$\mu = \mu_{\max} S$	VOLESKY e VOTRUBA, 2001
11	$\mu = \mu_{\max} S^n$	VOLESKY e VOTRUBA, 2001
12	$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right)$	WANG <i>et al.</i> , 2006

A Tabela III.3 apresenta os modelos cinéticos de crescimento com inibição pelo substrato, totalizando 10 modelos. Os modelos 13 a 17, além dos modelos 19 e 20 levam em conta a inibição ocasionada pelas altas concentrações iniciais de ART. O modelo 18 leva em conta a concentração máxima de substrato no meio. O modelo 21 assume que a inibição pelo substrato ocorre quando a concentração for superior a um limite crítico. O modelo 22 combina termos de inibição por substrato e produto simultaneamente.

Tabela III.3: Modelos cinéticos com inibição pelo substrato

Modelos	Modelo Cinético	Referência
13	$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{k_s + S + \frac{S^2}{k_i}} \right)$	GONZÁLEZ, 2004
14	$\mu = \frac{\mu_{\max}}{1 + \frac{k_s}{S} + \left(\frac{S}{k_i}\right)^n}$	SCHIMIDELL, 2001
15	$\mu = \mu_{\max} \frac{S \left[1 + \left(\frac{S}{k_i}\right) \right]}{k_s + S + \left(\frac{S^2}{k_i}\right)}$	GOKULAKRISHNAN <i>et al.</i> , 2006
16	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{(k_s + S) \left(1 + \frac{S}{k_i} \right)}$	GOKULAKRISHNAN <i>et al.</i> , 2006
17	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{(k_s + S)} \exp\left(\frac{-S}{k_i}\right)$	GOKULAKRISHNAN <i>et al.</i> , 2006
18	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{(k_s + S)} \left(1 - \frac{S}{S_m} \right)^2$	GOKULAKRISHNAN <i>et al.</i> , 2006
19	$\mu = \mu_{\max} \left[\exp\left(\frac{-S}{k_i}\right) - \exp\left(\frac{-S}{k_s}\right) \right]$	GOKULAKRISHNAN <i>et al.</i> , 2006
20	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{(k_s + S)} \exp\left(\frac{-S}{k_i}\right)$	VELIZAROV <i>et al.</i> , 1998
21	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{(k_s + S)} - k \left(\frac{S}{S_{\text{crit}}} \right)$	VELIZAROV <i>et al.</i> , 1998
22	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{\exp(k_i \cdot P) \left(k_s + S + \left(\frac{S^2}{k_i}\right) \right)}$	GONZÁLEZ, 2004

A Tabela III.4 apresenta os modelos cinéticos de crescimento com inibição pelo produto, totalizando 5 modelos. Os modelos 23, 24 e 27 consideram que altas concentrações de inulinase atuam como um inibidor do processo. Os modelos 25 e 26 levam em consideração a concentração máxima de produto.

Tabela III.4: Modelos cinéticos com inibição pelo produto

Modelos	Modelo Cinético	Referência
23	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{(k_s + S)} \left(\frac{k_p}{k_p + P} \right)$	GONZÁLEZ, 2004
24	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{(k_s + S)} \exp(-k_p P)$	SCHIMIDELL, 2001
25	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{(k_s + S)} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)$	GONZÁLEZ, 2004
26	$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)$	SCHIMIDELL, 2001
27	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{(k_s + S)} (1 - k_p P)$	GONZÁLEZ, 2004

A seguir serão apresentadas algumas estratégias de modelagem aplicadas nesse trabalho, as quais visam selecionar o modelo cinético que melhor representa o processo de produção de inulinase, ajustando de forma satisfatória os dados experimentais. Foram desenvolvidas três estratégias de modelagem, as quais encontram-se melhor detalhadas no decorrer do texto.

III.2.1 Estratégia 1: Seleção Preliminar dos Modelos Cinéticos

O objetivo deste estudo foi realizar uma seleção preliminar do conjunto de modelos cinéticos que melhor representa o processo, eliminando modelos que apresentem um ajuste pouco representativo. Os critérios utilizados na escolha do conjunto de modelos que melhor representa o processo estão baseados em:

- Na análise do valor da FO. Se a FO apresentar um valor superior à 5,0 o modelo será eliminado, por não representar de maneira satisfatória o processo;
- Na análise do valor do coeficiente de regressão;
- Na análise da qualidade do ajuste dos dados experimentais da validação.

Os modelos cinéticos selecionados nesta etapa serão usados nas estratégias subsequentes.

III.2.2 Estratégia 2: Modelo de Duas fases

O emprego de um modelo de duas fases para prever o comportamento de bioprocessos em batelada já foi apresentado por CHUNG *et al.* (2005). Neste trabalho, os autores apresentaram um modelo de duas fases para estimar os parâmetros durante a fase *lag* de crescimento e para o restante do período da fermentação, obtendo uma melhora significativa no ajuste quando comparada com o emprego de um modelo de uma fase.

Os dados experimentais da produção de inulinase apresentados no Anexo I desta dissertação mostram que até 12h de fermentação ocorre um consumo pronunciado de açúcar no meio sem que ocorra um aumento apreciável na concentração celular e na produção da enzima. Isto indica que, provavelmente, no início da fermentação tem-se um baixo valor de $Y_{x/s}$ e um baixo valor de α e β . Sendo assim, a 2ª estratégia de modelagem tem por objetivo dividir a etapa de estimação dos parâmetros em 2 fases. A primeira fase compreende as primeiras 15h (onde ocorre rápido consumo de substrato) e a segunda fase compreende o restante da fermentação (onde a velocidade de consumo é reduzida). Dessa forma, os parâmetros dos 8 modelos selecionados na 1ª estratégia serão estimados em cada uma das fases. Os parâmetros dos modelos selecionados anteriormente foram estimados, levando-se em conta as duas fases. O tempo em que ocorre a transição entre uma fase e outra varia de modelo para modelo e foi ajustado por tentativa e erro.

III.2.3 Estratégia 3: Modificação do Balanço para Produto

O balanço para produto da forma como está colocado consegue prever apenas que o sistema possa entrar em regime, não conseguindo prever a perda de atividade nos períodos finais de fermentação. Sendo assim, a 3ª estratégia de modelagem propõe uma modificação na equação de balanço para produto, adicionando um termo que leva em conta a desnaturação. Como são desconhecidas as causas da desnaturação, este novo termo é somente função do tempo de fermentação. Os parâmetros dos 8 modelos cinéticos foram estimados levando-se em conta a modificação proposta. A nova equação proposta é a seguinte:

$$\frac{dP}{dt} = (\alpha\mu + \beta)X - \exp(\lambda t) \quad (\text{III.6})$$

onde o termo $\exp(\lambda t)$ representa um termo de desnaturação enzimática e λ é um parâmetro ajustável. Os parâmetros dos modelos cinéticos selecionados anteriormente foram estimados, levando-se em conta esta modificação.

III.3 RESULTADOS DA MODELAGEM FENOMENOLÓGICA

Esta seção apresenta os resultados da modelagem fenomenológica da produção de inulinase referentes à escolha do modelo cinético adequado, estimação de parâmetros e simulação dos melhores resultados. Os resultados serão apresentados conforme proposto anteriormente pelas três estratégias de modelagem.

III.3.1 Estratégia 1: Seleção Preliminar dos Modelos Cinéticos

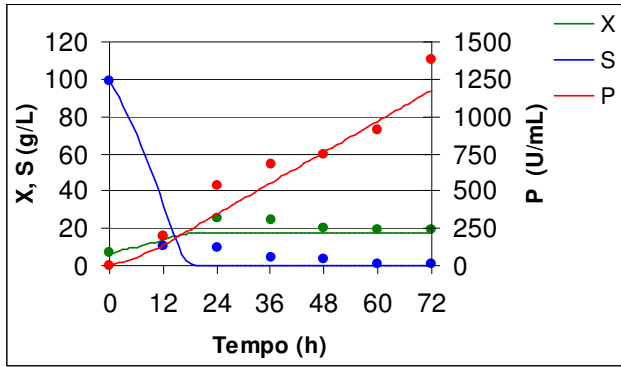
Com o objetivo de selecionar o conjunto de modelos cinéticos que melhor descreve o processo, foram estimados os parâmetros para os 27 modelos descritos nas Tabelas III.2, III.3 e III.4. A Tabela III.5 apresenta os resultados referentes ao valor da Função Objetivo (FO) para cada modelo e o valor do coeficiente de regressão (r) para os modelos que apresentaram o valor da FO abaixo de 5,0. O coeficiente de regressão (r) foi calculado somente na condição experimental com concentração inicial de $\text{ART} = 100 \text{ g.L}^{-1}$, uma vez que nesta condição ocorreu o melhor ajuste.

Os resultados referentes ao valor da FO apresentados na Tabela III.5 indicam que os modelos 3, 6 a 9, 12, 17, 19 a 22, 24 e 26 possuem baixa capacidade de predição da dinâmica do processo, apresentando um alto valor de FO. Os modelos restantes apresentaram o valor da FO muito próximos entre eles, dificultando na escolha do modelo cinético adequado. No entanto, há a necessidade de reduzir o número de modelos com potencial para representar à cinética de produção da inulinase. Uma alternativa para auxiliar na escolha foi utilizar o valor do coeficiente de regressão para os modelos com FO menor que 5,0.

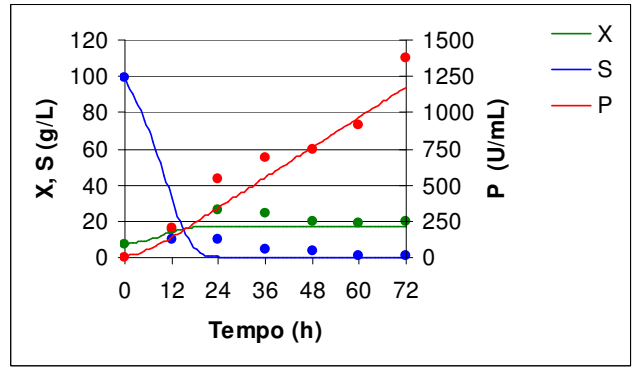
Tabela III.5: Valor da FO para os 27 modelos cinéticos

Modelos	FO	Coeficiente de Regressão (r)		
		X	S	P
1	4,59	0,640	0,960	0,960
2	4,58	0,640	0,960	0,960
3	5,58	-	-	-
4	4,62	0,640	0,950	0,960
5	4,66	0,640	0,960	0,960
6	37,80	-	-	-
7	28,18	-	-	-
8	18,49	-	-	-
9	7,18	-	-	-
10	4,85	0,600	0,960	0,960
11	4,80	0,610	0,950	0,960
12	7,32	-	-	-
13	4,84	0,640	0,980	0,960
14	4,66	0,640	0,970	0,960
15	4,65	0,640	0,960	0,960
16	4,77	0,640	0,980	0,960
17	5,12	-	-	-
18	4,87	0,500	0,990	0,960
19	5,01	-	-	-
20	5,12	-	-	-
21	5,26	-	-	-
22	5,26	-	-	-
23	4,44	0,650	0,970	0,970
24	5,13	-	-	-
25	4,59	0,660	0,940	0,960
26	11,24	-	-	-
27	4,67	0,660	0,940	0,960

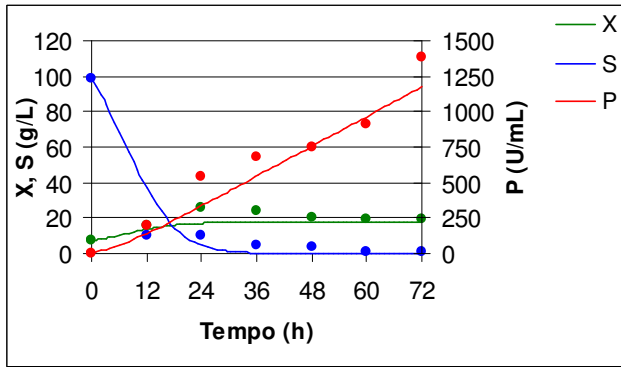
Para todos os 14 modelos que apresentaram um valor da FO abaixo de 5,0 o coeficiente de regressão apresentou-se muito próximo entre eles. No entanto, estes valores de r obtidos no ajuste da concentração celular, substrato e produto para os 14 modelos não puderam ser considerados satisfatórios, pois nenhum modelo conseguiu representar de forma satisfatória a cinética do processo. As Figuras III.1 e III.2 apresentam o resultado da previsão empregando o conjunto de parâmetros estimados de cada um dos 14 modelos para a condição experimental com $ART = 100 \text{ g.L}^{-1}$.



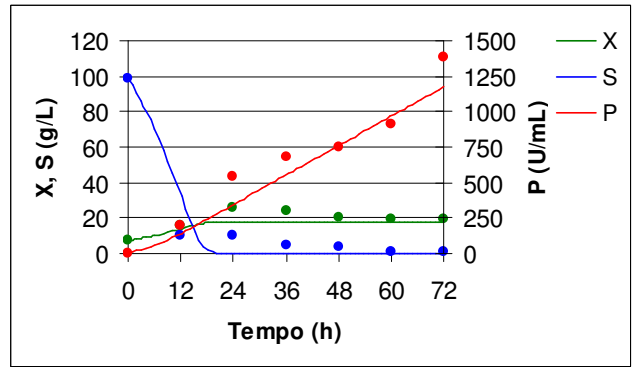
Modelo 1



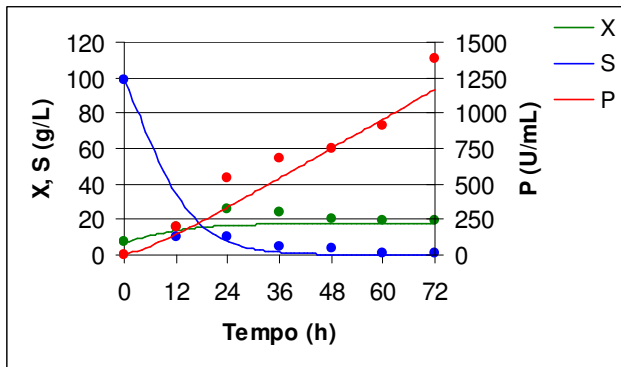
Modelo 2



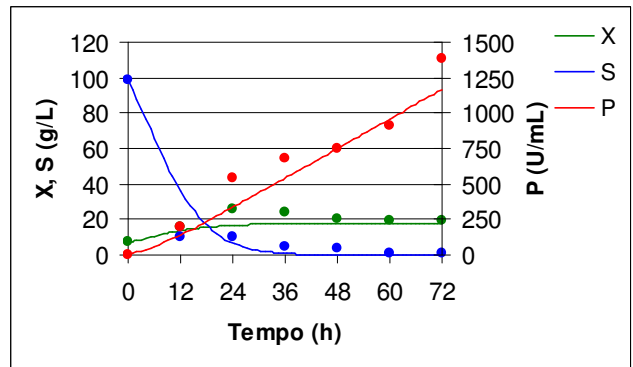
Modelo 4



Modelo 5



Modelo 10



Modelo 11

Figura III.1: Resultados da simulação para os melhores modelos de crescimento para um único substrato limitante ($ART = 100 \text{ g.L}^{-1}$).

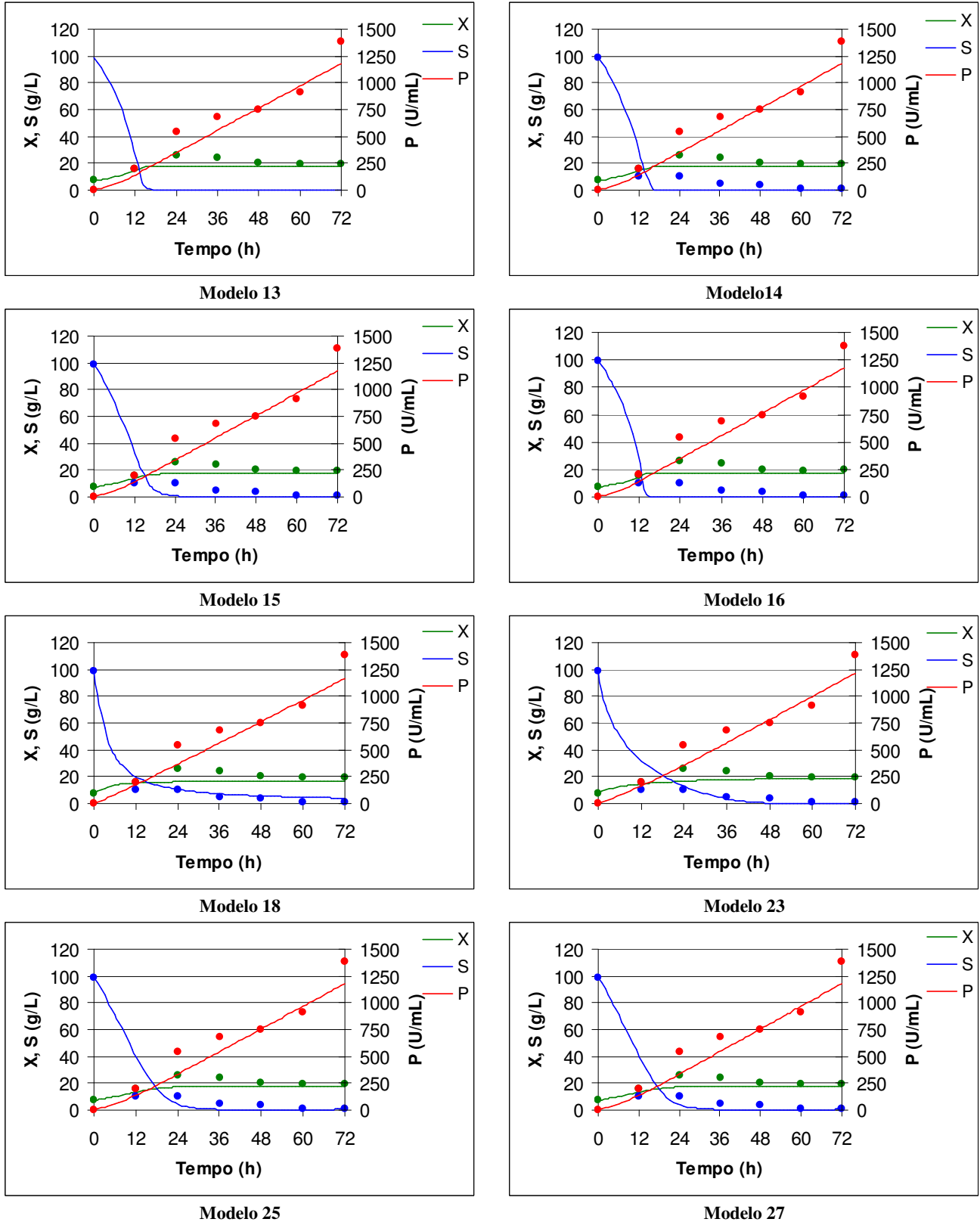


Figura III.2: Resultados da simulação para os melhores modelos de crescimento com termos de inibição por substrato e produto ($ART = 100 \text{ g.L}^{-1}$).

Como os critérios estabelecidos para a seleção do conjunto de modelos cinéticos não conseguiram reduzir satisfatoriamente o número de modelos, uma análise qualitativa dos resultados apresentados nas Figuras III.1 e III.2 foi realizada. A partir do valor do coeficiente de regressão (r) para células na Tabela III.2 e da previsão apresentada nas Figuras III.1 e III.2, pode ser verificado que nenhum dos 14 modelos conseguiu representar o crescimento celular. A mesma análise realizada para células é válida para a formação de produto. Porém, foi analisado com maior cuidado o ajuste para substrato. A partir do coeficiente de regressão não foi possível excluir nenhum modelo, devido à proximidade entre os valores. No entanto, uma análise detalhada das previsões apresentadas nas Figuras III.1 e III.2 permitiu realizar uma seleção qualitativa.

Os dados experimentais da cinética de consumo de substrato mostram que em até 12h de fermentação ocorre o consumo de aproximadamente 90% do ART do meio. Após esse período, ocorre uma diminuição considerável na velocidade de consumo. Assim, alguns modelos cinéticos apresentam muitas dificuldades em representar este comportamento, como é o caso dos modelos 1, 2, 5, 13, 14 e 16 que em torno de 15h de fermentação prevê o esgotamento total de ART no meio. Por outro lado, os modelos 4, 10, 11, 15, 18, 23, 25 e 27 conseguem representar um pouco melhor a dinâmica do processo.

A partir dessa análise visual e qualitativa foi possível identificar um conjunto de oito modelos como prováveis modelos do processo, sendo os modelos de número 4, 10, 11, 15, 18, 23, 25 e 27. Este grupo de 8 modelos será denominado a partir dessa etapa do trabalho de G-8. A partir desse momento todos os testes e estratégias de modelagem estarão baseados nesse conjunto reduzido de modelos. É importante salientar que a redução de 14 para 8 modelos cinéticos ocorreu de uma forma qualitativa e visual, a partir dos resultados das simulações apresentadas nas Figuras III.1 e III.2. A Tabela III.6 apresenta um resumo dos parâmetros otimizados usando o SA para os 8 modelos cinéticos selecionados.

Tabela III.6: Valores dos parâmetros estimados para os modelos cinéticos do G-8

Modelos	4	10	11	15	18	23	25	27
Y_{xs}	0,11	0,11	0,11	0,10	0,10	0,11	0,11	0,11
α	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
β	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
μ_{max}	0,09	$8,7 \times 10^{-4}$	0,01	0,06	$2,0 \times 10^{-5}$	0,38	0,08	0,08
k_s	3,50	-	-	29,96	$9,0 \times 10^{-6}$	2,72	29,94	27,90
n	-	-	0,89	-	-	-	-	-
k_i	-	-	-	12,28	-	-	-	0,01
k_p	-	-	-	-	-	8,55	-	-
P_{max}	-	-	-	-	-	-	832,44	-
S_{crit}	-	-	-	-	83,79	-	-	-

Alguns valores de parâmetros apresentados na Tabela III.6 não apresentam significado biológico. Apesar dos limites máximos de cada parâmetro serem especificados dentro de uma faixa com significado biológico, os limites mínimos não apresentaram esta característica, devido à falta de informações sobre o comportamento do microorganismo *Kluyveromyces marxianus* NRRL-Y 7571. Por exemplo, o parâmetro μ_{max} apresentou um valor com significado biológico apenas no modelo 23. Nos demais modelos o valor desse parâmetro encontra-se bem abaixo para o valor médio de crescimento de uma levedura. O parâmetro $Y_{x/s}$ apresentou um valor com significado biológico para todos os modelos. O parâmetro α apresentou a tendência de se aproximar do limite mínimo especificado, indicando que a produção associada ao crescimento apresenta um valor menor que o especificado, explicando o fato de aproximar linearmente a formação de produto.

III.3.1.1 Perspectivas Futuras

Visando melhorar o ajuste dos 8 modelos aos dados experimentais e, selecionar o melhor modelo cinético, foi desenvolvida uma segunda estratégia que consiste em estimar um conjunto de parâmetros para as primeiras horas de fermentação e um segundo conjunto de parâmetros para o restante da fermentação. Os resultados obtidos nesta nova estratégia estão apresentados a seguir.

III.3.2 Estratégia 2: Modelo de 2 Fase

A Tabela III.7 apresenta os resultados referentes ao valor da Função Objetivo (FO) após a otimização dos parâmetros para o G-8 e o tempo considerado em que ocorreu a mudança de fase. Foi considerado que a mudança entre as duas fases do modelo ocorre entre 11h e 15h, compreendendo o período onde o consumo de substrato é acelerado. O valor mínimo da FO foi encontrado para o modelo 15, o qual leva em conta um termo de inibição por substrato. Da mesma forma que para a estratégia anterior, há pouca variação entre os valores de FO para os 8 modelos, inviabilizando a escolha de um conjunto menor de modelos prováveis do processo.

Tabela III.7: Valor da FO e o tempo de mudança de fase para os modelos de 2 fases

Modelos	FO	Tempo de Mudança de fase (h)
4	4,07	13
10	4,85	12
11	4,58	13
15	3,84	14
18	4,72	12
23	4,12	11
25	3,99	13
27	3,91	15

Comparando os resultados apresentados nas Tabelas III.5 e III.7, com relação ao valor da FO, nota-se uma melhora com o modelo de 2 fases, havendo uma diminuição para 7 dos 8 modelos estudados, pois o modelo 10 não apresentou diferença entre as duas estratégias. Estes resultados mostram uma melhora no ajuste. Paralelamente a análise do valor da FO, é necessário comparar os resultados da simulação empregando os parâmetros estimados de cada modelo. A seguir serão apresentados os gráficos referentes à simulação em duas condições experimentais para todos os modelos. Uma condição experimental usada durante a estimação dos parâmetros e uma condição experimental usada apenas para a validação dos modelos.

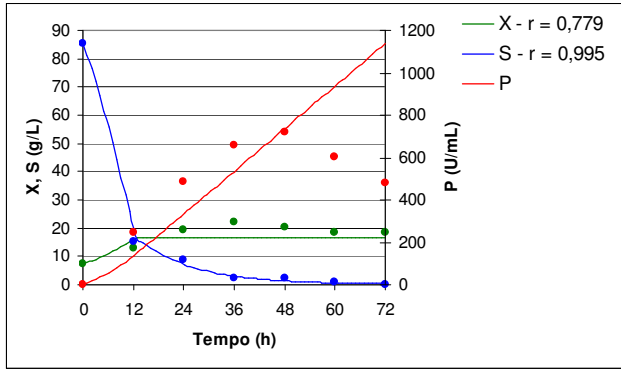
A Figura III.3 apresenta os resultados da simulação na fermentação com concentração inicial de ART de 85 g.L^{-1} para o G-8. Esta condição experimental foi usada durante a estimação dos parâmetros dos modelos. Em cada um dos 8 gráficos da Figura III.3 são apresentados os valores dos coeficientes de regressão (r) para o crescimento microbiano, consumo de substrato e formação de produto. Em casos onde o valor de r foi inferior a 0,500 optou-se por não apresentá-lo, qualificando-se como um ajuste insatisfatório.

O ajuste para a formação de produto apresentado na Figura III.3 indica que nenhum modelo fenomenológico conseguiu representar a cinética da produção, tendência esta já observada durante a aplicação da estratégia 1. Todos os modelos estão aproximando a formação da enzima de uma maneira linear. Observando a fermentação até 48h de fermentação chega-se à conclusão que uma reta aproximaria bem a produção. No entanto, a partir de 48h ocorre à inativação da enzima, ocasionando uma redução na sua produção. Mesmo com a realização da estratégia 2 o ajuste para produto manteve-se semelhante aos resultados obtidos anteriormente. O coeficiente de regressão foi inferior a 0,500 para todos os modelos.

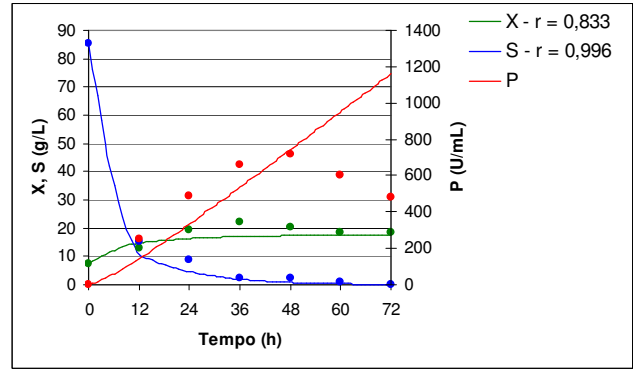
O ajuste para o crescimento microbiano apresentado na Figura III.3 foi razoável, com um valor de r próximo a 0,800 para todos os modelos. É importante ressaltar que a qualidade do ajuste apresentada por estes modelos é ainda insatisfatória, pois nenhum modelo conseguiu estimar a concentração máxima de células obtida durante a fermentação. A fase onde ocorre à redução na massa celular não foi representada por nenhum modelo.

O emprego de um modelo de duas fases apresentou melhores resultados no ajuste para o consumo de substrato, explicando a diminuição no valor da FO da estratégia 2 quando comparada com a estratégia 1. A Figura III.3 mostra um alto valor para o coeficiente de regressão em todos os modelos. Os modelos 4, 10 e 23 ajustaram de maneira satisfatória o consumo de substrato e conseguiram representar melhor a cinética.

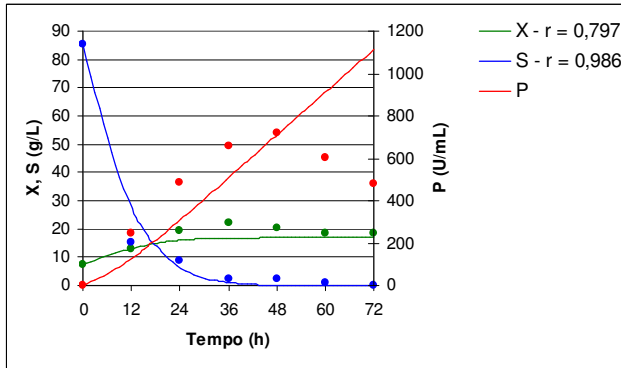
CAP. III – MODELAGEM FENOMENOLÓGICA



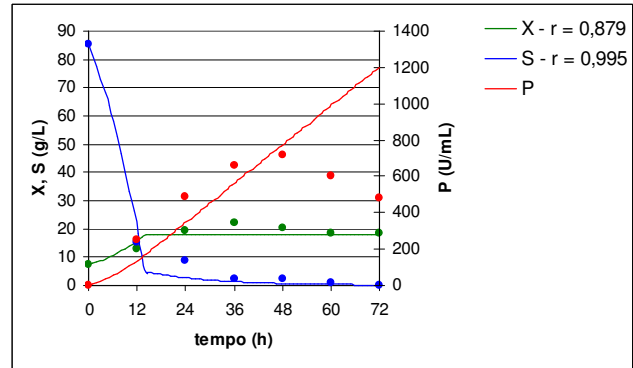
Modelo 4



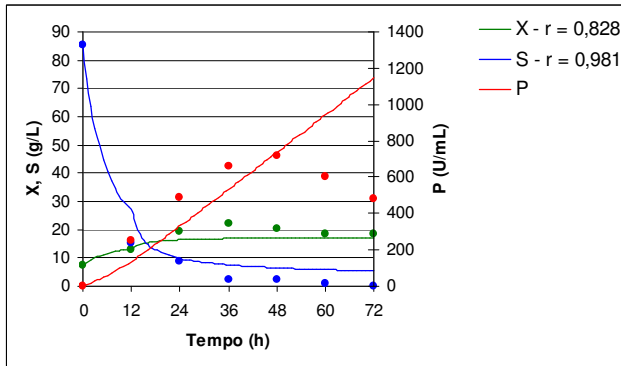
Modelo 10



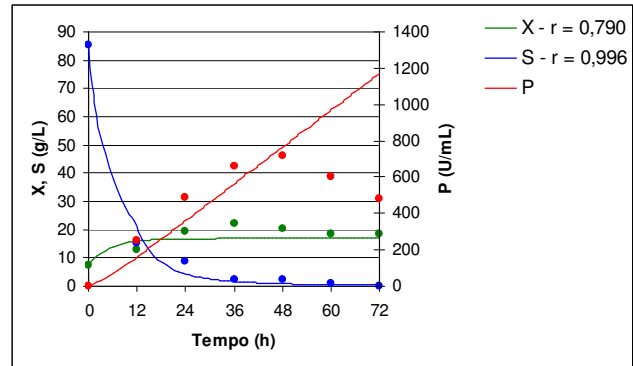
Modelo 11



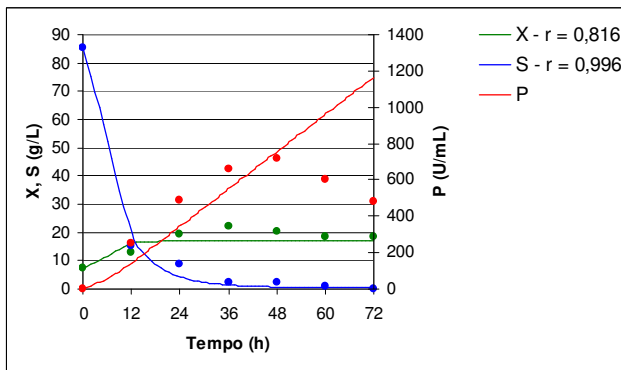
Modelo 15



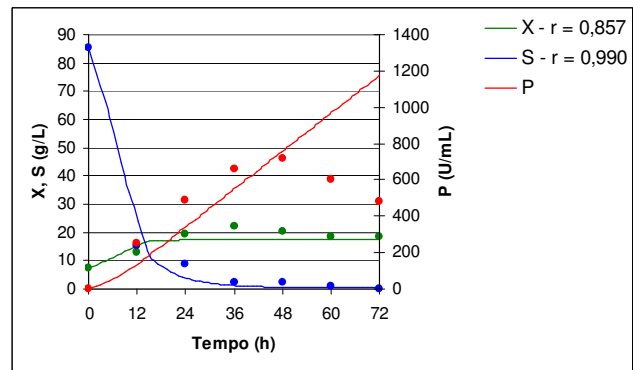
Modelo 18



Modelo 23



Modelo 25



Modelo 27

Figura III.3: Resultados da simulação para os modelos de 2 fases ($ART = 85 \text{ g.L}^{-1}$).

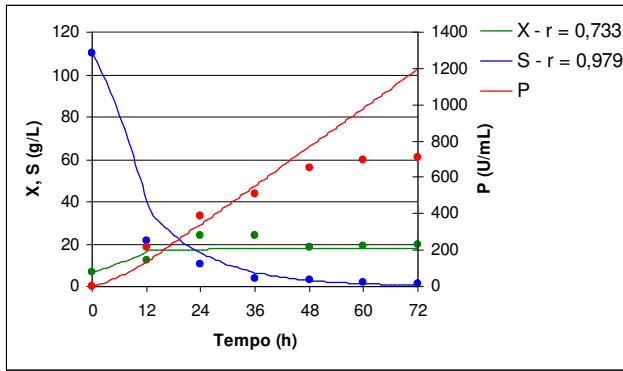
A Figura III.4 apresenta os resultados da simulação no experimento com concentração inicial de ART de 110 g.L^{-1} . Esta condição experimental foi usada somente na validação dos parâmetros dos modelos. Em cada um dos 8 gráficos da Figura III.4 são apresentados os valores dos coeficientes de regressão (r) para o crescimento microbiano, consumo de substrato e formação de produto. Em casos onde o valor de r foi inferior a 0,500 optou-se por não apresentá-lo, qualificando-se como um ajuste de má qualidade.

Os resultados apresentados na Figura III.4 são similares aos apresentados anteriormente, para a condição experimental de 85 g.L^{-1} . Novamente, nenhum modelo conseguiu representar o crescimento celular de forma satisfatória e aceitável. A formação de produto apresentou um coeficiente de regressão abaixo de 0,500 em todos os modelos do G-8 e, continua apresentando um comportamento aproximadamente linear. Os modelos testados não estão conseguindo atingir o regime, mesmo com a diminuição da velocidade de crescimento, devido aos altos valores dos parâmetros α e β .

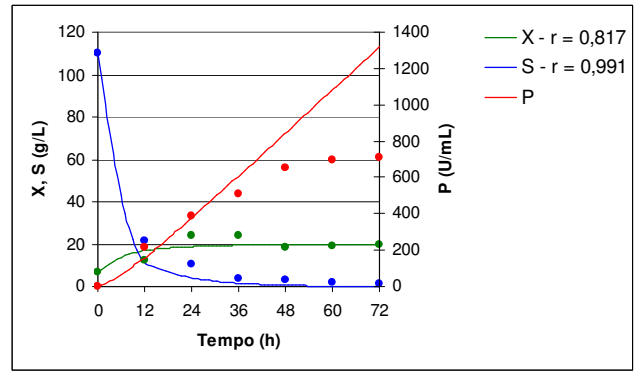
A estratégia de adotar um modelo de 2 fases apresentou um resultado satisfatório para a cinética de consumo de substrato. Em todas as condições experimentais testadas (inclusive as que não estão apresentadas nessa dissertação) houve uma melhora significativa no ajuste. Esses resultados mostram claramente que há uma mudança na velocidade de consumo de ART após as primeiras 15h de fermentação. No entanto, o ajuste para a formação de produto e para o crescimento microbiano não apresentou melhora significativa.

Os resultados obtidos até esse momento, após o desenvolvimento das estratégias 1 e 2 da modelagem fenomenológica, indicam que está faltando no balanço de material algum produto ou substrato secundário que possa melhorar o ajuste para o crescimento microbiano para produção de inulinase. Analisando os dados experimentais no Anexo I percebe-se que, mesmo após o consumo total de ART, ainda há crescimento celular. No desenvolvimento das estratégias de modelagem, nenhum modelo conseguiu atingir a concentração máxima de células obtidas experimentalmente. Os modelos conseguem prever apenas o crescimento celular até o momento que há ART no meio, pois foi assumido que este seria o único substrato usado como fonte de carbono pelos microrganismos. No entanto, a concentração máxima obtida experimentalmente chega ser até 40% menores.

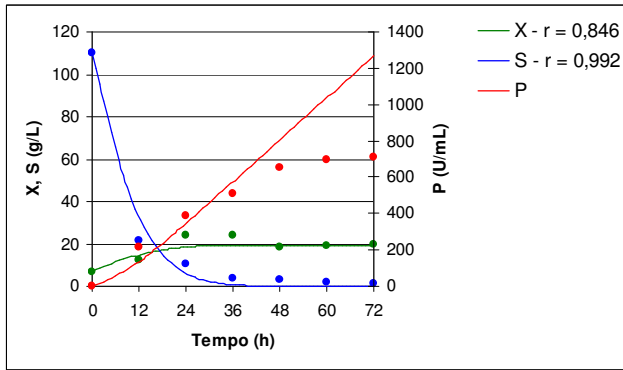
CAP. III – MODELAGEM FENOMENOLÓGICA



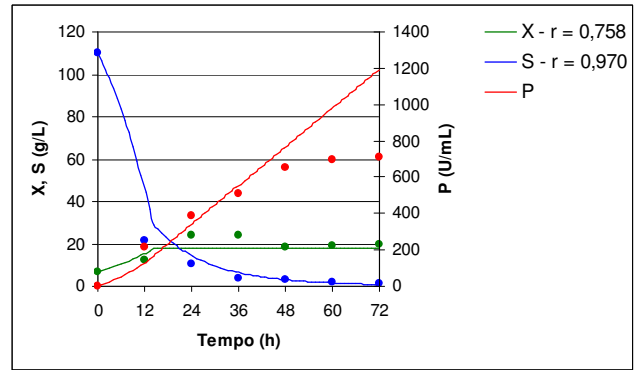
Modelo 4



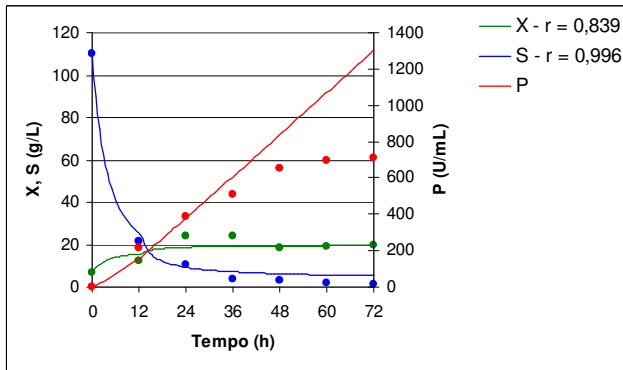
Modelo 10



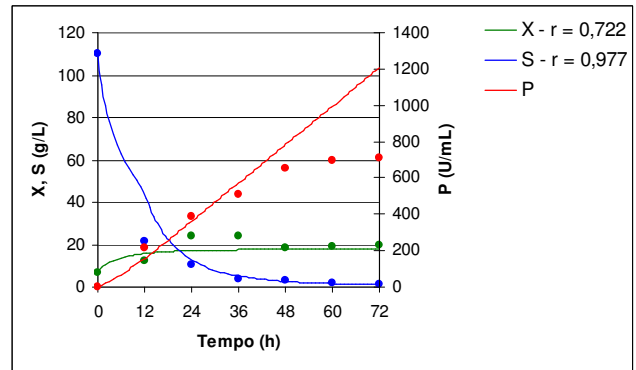
Modelo 11



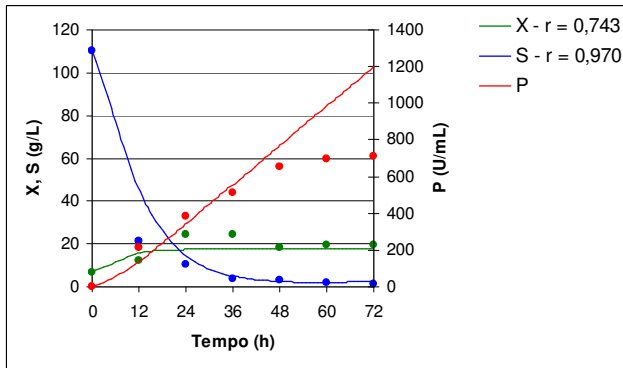
Modelo 15



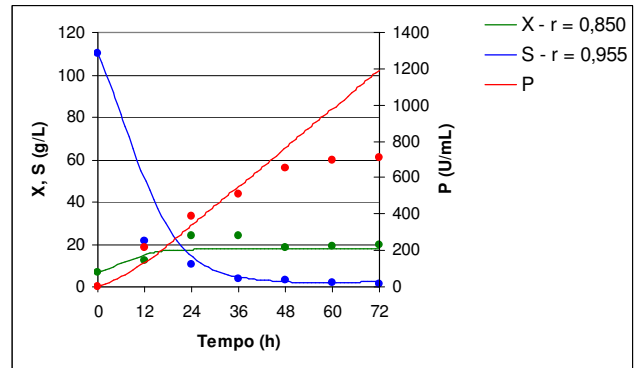
Modelo 18



Modelo 23



Modelo 25



Modelo 27

Figura III.4: Resultados da simulação para os modelos de 2 fases ($ART = 110 \text{ g.L}^{-1}$).

A dificuldade de ajuste encontrada com o desenvolvimento da modelagem fenomenológica pode ser explicada (em partes) pelos resultados experimentais obtidos por MENDES (2006), o qual investigou a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em batelada alimentada empregando os mesmos resíduos agroindustriais e microrganismo do trabalho de TREICHEL (2004). Os resultados mostram que em até 15h de fermentação ocorre o consumo quase que total de ART no meio fermentativo. O resultado interessante é que, exatamente nessas primeiras 15h, ocorre à máxima formação etanol. Após 15h, cessa o consumo de ART e inicia o consumo de etanol, indicando que o microrganismo utiliza outras fontes de carbono além de ART. Os resultados apresentados por MENDES (2006) podem explicar o fato das estratégias testadas até o momento não reproduzirem bons resultados com relação ao ajuste para o crescimento microbiano.

Uma das maiores dificuldades na modelagem da produção de inulinase empregando o microrganismo *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 é a determinação dos parâmetros cinéticos, uma vez que o microrganismo altera sua rota metabólica no decorrer da fermentação. Sendo assim, é extremamente complicado ajustar os dados experimentais empregando um modelo cinético não estruturado, o qual admite que o único substrato limitante no meio é a concentração de ART. A todo o momento que o microrganismo altera sua rota metabólica tem-se um novo conjunto de parâmetros associados ao consumo de um determinado substrato. Uma alternativa para melhorar o ajuste seria incorporar estes metabólitos no balanço. No entanto, os mesmos são extremamente dependentes das condições de operação do biorreator, tais como: agitação, aeração, variação na composição de algum substrato, entre outros.

A Tabela III.8 apresenta um resumo dos parâmetros otimizados pelo SA para os modelos de 2 fases. Novamente, alguns valores de parâmetros não apresentam significado biológico. Por exemplo, os parâmetros μ_{\max} , α , β , P_{\max} apresentam valores que não condizem com a realidade experimental. O fato de μ_{\max} apresentar um baixo valor pode estar associado com a carência de informações relacionados ao consumo de metabólitos primários, tais como etanol, acetato e glicerol. O parâmetro $Y_{x/s}$ apresentou grande variação nos seus valores entre as duas fases para todos os modelos do G-8. Essa variação explica, em partes, o melhor ajuste para o consumo de substrato. O valor de k_s é muito baixo na primeira fase, aumentando consideravelmente na segunda fase.

Tabela III.8: Valores dos parâmetros estimados para os modelos de 2 fase.

Modelos	4	10	11	15	18	23	25	27
1º Fase								
Y_{xs}	0,13	0,10	0,10	0,13	0,10	0,14	0,14	0,14
α	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,11	0,10	0,10
β	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
μ_{max}	0,08	$1,5 \times 10^{-3}$	$8,3 \times 10^{-4}$	0,07	$1,7 \times 10^{-3}$	0,35	0,09	0,08
k_s	0,89	-	-	1,94	$8,0 \times 10^{-4}$	0,02	0,73	$2,6 \times 10^{-6}$
n	-	-	1,02	-	-	-	-	-
k_i	-	-	-	16,30	-	-	-	$3,5 \times 10^{-3}$
k_p	-	-	-	-	-	8,88	-	-
P_{max}	-	-	-	-	-	-	246,01	-
S_{crit}	-	-	-	-	76,50	-	-	-
2º Fase								
Y_{xs}	0,01	0,27	0,15	$7,5 \times 10^{-3}$	0,20	0,05	0,040	$3,2 \times 10^{-3}$
α	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
β	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
μ_{max}	0,19	$1,2 \times 10^{-3}$	$1,6 \times 10^{-3}$	$2,4 \times 10^{-3}$	$4,8 \times 10^{-3}$	0,88	0,02	0,03
k_s	100,00	-	-	99,26	58,67	40,33	49,76	80,87
n	-	-	0,89	-	-	-	-	-
k_i	-	-	-	28,89	-	-	-	$1,1 \times 10^{-3}$
k_p	-	-	-	-	-	5,08	-	-
P_{max}	-	-	-	-	-	-	961,61	-
S_{crit}	-	-	-	-	2,90	-	-	-

III.3.2.1 Perspectivas Futuras

Os resultados obtidos na segunda estratégia de modelagem apresentaram uma evolução em relação à primeira, principalmente no ajuste para o consumo de substrato. Porém, esta melhora não ocorre para as demais variáveis de estado, além de não ser possível reduzir o número dos modelos prováveis do processo. Apesar do modelo de 2 fase melhorar no ajuste para o consumo de ART, não é interessante aumentar o número de parâmetros sem uma melhora considerável na qualidade do ajuste para todas as variáveis de estado.

A partir do desenvolvimento de 2 estratégias de modelagem, verificou-se que os modelos disponíveis na literatura não ajustam satisfatoriamente as variáveis em estudo. Sabe-se que, com os resultados experimentais a disposição, será difícil ajustar o crescimento microbiano, por questões anteriormente discutidas. O grande desafio é o ajuste

para a formação da inulinase, pois com o conjunto de parâmetros que estão sendo otimizados até o momento não é possível obter um ajuste satisfatório.

Analisando os dados experimentais do Anexo I percebe-se que para alguns experimentos, onde o efeito de desnaturação enzimática é desprezível, uma reta aproximaria bem estes valores de atividade enzimática. No entanto, há muitas condições onde ocorre um efeito pronunciado de desnaturação no final da fermentação. O balanço para produto, da maneira como esta colocado, consegue prever apenas que o processo possa entrar em regime, se os parâmetros α e β apresentarem significado biológico ou forem melhor estimados. A terceira estratégia propõe uma alteração na equação do balanço para produto.

III.3.3 Estratégia 3: Modificação no Balanço para Produto

Com o desenvolvimento de 2 estratégias de modelagem não foi possível obter um bom ajuste para produto, principalmente nas condições experimentais onde ocorre o efeito de desnaturação da enzima. A terceira estratégia de modelagem propõe uma modificação na equação de balanço para produto, com o objetivo de prever o efeito de desnaturação que ocorre no final da fermentação. Como são desconhecidas as causas que levam à perda de atividade da inulinase, este novo termo é apenas função do tempo de fermentação, conforme descrito pela equação III.6. Nesta etapa foi investigada a influência dos modelos do G-8 na qualidade do ajuste. Os resultados obtidos com o desenvolvimento da terceira estratégia são apresentados a seguir.

A Tabela III.9 apresenta os resultados referentes ao valor da Função Objetivo (FO) após a estimação dos parâmetros para o G-8. Comparando a evolução do trabalho percebe-se uma diminuição gradativa no valor da FO após a realização das 3 estratégias de modelagem (Tabelas III.5, III.7 e III.9). Os resultados apresentados na Tabela III.9 indicam que a modificação na equação de balanço melhorou o ajuste para 5 modelos do 8 que foram considerados. Como um dos objetivos do trabalho é a seleção do modelo cinético que melhor represente o processo, os modelos 10, 11 e 27 foram excluídos, pois apresentaram um valor de FO acima de 5,0. Sendo assim, para análises posteriores trabalha-se somente com 5 modelos: 4, 15, 18, 23 e 25. Este grupo de 5 modelos será denominado a partir dessa

etapa do trabalho de G-5. A partir desse momento todos os testes e estratégias de modelagem estarão baseados nesse conjunto reduzido de modelos.

Tabela III.9: Valor da FO para o G-8 com modificação no balanço para produto

Modelos	FO
4	2,54
10	7,44
11	13,97
15	2,55
18	3,38
23	2,10
25	2,29
27	48,11

A Figura III.5 apresenta os resultados da simulação no experimento com concentração inicial de ART de 85 g.L^{-1} para os 5 modelos (G-5). Esta condição experimental foi usada durante a estimação dos parâmetros dos modelos. Em cada um dos 5 gráficos da Figura III.5 são apresentados os valores dos coeficientes de regressão (r) para o crescimento microbiano, consumo de substrato e formação de produto.

O ajuste para formação de produto apresentado na Figura III.5 mostra que a alteração proposta na equação de balanço está conseguindo representar a tendência do processo, indicando uma evolução no trabalho, pois nas estratégias anteriores a produção da enzima estava sendo aproximada de forma linear

O ajuste para o crescimento microbiano mostra que ocorreu uma melhora, em comparação com a Figura III.3. Na estratégia 2, estes 5 modelos apresentaram um coeficiente de regressão em torno de 0,820. Na estratégia 3, os mesmos modelos apresentaram um coeficiente de regressão em torno de 0,870. O melhor ajuste foi verificado para os modelos 23 e 25 ($r = 0,903$ e $r = 0,923$, respectivamente) e o pior ajuste para o modelo 18 ($r = 0,779$).

O ajuste para o consumo de substrato mostra que apenas o modelo 18 conseguiu prever a dinâmica de consumo de ART no meio ($r = 0,999$). Os demais modelos não conseguiram prever com eficácia o consumo, onde até 36h de fermentação, todo o substrato

do meio havia sido consumido. Analisando paralelamente o crescimento celular e o consumo de ART previstos pelo modelo, percebe-se que o crescimento é interrompido no momento que se esgota o substrato no meio. Isso ocorre, pois foi assumido que a única fonte de carbono para os microrganismos seria ART. No entanto, sabe-se que quando a concentração de ART atinge um limite crítico o microrganismo passa a utilizar etanol, acetato e glicerol como fonte de carbono (MENDES, 2006).

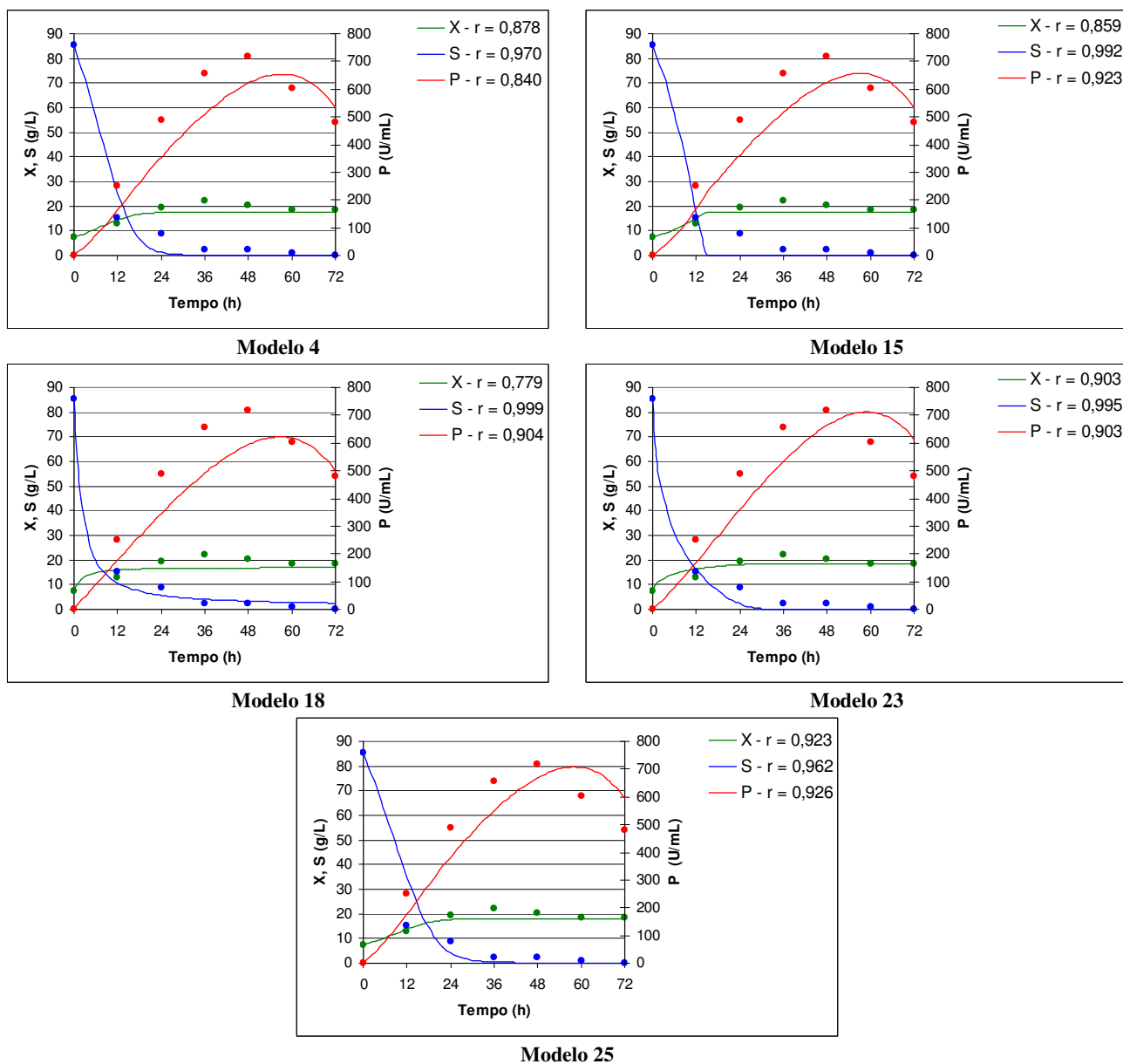


Figura III.5: Resultados da simulação para os modelos do G-5 com modificação no balanço para produto ($ART = 85 \text{ g.L}^{-1}$).

A Figura III.6 apresenta os resultados da simulação no experimento com concentração inicial de ART de 110 g.L^{-1} . Esta condição experimental foi usada somente na validação dos modelos. Em cada um dos 5 gráficos da Figura III.6 são apresentados os valores dos coeficientes de regressão (r) para o crescimento microbiano, consumo de substrato e formação de produto.

Os modelos 25, 15 e 4 apresentaram os melhores resultados com relação ao ajuste do crescimento microbiano. Os demais modelos não apresentaram resultados satisfatórios. O ajuste da cinética de consumo de substrato foi semelhante ao apresentado na Figura III.5, onde o modelo 18 apresentou os melhores resultados, conseguindo representar de maneira satisfatório a dinâmica do processo real.

A dificuldade no ajuste do crescimento microbiano não é decorrente somente da falta de informações sobre a produção e consumo de etanol. Um aspecto importante e que necessita ser ressaltado é a composição do meio ser extremamente complexa, pois é usada uma combinação de dois resíduos agroindustriais (AMM e melão), além de extrato de levedura para a formação do caldo fermentativo. Sendo assim, é difícil prever com precisão a composição correta desse meio e isso pode estar afetando o crescimento dos microrganismos. Por exemplo, dependendo da concentração de melão e AMM usada para formar o meio, a concentração de algum composto inibidor pode estar sendo alterada, ou até mesmo a concentração de algum nutriente que seja essencial para o crescimento. O trabalho de VALDUGA (2005) apresenta a composição completa da AMM e do melão antes e após o pré-tratamento com carvão ativado. Em ambos os resíduos, mesmo após o pré-tratamento, são encontrados minerais como: zinco, manganês, cobre, ferro, magnésio, potássio, fósforo, entre outros. Estes minerais, em concentrações elevadas, podem atuar como inibidores do crescimento microbiano.

O ajuste para a formação de produto na Figura III.6 apresentou um alto coeficiente de regressão para todos os modelos do G-5 ($r > 0,940$). Apesar da modificação proposta apresentar melhores resultados quando comparados com as estratégias anteriores, a nova proposta apresenta uma limitação: o modelo prevê desnaturação em todas as condições experimentais, mesmo onde o fenômeno é inexistente, devido ao fato do termo proposto para prever a desnaturação ser dependente do tempo de fermentação.

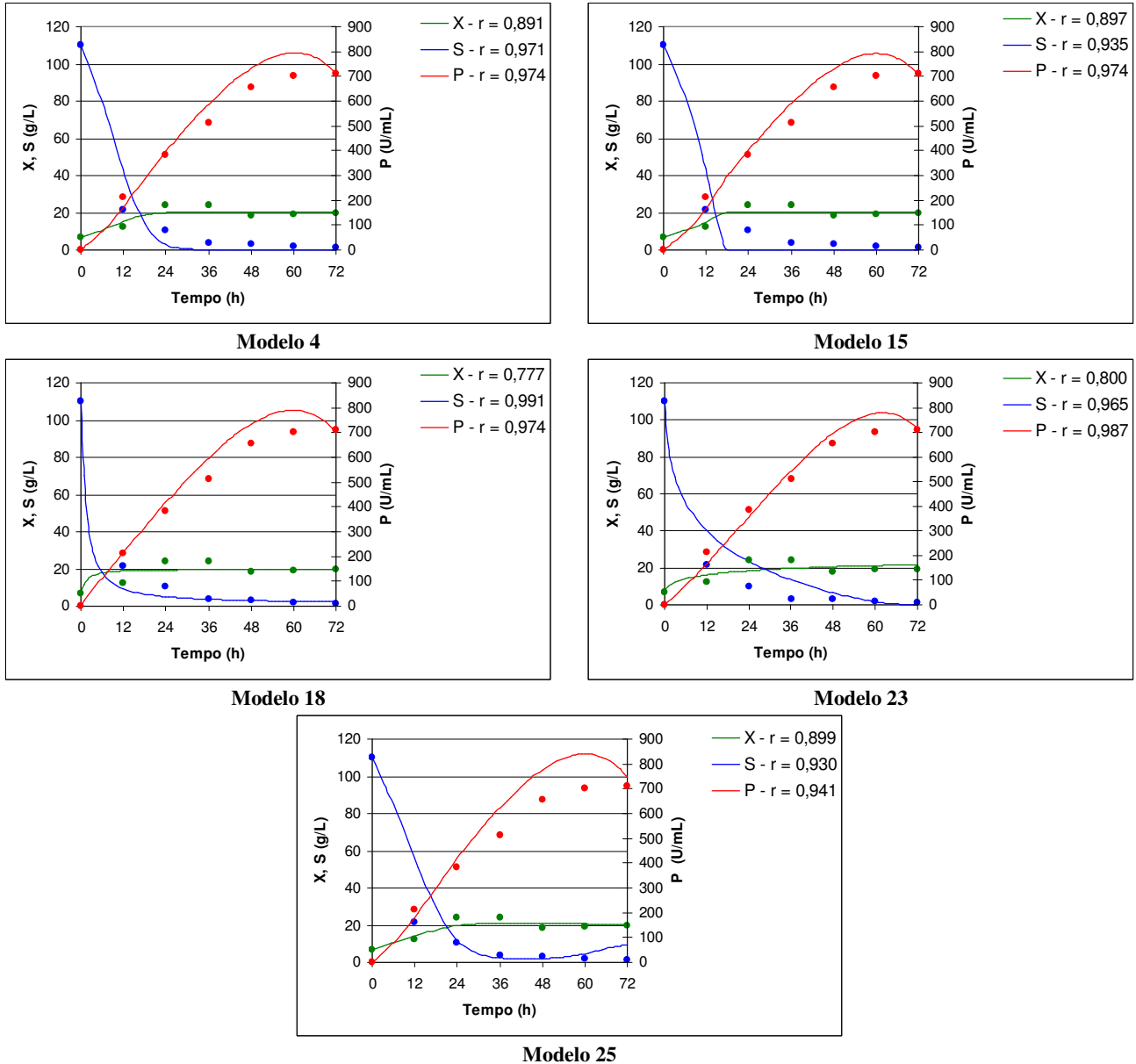


Figura III.6: Resultados da simulação para os modelos do G-5 com modificação no balanço para produto ($ART = 110 \text{ g.L}^{-1}$).

A Tabela III.10 apresenta um resumo dos parâmetros estimados pelo SA. O parâmetro $Y_{x/s}$ manteve-se praticamente constante para todos os modelos e apresenta um valor médio durante toda a fermentação. O parâmetro μ_{max} apresentou novamente um valor abaixo da realidade para o crescimento de leveduras. Porém, o ajuste para μ_{max} é prejudicado pela falta do conhecimento da influência da concentração de etanol, glicerol e

acetato no crescimento microbiano. Os parâmetros λ e β apresentaram-se constante para todos os modelos. O parâmetro α apresentou uma maior variação entre os modelos.

Tabela III.10: Valores dos parâmetros estimados para os modelos do G-5

Modelos	4	15	18	23	25
Y_{xs}	0,12	0,12	0,12	0,13	0,13
α	7,24	7,12	5,86	1,62	10,55
β	1,00	1,00	1,00	1,04	1,00
λ	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
μ_{max}	0,09	0,06	$6,0 \times 10^{-5}$	1,04	0,08
k_s	2,27	2,00	$1,8 \times 10^{-9}$	1,59	19,31
k_i	-	29,97	-	-	-
k_p	-	-	-	2,68	-
P_{max}	-	-	-	-	723,50
S_{crit}	-	-	96,00	-	-

III.4 CONSIDERAÇÕES

Este capítulo apresentou a modelagem fenomenológica da produção de inulinase em biorreator batelada, bem como os resultados obtidos após o desenvolvimento de 3 estratégias de modelagem. A primeira estratégia abordou a estimação de parâmetros de 27 modelos cinéticos de crescimento microbiano. Um conjunto de 8 modelos, denominados G-8, apresentaram bons resultados e foram selecionados como sendo os modelos que melhor representavam o processo. A segunda estratégia abordou a estimação de parâmetros para estes 8 modelos adotando um modelo de 2 fase: a primeira fase compreendeu até aproximadamente 15h de fermentação e a segunda fase o restante da fermentação. Para cada uma das fases foram estimados os parâmetros para cada modelo. Com a segunda estratégia não foi possível reduzir o número de modelos. A terceira estratégia propôs uma mudança na equação de balanço para produto, adicionando um termo que considera a desnaturação sofrida pela enzima. Cinco modelos apresentaram bons resultados e foram selecionados como sendo os modelos que melhor representavam o processo.

Apesar de verificar uma evolução no ajuste com o desenvolvimento das 3 estratégias de modelagem, os resultados obtidos não são satisfatórios, uma vez que não foi possível obter um modelo cinético que melhor descrevesse o processo. Após a terceira

estratégia, os modelos selecionados como sendo os modelos prováveis do processo são: 4, 15, 18, 23 e 25. O emprego de um modelo de 2 fase permitiu a obtenção de um bom ajuste para substrato, porém para células e produtos os resultados não foram satisfatórios. A modificação proposta na estratégia 3 apresentou um bom ajuste para produto, porém o crescimento microbiano e consumo de substrato não apresentaram bons resultados. O que se pode perceber é que nenhum modelo conseguiu representar o comportamento das 3 variáveis de estado simultaneamente.

A principal razão que impossibilitou um melhor ajuste com o desenvolvimento das estratégias de modelagem fenomenológica foi à limitação dos dados experimentais utilizados. Para o crescimento microbiano não há disponibilidade de dados de produção e consumo de etanol, glicerol e acetato. A falta desses dados prejudicou inclusive o ajuste para consumo de substrato e formação de produto. Uma outra limitação está relacionada com as causas que levam a desnaturação da inulinase, muito acentuada em algumas condições experimentais. A modificação proposta não conseguiu ajustar bem os experimentos onde o efeito de desnaturação é pouco evidente.

Em virtude dos resultados obtidos nesta seção o emprego da modelagem empírica surge como uma alternativa atraente para representar o processo. Nesse sentido, o Capítulo IV apresenta a aplicação de redes neurais como uma tentativa de ajustar os dados experimentais.

CAPÍTULO IV

**MODELAGEM EMPÍRICA DA PRODUÇÃO DE
INULINASE**

IV.1 INTRODUÇÃO

A aplicação de redes neurais na modelagem e controle de processos vem aumentando muito nos últimos anos. Seu uso é especialmente útil na modelagem de sistemas complexos ou que apresentam alguma incerteza quanto à cinética ou parâmetros do modelo. Em bioprocessos, modelos não lineares são requeridos para controle, otimização e predição do comportamento do mesmo. O desenvolvimento desses modelos é uma tarefa difícil, principalmente quando o processo é muito complexo ou quando o mesmo é pouco compreendido (SIMÕES, 2001).

Os resultados referentes à modelagem fenomenológica, apresentados no Capítulo III, sugerem a existência de fenômenos que os dados experimentais não conseguem explicar completamente. Por exemplo, a desnaturação que ocorre nos períodos finais de fermentação para algumas condições experimentais e o consumo de substrato. Apesar de resultados da literatura (MENDES, 2006) comprovarem que o microorganismo utiliza metabólitos primários (etanol, acetato e glicerol), os dados experimentais usados nesse trabalho não dispunham de tais medidas, inviabilizando o uso na modelagem fenomenológica. A principal vantagem do emprego de redes neurais é a capacidade de treinamento das mesmas a partir de um conjunto de dados disponíveis.

O objetivo deste capítulo é o emprego de redes neurais como alternativa para modelar a produção de inulinase em biorreator batelada. Serão investigados a influência do número de neurônios na camada interna (1 – 12), o número de entradas (tempo, concentração inicial de ART, concentração inicial de Melaço, concentração inicial de AMM e pH) e a função de ativação (linear, sigmoidal, tangente hiperbólica). A seguir será apresentada a formulação do problema da modelagem empírica, bem como os resultados obtidos durante a realização desta proposta.

IV.2 MODELAGEM EMPÍRICA

IV.2.1 Arquitetura da Rede Neural

A rede proposta neste estudo apresenta a seguinte topologia: rede multicamada totalmente conectada, do tipo *feedforward*, com os sinais passando numa única direção (da entrada para a saída). A rede apresenta três camadas denominadas de camada de entrada, intermediária e de saída. O número de neurônios na camada intermediária foi definido por tentativa e erro, buscando-se o número mínimo de neurônios que forneça a menor FO e a camada de saída foi composta por três neurônios, os quais correspondem às três variáveis de estado: células, substrato e produto.

Neste trabalho foram testados três tipos de funções de transferências, as quais são:

- Linear: $f(\lambda_i) = \lambda_i$ (IV.1)

- Sigmoidal: $f(\lambda_i) = [1 + \exp(-\lambda_i)]^{-1}$ (IV.2)

- Tangente Hiperbólica: $f(\lambda_i) = \tanh(\lambda_i)$ (IV.3)

IV.2.2 Dados de Entrada para a Rede Neural

Os dados de entrada que serão utilizados para o treinamento da rede são: tempo de fermentação, concentração inicial de ART, concentração inicial de melação, concentração inicial de AMM e pH. As entradas foram determinadas por tentativa e erro, de maneira a minimizar a FO, conforme descrito na Eq. IV.4.

IV.2.3 Treinamento da Rede Neural

O treinamento consiste em, a partir de um conjunto de dados de entrada, otimizar o valor dos pesos e *bias* de maneira que se minimize o erro quadrático entre o valor da variável de estado calculada e o valor experimental, conforme definido pela equação:

$$FO = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^3 \theta_j (\mathbf{y}_{i,j} - \mathbf{y}_{i,j,calc})^2 \quad (IV.4)$$

onde θ representa um peso diferente para cada uma das variáveis de estado do sistema. Os pesos ótimos da rede foram determinados pelo algoritmo SA, o qual foi desenvolvido pelo Laboratório de Modelagem e Simulação de Processos da URI – Campus de Erechim. Os valores θ foram determinados por tentativa e erro de maneira que o modelo representasse satisfatoriamente os resultados.

Assim, o problema de estimação dos pesos da rede neural foi formulado como:

$$\min FO \quad (IV.5)$$

Sujeita a:

$$\mathbf{z}_j = \mathbf{f}\left(\sum \mathbf{x}_i \mathbf{w}_{i,j}^h + b_j\right) \quad (IV.6)$$

$$\mathbf{y}_p = \mathbf{f}\left(\sum \mathbf{z}_i \mathbf{w}_{j,p}^o + b_j\right) \quad (IV.7)$$

onde \mathbf{f} é a função de ativação, \mathbf{w} é o vetor dos pesos da rede, b é a *bias*, \mathbf{x} é o vetor de variáveis de entrada, \mathbf{z} é o vetor de respostas da camada intermediária e \mathbf{y} é o vetor das respostas da camada de saída da rede (X, S, P).

Os valores iniciais dos pesos da rede neural foram gerados aleatoriamente pela rotina do SA, seguindo uma distribuição gaussiana com média zero.

Durante a etapa de treinamento da rede foi usado um conjunto experimental composto por 7 experimentos com concentração de ART variando de 60 g.L⁻¹ a 130 g.L⁻¹. Para a etapa de validação dos pesos ótimos foram usados 2 experimentos adicionais com concentração de ART de 90 g.L⁻¹ e 110 g.L⁻¹. Os dados experimentais usados no desenvolvimento desta tese encontram-se detalhados no Anexo I.

IV.3 RESULTADOS DA MODELAGEM EMPÍRICA

Esta seção apresenta os resultados obtidos com o emprego de redes neurais na modelagem da produção de inulinase. Inicialmente serão apresentados os resultados referentes à escolha da função de ativação, o número de neurônios internos e o número de

entradas para a rede. Por fim, serão apresentados os resultados da simulação para o treinamento e para a validação da melhor arquitetura de rede.

A Eq. IV.4 apresenta o parâmetro θ , o qual fornece pesos diferentes para as três variáveis de estado em questão. Em outras palavras, este parâmetro define a qualidade do ajuste para cada variável. O valor de θ foi determinado por tentativa e erro, de maneira que o ajuste obtido fosse satisfatório em termos do valor do coeficiente de regressão (r). Os valores definidos como sendo os valores ótimos para esse trabalho são: $\theta_X = 5,0$ para células, $\theta_S = 50,0$ para substrato e $\theta_P = 10,0$ para produto. Os valores de θ apresentados mostram um maior rigor para substrato, seguido por produto e células. Porém, dentro do vasto conjunto de parâmetros investigados nesse trabalho os valores acima especificados apresentaram melhores resultados e foram definidos como sendo os pesos de cada uma das variáveis.

A função de ativação apresenta uma enorme influência nos resultados obtidos, uma vez que é ela quem fornece a característica não linear às respostas. Neste trabalho, foi investigada a influência de três funções: linear, sigmoidal e tangente hiperbólica. Na determinação da melhor função de ativação foi adotada a seguinte configuração de rede: 2 entradas (concentração inicial de ART e tempo de fermentação) e 5 neurônios na camada intermediária. Os resultados obtidos com relação ao valor da FO para as três funções estão apresentados na Tabela IV.1. A função linear apresentou o pior resultado (FO = 355,3), seguida da função sigmoidal (FO = 200,5). O melhor resultado foi obtido com o emprego da tangente hiperbólica, a qual forneceu o menor valor da FO (FO = 38,6). Em virtude dos resultados obtidos, a tangente hiperbólica foi definida como sendo a função de ativação ideal para este trabalho, sendo eliminadas as demais para testes futuros.

Tabela IV.1: Influência da Função de Ativação sobre o valor da FO

Função de Ativação	FO
Linear	355,3
Sigmoidal	200,5
Tangente Hiperbólica	38,6

Definida a função de ativação a ser utilizada neste trabalho é necessário otimizar o número de neurônios da camada intermediária. A configuração de rede utilizada para determinar o número ótimo de neurônios foi: 2 entradas (concentração inicial de ART e tempo de fermentação) e a função de ativação foi a tangente hiperbólica. A configuração com 3 neurônios apresentou o valor mais alto da FO, sendo que a configuração com 10 neurônios apresentou o melhor resultado ($FO = 20,2$). Dessa maneira, o número de neurônios da camada intermediária ficou definido como sendo 10 para estudos futuros.

Os resultados ótimos obtidos durante a investigação do efeito da função de ativação e do número de neurônios no valor da FO foram combinados para definir o número e quais são as entradas que melhor representem o processo. As informações disponíveis pelos dados experimentais apresentados no Anexo I deste trabalho, que podem ser utilizados como elementos de entrada para a rede resumem-se em: tempo de fermentação, concentração inicial de ART, concentração inicial de AMM, concentração inicial de melão e pH.

Com o objetivo de melhor representar os dados experimentais às entradas acima especificadas foram combinadas e usadas no treinamento da rede. As variáveis tempo de fermentação e concentração inicial de ART foram mantidas em todas as configurações de entrada. As demais foram combinadas entre elas de maneira que minimizassem o valor da FO.

A Tabela IV.2 apresenta os resultados referentes ao treinamento da rede após todas as combinações possíveis das variáveis de entrada. Com 2 entradas (tempo de fermentação e concentração de ART) foi possível encontrar um valor de $FO = 20,2$. Com 3 entradas o valor da FO aumentou em relação a 2 entradas, indicando que o ajuste piorou. O emprego das combinações Tempo/ART/pH, Tempo/ART/AMM e Tempo/ART/Melão não produziram resultados satisfatórios. Com a combinação Tempo/ART/AMM/Melão (4 entradas) foi possível reduzir o valor da FO em comparação com a combinação Tempo/ART/Melão (3 entradas), porém o valor é mais alto que o obtido para a combinação Tempo/ART. Para a configuração da rede com 4 entradas o uso do pH como uma entrada apresenta resultados insatisfatórios. A configuração com 5 entradas apresentou o melhor resultado com relação ao valor da FO ($FO = 17,1$). Este resultado indica que a

combinação Tempo/ART/AMM/Melaço/pH consegue explicar melhor as alterações do processo.

Tabela IV.2: Influência do número de entradas sobre o valor da FO

Entradas	FO
Tempo, ART	20,2
Tempo, ART, pH	28,6
Tempo, ART, AMM	32,9
Tempo, ART, Melaço	27,4
Tempo, ART, pH, AMM	31,8
Tempo, ART, pH, Melaço	30,9
Tempo, ART, AMM, Melaço	24,5
Tempo, ART, AMM, Melaço, pH	17,1

A partir dos resultados obtidos até o momento a arquitetura da rede neural utilizada neste trabalho apresenta a seguinte configuração: 5 entradas (Tempo/ART/AMM/Melaço/pH), 10 neurônios na camada intermediária e a função de ativação é a tangente hiperbólica. A Figura IV.1 apresenta o resultado da simulação para as 7 condições experimentais usadas no treinamento da rede com a configuração ótima.

O ajuste para células em todas as condições experimentais foi satisfatório, apresentando um valor de $r > 0,940$, com exceção da condição com $ART = 100 \text{ g.L}^{-1}$, onde apresentou um coeficiente de regressão menor ($r = 0,830$). No entanto, para os experimentos com $ART = 120 \text{ g.L}^{-1}$ e $ART = 130 \text{ g.L}^{-1}$ ocorreram os melhores ajustes com $r = 0,982$ e $r = 0,989$, respectivamente. Analisando os resultados referentes ao ajuste de células obtidos com o emprego de redes neurais e comparando com os resultados obtidos na modelagem fenomenológica percebe-se um avanço significativo na qualidade desse ajuste. As redes neurais estão conseguindo prever inclusive a taxa de morte dos microorganismos, o que não ocorreu na modelagem fenomenológica.

CAP. IV – MODELAGEM EMPÍRICA

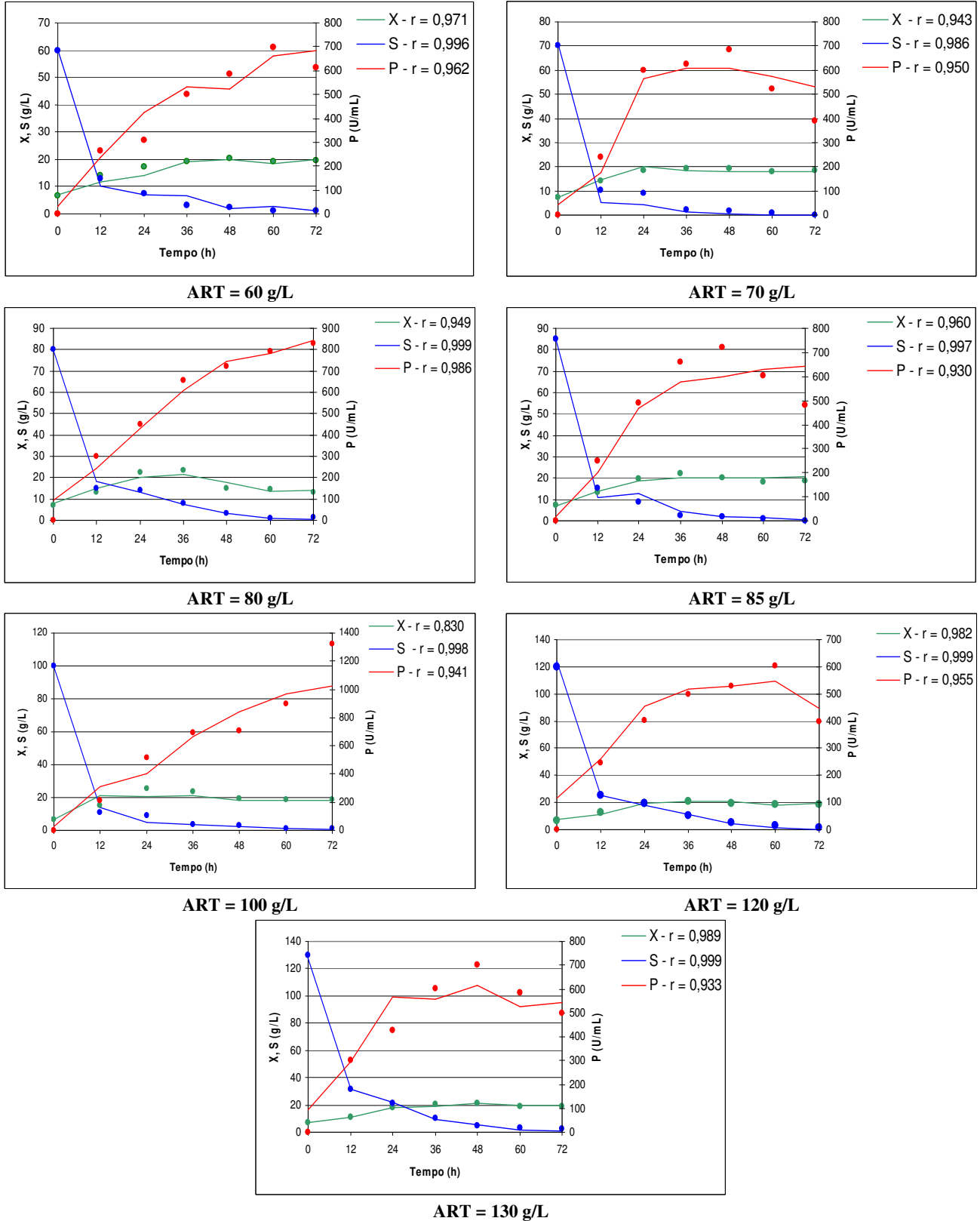


Figura IV.1: Resultados da simulação com os experimentos do treinamento da rede neural

Conforme esperado, o melhor resultado da Figura IV.1 é o ajuste para substrato em todos os 7 experimentos do treinamento. Esse melhor ajuste foi obtido devido ao peso maior dado para esta variável de estado. Em condições com $ART = 120 \text{ g.L}^{-1}$ e $ART = 130 \text{ g.L}^{-1}$ o valor de r foi excelente ($r = 0,999$). Nas demais condições experimentais o coeficiente de regressão foi sempre superior a 0,980, mostrando uma boa concordância entre os dados obtidos pelas redes e os dados experimentais. Comparando estes resultados com os obtidos na modelagem fenomenológica, novamente percebe-se um avanço na qualidade do ajuste para substrato. Nenhum modelo cinético proposto conseguiu descrever com eficiência a dinâmica do consumo de ART. Com as redes neurais foi possível obter bons resultados.

Apesar dos resultados para células e substrato serem satisfatórios com o emprego de redes neurais para a modelagem da produção de inulinase, o mesmo não foi obtido para produto. Analisando a Figura IV.1 percebe-se que na condição com $ART = 80 \text{ g.L}^{-1}$, onde não há efeito de desnaturação da enzima, as redes conseguiram representar bem a dinâmica do processo com um $r = 0,986$. Nas condições com $ART = 70 \text{ g.L}^{-1}$ e $ART = 85 \text{ g.L}^{-1}$ as redes não conseguiram representar o efeito de desnaturação sofrido pela inulinase nos períodos finais de fermentação. Nas condições com $ART = 60 \text{ g.L}^{-1}$ e $ART = 130 \text{ g.L}^{-1}$ é verificada a formação de degraus durante o ajuste, apresentando um comportamento atípico. Na condição com $ART = 100 \text{ g.L}^{-1}$, onde ocorre à máxima produção de enzima, as redes não conseguiram simular o comportamento semelhante ao obtido experimentalmente. Além disso, o ajuste mostra uma aproximação pouco realista, necessitando ser melhorado para que possa fornecer resultados mais confiáveis. Os resultados obtidos para produto com o emprego de redes neurais são semelhantes aos obtidos na modelagem fenomenológica, onde se percebe uma dificuldade em ajustar o comportamento real do sistema, principalmente em condições experimentais onde o efeito de desnaturação enzimática ocorre com maior intensidade.

A partir da Figura IV.1 pode-se observar uma diferença em relação às condições experimentais das variáveis. Em nenhuma condição experimental o valor inicial de produto estimado pelas redes foi zero. Por exemplo, nas condições com $ART = 80 \text{ g.L}^{-1}$, $ART = 120 \text{ g.L}^{-1}$ e $ART = 130 \text{ g.L}^{-1}$ o valor inicial para produtos é superior a 100 U.mL^{-1} . No ajuste de células e substrato, o erro na estimativa inicial é menos pronunciado, porém existente.

A Figura IV.2 apresenta os resultados referentes à validação dos pesos da rede. As duas condições experimentais apresentadas na figura não foram usadas durante o treinamento da rede. A etapa de validação é fundamental durante a modelagem, pois ela indicará se o modelo proposto consegue representar bem o processo. O ajuste para células foi satisfatório, sendo que a condição com $ART = 90 \text{ g.L}^{-1}$ apresentou um melhor ajuste ($r = 0,945$). O Substrato apresentou um ajuste excelente para as duas condições experimentais com $r = 0,998$. No entanto, o produto apresentou um ajuste pouco realista. Além do baixo coeficiente de regressão obtido, as redes não estão conseguindo prever a dinâmica do processo. Na condição com $ART = 90 \text{ g.L}^{-1}$ o ajuste para produto é uma aproximação grosseira da realidade e na condição com $ART = 110 \text{ g.L}^{-1}$ as redes conseguem prever bem o comportamento do sistema até 48h. Após esse período há uma dificuldade em ajustar o comportamento do sistema.

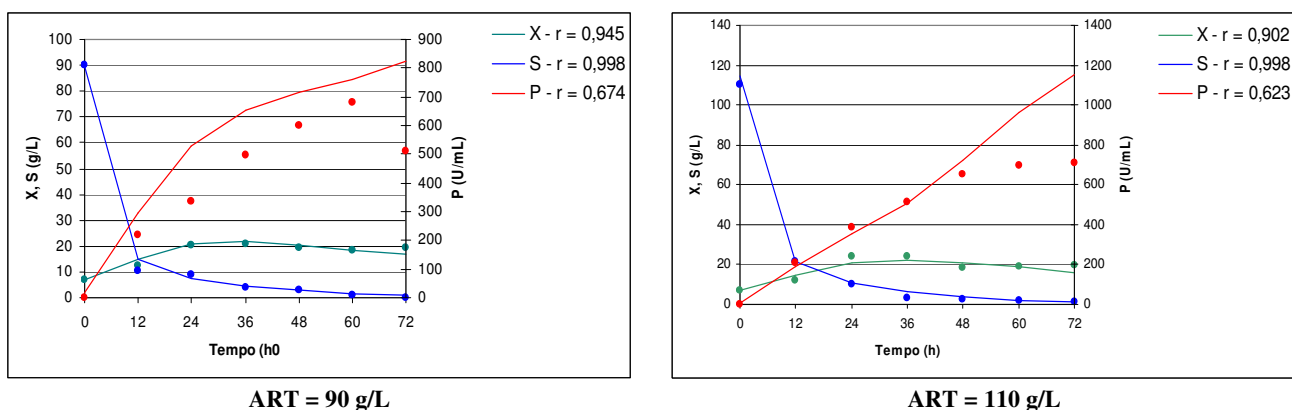


Figura IV.2: Resultados da simulação para a validação da rede neural

IV.4 CONSIDERAÇÕES

Este capítulo apresentou o emprego de redes neurais como alternativa de modelagem da produção de inulinase em biorreator batelada, bem como os resultados obtidos. No primeiro momento foi definida a melhor função de ativação, o número de neurônios internos, além das entradas que reproduziram os melhores resultados. Por fim, definida a melhor configuração da rede foram apresentados os resultados da simulação.

Neste trabalho, o uso da tangente hiperbólica como função de ativação reproduziu os melhores resultados, quando comparados com a linear e a sigmoideal. A combinação de tempo de fermentação, concentração inicial de ART, concentração inicial de AMM, concentração inicial de melação e pH apresentou-se como a melhor configuração de entrada para a rede. Além disso, o número de neurônios na camada intermediária foi definido como sendo 10.

O ajuste obtido para células e substrato foi satisfatório para todas as condições experimentais, incluindo os dois experimentos de validação da rede. Comparando com a modelagem fenomenológica percebe-se uma boa evolução para o ajuste dessas duas variáveis de estado, o que justificou o emprego de redes como alternativa de modelagem do processo. No entanto, o ajuste para produto não foi satisfatório, por não conseguir representar com eficiência a dinâmica do processo. Além disso, o uso de redes neurais apresentou uma limitação: a dificuldade em estimar as condições iniciais, principalmente para produto.

Como alternativa para melhorar a representação do processo, o Capítulo V apresenta o desenvolvimento da modelagem híbrida. Esta técnica de modelagem baseia-se nas equações de balanço aliada à alta capacidade das redes neurais em descrever fenômenos complexos e de difícil compreensão.

CAPÍTULO V

**MODELAGEM HÍBRIDA DA PRODUÇÃO DE
INULINASE**

V.1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de modelos fenomenológicos apresentados no Capítulo III mostrou algumas dificuldades de ajuste, devido às limitações do modelo e escassez de dados experimentais. Por exemplo, não foram incluídos no balanço a produção e o consumo de etanol, acetato e glicerol, além das outras considerações colocadas na formulação do modelo fenomenológico.

A metodologia de redes neurais apresentadas no Capítulo IV foi usada como uma ferramenta do tipo “caixa-preta”, ou seja, nenhum conhecimento sobre o processo foi considerado. As redes desempenharam apenas a tarefa de fornecer uma relação entrada/saída do processo de produção de inulinase em batelada. Esta habilidade das redes neurais em aproximar dados a funções arbitrárias é tida como seu grande potencial, porém nem sempre os resultados são satisfatórios, principalmente fora da região de treinamento.

Como alternativa surge a modelagem híbrida, a qual combina a modelagem fenomenológica juntamente com redes neurais, aproveitando as vantagens de cada um dos dois métodos. Um fator crítico na modelagem de bioprocessos é a determinação da cinética do processo, a qual é fornecida pelas equações de balanço. As redes neurais são usadas para estimar parâmetros não lineares e que apresentam um alto grau de incertezas. Os modelos híbridos têm por objetivo produzir um modelo mais flexível que as técnicas clássicas de estimação de parâmetros, e que generalize e extrapole melhor que as redes “caixa-preta”, bem como apresentar resultados mais confiáveis e fáceis de interpretar.

O objetivo deste capítulo é o desenvolvimento de um modelo híbrido, o qual utiliza as equações de balanço de massa como um modelo de tendência do processo e as RNAs para a estimação dos parâmetros do modelo. Sendo assim, serão usadas as redes neurais para estimação dos parâmetros cinéticos. Na parte empírica do modelo serão investigados o número de neurônios da camada interna e o número de entradas para a rede. Na parte fenomenológica será investigado qual o modelo cinético que melhor descreve o processo de produção de inulinase. Por fim, serão apresentados os resultados da melhor configuração do modelo híbrido.

V.2 DESENVOLVIMENTO DO MODELO HÍBRIDO

V.2.1 Parte Fenomenológica

Conforme apresentado no Capítulo III, o modelo matemático proposto consiste de um conjunto de equações diferenciais levando em consideração o crescimento microbiano, o consumo de substrato e a produção de enzima. A equação do balanço para produto leva em conta a desnaturação sofrida pela inulinase, de acordo com a modificação proposta pois apresentou os melhores resultados no Cap. III. As equações que descrevem a dinâmica do sistema são:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (\text{III.1})$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \mu X \quad (\text{III.2})$$

$$\frac{dP}{dt} = (\alpha\mu + \beta)X - \exp(\lambda t) \quad (\text{III.6})$$

$$\mu = \mathbf{f}(X, S, P, \mathbf{p} = Y_{x/s}, \alpha, \beta, \lambda, \mu_{\max}, k_s, k_i, k_p, S_m, P_{\max}) \quad (\text{III.4})$$

Visando obter um modelo cinético que descreva quantitativamente o processo de produção de inulinase será investigada a influência dos 5 modelos cinéticos selecionados após a realização da 3ª estratégia de modelagem fenomenológica no Cap III (G-5). A Tabela V.1 apresenta um resumo dos 5 modelos cinéticos investigados nesta etapa do trabalho.

Tabela V.1: Modelos cinéticos de crescimento microbiano utilizados na modelagem híbrida

Modelos	Modelo Cinético	Referência
4	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{k_s X + S}$	SCHIMIDELL, 2001
15	$\mu = \mu_{\max} \frac{S \left[1 + \left(\frac{S}{k_i} \right) \right]}{k_s + S + \left(\frac{S^2}{k_i} \right)}$	GOKULAKRISHNAN <i>et al.</i> , 2006
18	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{(k_s + S)} \left(1 - \frac{S}{S_m} \right)^2$	GOKULAKRISHNAN <i>et al.</i> , 2006
23	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{(k_s + S)} \left(\frac{k_p}{k_p + P} \right)$	GONZÁLEZ, 2004
25	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{(k_s + S)} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)$	GONZÁLEZ, 2004

A Tabela V.2 apresenta os intervalos especificados pra os valores dos parâmetros dos modelos cinéticos usados no ajuste.

Tabela V.2: Limites dos parâmetros de entrada para o SA

Parâmetros	Limite Inferior	Limite Superior
$Y_{x/s}$ (-)	0,0	0,65
α (U.mL ⁻¹)	0,0	20,0
β (U.mL ⁻¹ .h ⁻¹)	0,0	20,0
λ (-)	0,0	0,1
μ_{\max} (h ⁻¹)	0,0	1,0
k_s (g.L ⁻¹)	0,0	25,0
k_i (g.L ⁻¹)	0,0	25,0
k_p (g.L ⁻¹)	0,0	25,0
S_m (g.L ⁻¹)	60,0	130,0
P_{\max} (U.mL ⁻¹)	300,0	1500,0

V.2.2 Parte Empírica

V.2.2.1 Arquitetura da Rede Neural

A rede proposta neste estudo apresenta a mesma topologia que a apresentada no Cap IV. A rede é composta por três camadas denominadas de camada de entrada, intermediária e de saída. O número de neurônios na camada intermediária será definido por tentativa e erro, buscando-se o número mínimo de neurônios que fornece o menor erro quadrático e, ao mesmo tempo, que apresente resultados satisfatórios; a camada de saída será composta por três neurônios, os quais correspondem às três variáveis de estado: células, substrato e produto. A função de ativação usada na aplicação de redes neurais no modelo híbrido será a tangente hiperbólica.

V.2.2.2 Dados de Entrada para a Rede Neural

Os dados de entrada que serão utilizados para o treinamento da rede são: tempo de fermentação, concentração inicial de ART, concentração inicial de melaço, concentração inicial de AMM e pH. As entradas da RNAs foram determinados por tentativa e erro, de maneira a diminuir o erro quadrado entre os dados experimentais e os dados calculados pela rede, conforme descrito na Eq. IV.5.

V.2.2.3 Treinamento da Rede Neural: Determinação dos parâmetros do modelo

Uma vez selecionados o número de neurônios na camada interna e o número de entradas foi realizado o treinamento da rede. No modelo híbrido, a rede fornece o valor dos parâmetros cinéticos do modelo. Ou seja, os pesos e *bias* da rede neural são otimizados de maneira a encontrar o conjunto de parâmetros ótimos que minimize o erro quadrático entre o valor da variável de estado calculada pelas equações do modelo fenomenológico e o valor experimental, conforme definido pela equação:

$$FO = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^3 \theta_j (y_{i,j} - y_{i,j,calc})^2 \quad (IV.5)$$

onde θ representa um peso diferente para cada uma das variáveis de estado do sistema. Os pesos ótimos da rede foram determinados pelo algoritmo SA e os valores θ foram determinados por tentativa e erro de maneira que o modelo representasse satisfatoriamente os resultados. As equações dos modelos foram resolvidas numericamente pelo algoritmo LIMEX (DEUFLHARD *et al.*, 1987). Os valores das variáveis de estado calculados e experimentais usados no cálculo da FO foram normalizados entre 0 e 1, devido às diferentes ordem de grandeza das variáveis.

Durante a etapa de treinamento da rede foi usado um conjunto experimental composto por 7 experimentos com concentração de ART variando de 60 g.L⁻¹ a 130 g.L⁻¹. Para a etapa de validação dos pesos ótimos foram usados 2 experimentos adicionais com concentração de ART de 90 g.L⁻¹ e 110 g.L⁻¹ (Anexo I).

V.2.3 Modelo Híbrido

O modelo híbrido consiste em agrupar numa única abordagem as vantagens da modelagem fenomenológica e as vantagens da empírica. As equações do balanço de massa governam o comportamento do sistema e as redes neurais fornecem os valores dos parâmetros para as equações de balanço. A Figura V.1 apresenta um diagrama esquemático do funcionamento do modelo híbrido empregado neste trabalho.

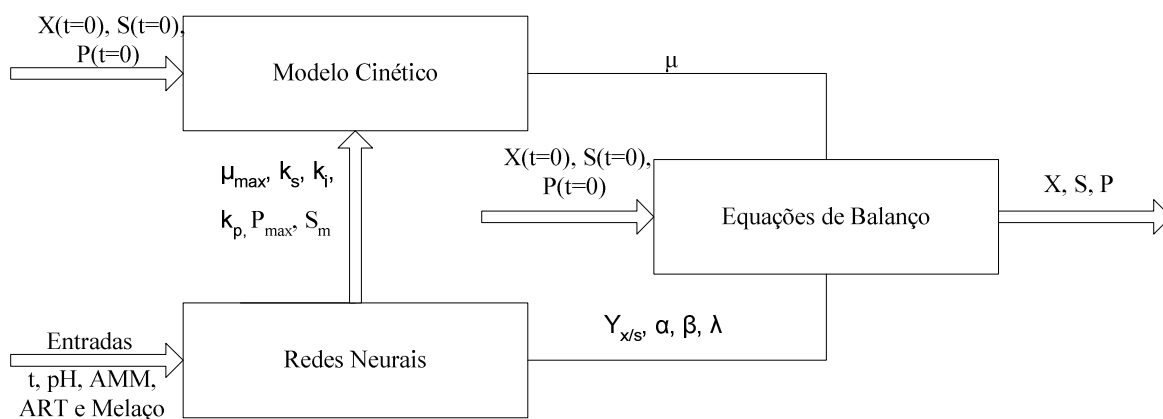


Figura V.1: Diagrama esquemático do funcionamento do modelo híbrido

V.3 RESULTADOS DA MODELAGEM HÍBRIDA

Esta seção apresenta os resultados obtidos com o emprego de modelos híbridos na modelagem da produção de inulinase. Inicialmente serão apresentados os resultados referentes à determinação do número de neurônios internos, do número de entradas para a rede e do modelo cinético que melhor representa o processo. Por fim, serão apresentados os resultados do treinamento e da validação para o conjunto de parâmetros que melhor representou o processo.

A Eq. IV.5 apresenta o parâmetro θ , o qual fornece pesos diferentes para as três variáveis de estado em questão. A definição do significado do parâmetro encontra-se detalhada no Cap IV. O valor de θ foi determinado por tentativa e erro, de maneira que o ajuste obtido fosse satisfatório em termos do valor do coeficiente de regressão (r). Os valores definidos como sendo os valores ótimos para esse trabalho são: $\theta_x = 0,03$ para células, $\theta_s = 0,08$ para substrato e $\theta_p = 0,10$ para produto. Os valores de θ apresentados mostram um maior rigor para o ajuste da formação de produto, seguido por consumo de substrato e crescimento celular. A falta de informações sobre a produção e consumo de etanol, acetato e glicerol impede o desenvolvimento de um modelo mais rigoroso para o crescimento microbiano, optando-se por empregar um rigor menor no ajuste desta variável. Dentro do vasto conjunto de parâmetros investigados nesse trabalho os valores acima especificados apresentaram melhores resultados e foram definidos como sendo os pesos de cada uma das variáveis.

A Figura V.2 apresenta a influência do número de neurônios internos no valor da FO. A rede neural com a configuração de 1 a 3 neurônios na camada intermediária apresentou os maiores valores da FO. Com um número baixo de neurônios a rede não consegue processar com eficiência as informações de maneira a fornecer resultados satisfatórios para os parâmetros. O menor valor da FO foi encontrado com 5 neurônios na camada interna. A partir desse número começou ocorrer uma oscilação nesse valor, pois a partir de um determinado limite a rede não consegue mais fornecer um resultado satisfatório. Isso ocorre devido ao grande número de pesos da rede e, quanto maior esse número, maior é a possibilidade de ocorrer um sobre-ajuste dos dados, o que não é desejado.

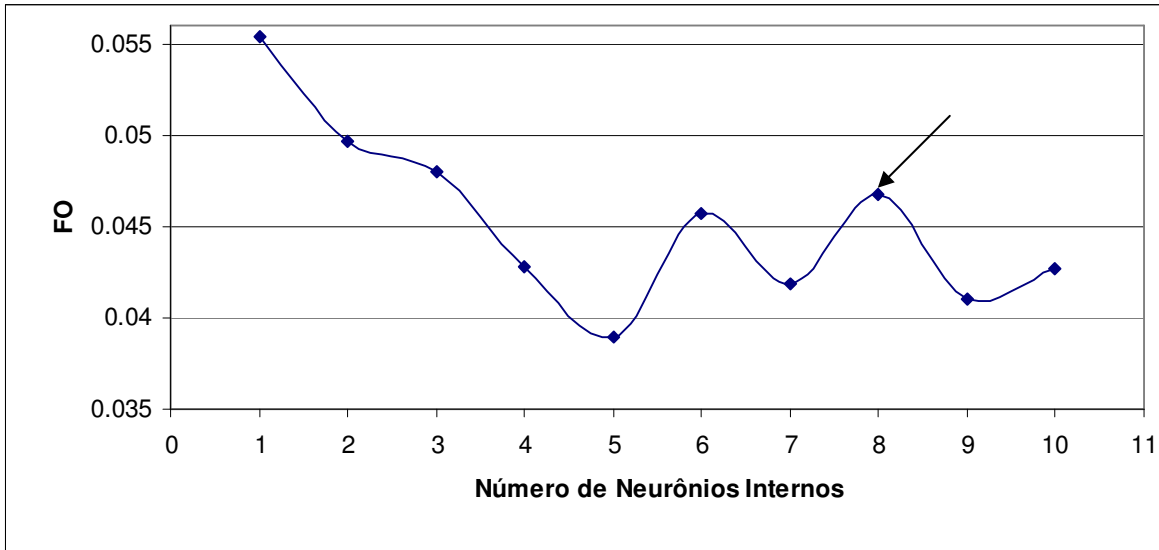


Figura V.2: Influência do número de neurônios internos no valor da FO para o modelo híbrido

A configuração com 8 neurônios na camada intermediária foi escolhida como sendo a ideal, apesar da configuração com 5 neurônios apresentar o menor valor de FO. A Figura V.3 apresenta os resultados da simulação na condição experimental com $ART = 80 \text{ g.L}^{-1}$ para 5 e 8 neurônios na camada intermediária, ilustrando o que ocorre com ajuste.

Analisando os resultados da Figura V.3 observa-se que a configuração com 5 neurônios fornece parâmetros instáveis a partir de 48h de fermentação. Comportamento semelhante foi encontrado para as configurações com 4, 6, 7, 9 e 10 neurônios na camada intermediária. O fato que explica o menor valor da FO encontrada é que nos pontos experimentais (ou seja, a cada 12h de fermentação) o conjunto de parâmetros estimado pelas redes neurais consegue prever com precisão os valores das variáveis de estado. No entanto, dentro do intervalo onde não há medidas experimentais, este conjunto de parâmetros gera um comportamento inadequado, conforme apresentado na Figura V.3. Esses resultados explicam o fato da configuração com 8 neurônios ter sido escolhida como sendo a configuração ideal no emprego do modelo híbrido para a modelagem da produção de inulinase.

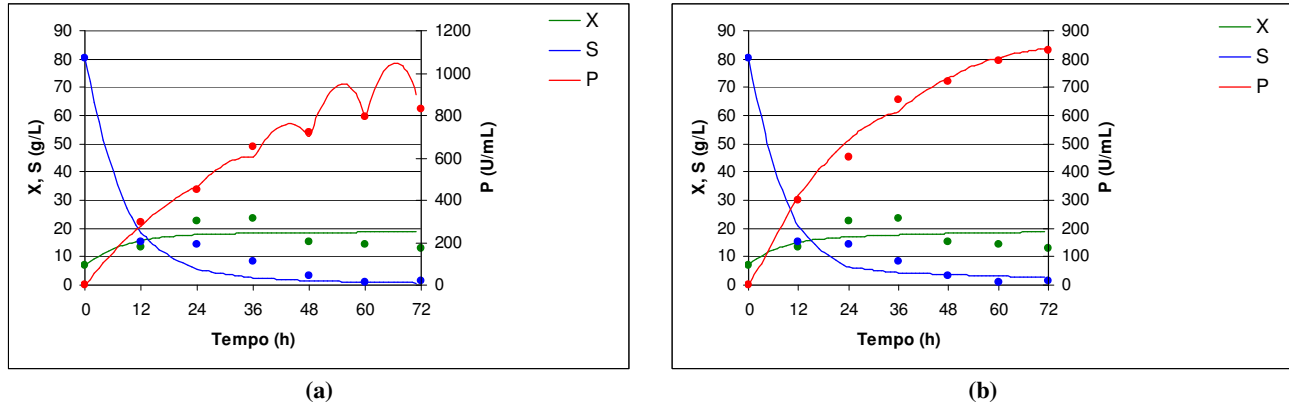


Figura V.3: Influência do número de neurônios internos na qualidade do ajuste: (a) 5 neurônios internos; (b) 8 neurônios internos

Com o objetivo de encontrar o conjunto de parâmetros que melhor represente o processo, todas as informações disponíveis pelos dados experimentais foram testadas como entradas para o modelo híbrido. A configuração da rede usada para determinar o número de entradas foi a de 8 neurônios na camada interna e o modelo cinético escolhido para representar o processo foi o modelo 4, da Tabela V.1. As variáveis usadas como dados de entrada foram o tempo de fermentação, concentração inicial de ART, concentração inicial de AMM, concentração inicial de melação e pH. As variáveis tempo de fermentação e a concentração inicial de ART foram mantidas em todas as configurações de entrada. As demais foram combinadas entre elas de maneira que minimizassem o valor da FO.

A Tabela V.3 apresenta os resultados obtidos durante a investigação do número de entradas sobre o valor da FO. Os menores valores da FO foram obtidos com a utilização de 4 e 5 entradas. Os resultados obtidos com 2 e 3 entradas não foram satisfatórios, apresentando o valor da FO acima de 0,046 para todas as combinações possíveis. Com 4 entradas, a combinação tempo/ART/AMM/pH apresentou o melhor resultado (FO = 0,037). A configuração com 5 entradas apresentou o menor valor da FO (0,034), sendo escolhida como a configuração ideal para o sistema híbrido proposto.

Tabela V.3: Influência do número de entradas no valor da FO para o modelo híbrido

Entradas	FO
Tempo, ART	0,056
Tempo, ART, pH	0,055
Tempo, ART, AMM	0,046
Tempo, ART, Melaço	0,053
Tempo, ART, pH, AMM	0,037
Tempo, ART, pH, Melaço	0,042
Tempo, ART, AMM, Melaço	0,039
Tempo, ART, AMM, Melaço, pH	0,034

A modelagem híbrida requer, além da configuração da rede neural, a determinação do modelo cinético que melhor representa o processo. Os resultados apresentados no Cap. III referentes à modelagem fenomenológica mostrou que após o desenvolvimento das estratégias de modelagem foi possível a seleção de 5 modelos cinéticos. Neste capítulo, estes modelos serão testados com o objetivo de escolher o modelo cinético adequado ao processo de produção de inulinase.

A Tabela V.4 apresenta os resultados da escolha do melhor modelo cinético com relação ao valor da FO. O melhor resultado foi obtido com o emprego do modelo 4 (FO = 0,034), sendo ele definido como o melhor modelo para representar o processo. Na Figura V.4 é possível visualizar a qualidade do ajuste para os modelos cinéticos na condição experimental com ART = 60 g.L⁻¹, onde fica evidente que o modelo 4 representa melhor o processo.

Tabela V.4: Influência do modelo cinético no valor da FO para o modelo híbrido

Modelo	FO
4	0,034
15	0,075
18	0,086
23	0,048
25	0,068

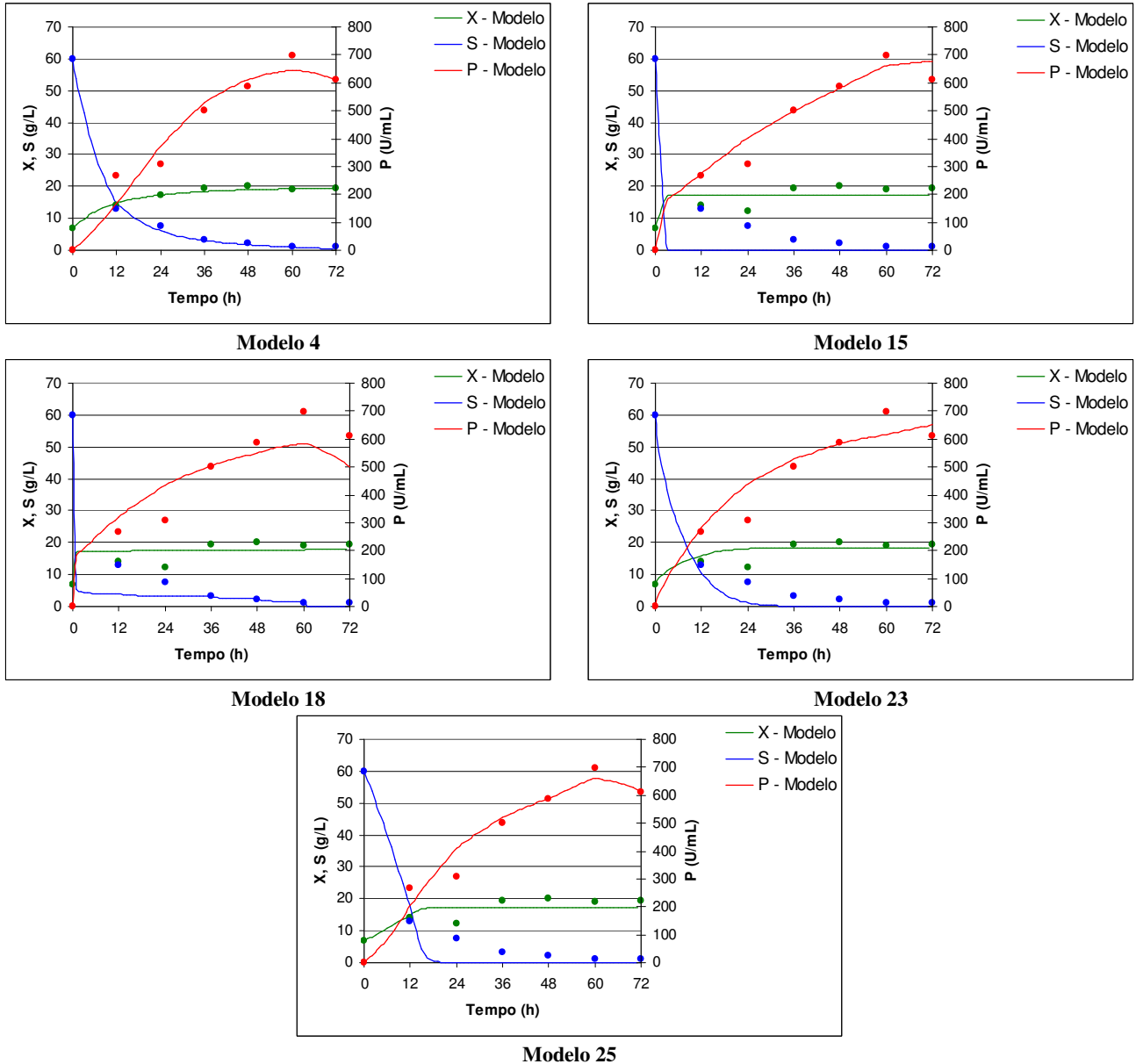


Figura V.4: Influência do modelo cinético na qualidade do ajuste do modelo híbrido

A partir dos resultados obtidos até o momento a melhor configuração encontrada para o modelo híbrido foi de 8 neurônios na camada interna, 5 entradas e o modelo cinético que melhor representa o processo é o modelo 4, o qual é apresentado novamente na equação V.1. A Figura V.5 apresenta o resultado da simulação para os 7 experimentos usados no treinamento dos pesos da rede neural. Em cada um dos 7 gráficos da Figura V.5 são apresentados os valores dos coeficientes de regressão (r) para concentração celular, concentração de ART e concentração de produto.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s X + S} \quad (V.1)$$

O ajuste para o crescimento microbiano na Figura V.5 foi satisfatório nas condições experimentais com ART = 60 g.L⁻¹ e com ART = 70 g.L⁻¹, onde o valor de r foi superior a 0,950. O pior ajuste foi verificado na condição com ART = 80 g.L⁻¹ (r = 0,452). Nas demais condições experimentais o valor de r permaneceu em torno de 0,850. Os resultados obtidos em relação ao crescimento microbiano não são plenamente satisfatórios por duas razões principais. Primeiro, na equação IV.5 foi definido um peso menor para o ajuste de células, explicando, em partes, os resultados pouco expressivos com relação ao valor de r. Em segundo lugar, o balanço para células é simplificado e não prevê a fase de morte dos microrganismos. Sendo assim, o modelo não consegue prever a morte celular. Além disso, o crescimento microbiano é dependente apenas da concentração de ART. Como a concentração de ART atinge valores críticos antes de 24h de fermentação e, conseqüentemente, limitando o crescimento dos microrganismos, o modelo não consegue prever crescimento após esse período, explicando o fato da concentração máxima de células nunca atingir o valor obtido experimentalmente. Esta mesma deficiência foi observada durante o desenvolvimento da modelagem fenomenológica, apresentada no Cap III.

O ajuste para o consumo de substrato da Figura V.5 mostra que o emprego do modelo híbrido foi eficiente na modelagem da cinética. Para todas as condições experimentais o coeficiente de regressão apresentou valores superiores a 0,970. A idéia inicial de que os parâmetros do processo são extremamente dependentes das condições de operação foi comprovada com o emprego do modelo híbrido. Diferente do ajuste de células, onde há uma dependência da concentração de substrato e dos parâmetros do modelo, o consumo de substrato apresenta uma dependência muito maior do conjunto de parâmetros do processo. Devido à habilidade das redes em estimar estes parâmetros nota-se uma melhora significativa no ajuste para substrato, quando comparado com a modelagem fenomenológica.

O ajuste para a formação de produto da Figura V.5 apresentou os resultados mais expressivos até o momento. O modelo híbrido representou bem a tendência do processo, além de possibilitar a obtenção de um coeficiente de regressão superior a 0,940 para todas

as condições experimentais. A modificação proposta no balanço para produto foi eficiente e conseguiu representar bem a tendência de desnaturação enzimática em algumas condições experimentais. Por exemplo, na condição com $ART = 70 \text{ g.L}^{-1}$, onde o efeito de desnaturação é mais pronunciado, o ajuste obtido foi excelente ($r = 0,968$) quando comparados com a modelagem fenomenológica e empírica. Na condição experimental com $ART = 100 \text{ g.L}^{-1}$, onde ocorre a máxima produção de inulinase, foi possível obter uma boa aproximação para a formação de produto em termos qualitativos (ajuste visual) e quantitativos ($r = 0,963$).

Em relação ao ajuste para produto, na modelagem fenomenológica não foi possível obter um bom ajuste com a modificação do balanço. Isso ocorreu, pois o termo proposto era somente dependente do tempo de fermentação. Assim, o modelo previa a existência da desnaturação mesmo em condições onde a mesma não ocorria. Com o emprego do modelo híbrido, onde as redes são usadas para estimar os parâmetros, este termo deixa de ser unicamente dependente do tempo de fermentação e passa a ser dependente também das entradas da rede neural, ou seja, das condições experimentais. A combinação das vantagens do modelo fenomenológico e das redes neurais possibilitou a obtenção de uma excelente representação do processo.

Apesar do modelo híbrido apresentar a habilidade de representar melhor os dados experimentais, quando comparados à modelagem fenomenológica e a modelagem empírica, algumas limitações tornam-se evidentes. A falta de informações claras a respeito do processo prejudicou o ajuste para o crescimento microbiano, mesmo com a utilização de redes neurais para estimar os parâmetros. Por exemplo, as informações sobre a produção e consumo de etanol, acetato e glicerol são importantíssimas (mesmo na modelagem híbrida) para explicar o crescimento microbiano. Por melhor estimados que sejam os parâmetros, haverá sempre a limitação da concentração de substrato no meio, onde a concentração de ART torna-se limitante antes de 24h de fermentação. Como o modelo não leva em consideração os demais metabólitos, não há previsão de crescimento após esse período. No ajuste para o consumo de substrato e formação de produto, onde o modelo é mais dependente dos parâmetros, o ajuste foi excelente.

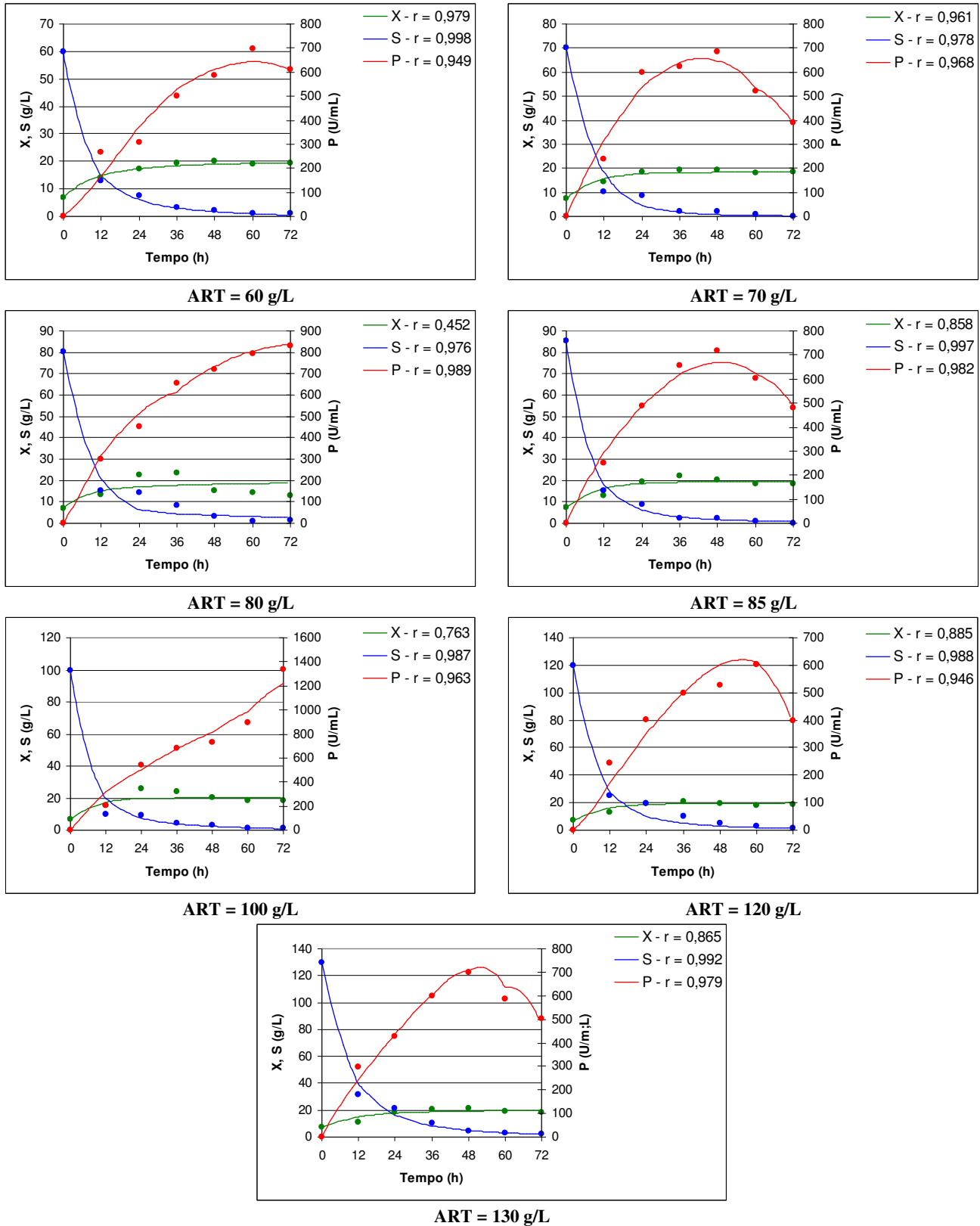


Figura V.5: Simulação dos resultados do treinamento do modelo híbrido

A Figura V.6 apresenta os resultados referentes à validação do modelo híbrido empregado neste trabalho. Por razões explicadas anteriormente, o ajuste para células não foi satisfatório nas duas condições experimentais. O ajuste para o consumo de substrato apresentou um bom ajuste com $r = 0,993$ e $r = 0,998$ para as condições com $ART = 90 \text{ g.L}^{-1}$ e $ART = 110 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Na condição com $ART = 90 \text{ g.L}^{-1}$ o modelo não conseguiu prever a desnaturação sofrida pela inulinase nas últimas 12h de fermentação. Nos demais pontos houve uma boa representação do processo. Na condição com $ART = 110 \text{ g.L}^{-1}$ o ajuste para produto foi satisfatório ($r = 0,998$).

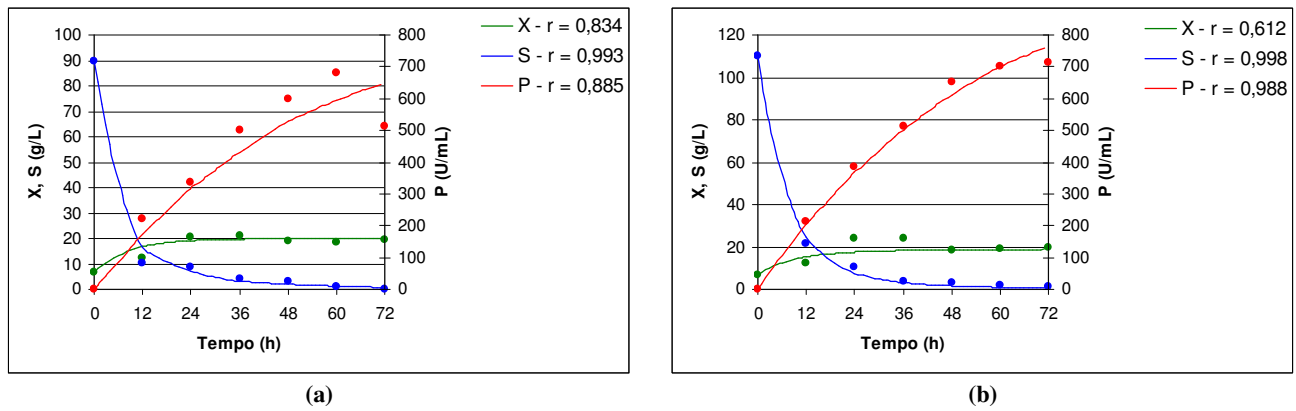


Figura V.6: Simulação dos resultados da validação do modelo híbrido: (a) $ART = 90 \text{ g.L}^{-1}$ e (b) $ART = 110 \text{ g.L}^{-1}$

A Tabela V.5 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos fornecidos pelas redes neurais para 2 condições experimentais. Esta tabela tem por objetivo mostrar a vantagem das redes em estimar os parâmetros do modelo e, por essa razão, foram escolhidas somente 2 condições experimentais, uma vez que esses parâmetros mudam para cada experimento. As duas condições experimentais apresentadas foram selecionadas por apresentarem comportamentos bem distintos. Na condição com $ART = 70 \text{ g.L}^{-1}$ ocorre o efeito de desnaturação mais pronunciado e na condição com $ART = 100 \text{ g.L}^{-1}$ ocorre a maior produção da inulinase. Como os dados experimentais usados nesta dissertação foram determinados em intervalos regulares de 12h, os mesmos são alimentados na rede a cada 12h de fermentação. Sendo assim, para cada condição experimental haverá seis conjuntos de parâmetros, conforme pode ser mais bem visualizado na Tabela V.5.

Na condição com $ART = 70 \text{ g.L}^{-1}$ o valor de μ_{\max} aumenta gradativamente para cada intervalo de tempo. Apesar da velocidade máxima de crescimento aumentar durante os intervalos, o que se verifica na prática é uma desaceleração no crescimento após 36h de fermentação. Isso ocorre devido às limitações de substrato e porque o valor de k_s também aumenta gradativamente no decorrer do processo. O rendimento de substrato em células ($Y_{x/s}$) apresenta um aumento gradativo no seu valor. Nas primeiras 24h de fermentação ocorre um consumo acelerado de substrato sem que haja a máxima produção de células. Nos períodos finais, mesmo que o crescimento praticamente não exista, o consumo de ART é praticamente zero, implicando em valores maiores para o parâmetro $Y_{x/s}$. O fato interessante é o valor dos parâmetros α , β e λ , os quais são parâmetros da equação de balanço para produto. O valor de α apresenta aumento gradativo no seu valor, atingindo o máximo valor no intervalo final de fermentação. O parâmetro β apresenta comportamento contrário, com uma diminuição gradativa no seu valor no decorrer da fermentação. O parâmetro λ mantém-se praticamente constante em todo o intervalo. O forte efeito de desnaturação verificado nesta condição experimental é caracterizada pela diminuição gradativa do parâmetro β e pelos valores praticamente constantes de λ . O parâmetro α , apesar de aumentar não prejudica o ajuste nos pontos finais, pois o valor de μ (o qual multiplica α) é próximo à zero, fazendo com que esse termo seja um número baixo.

Na condição com $ART = 100 \text{ g.L}^{-1}$ o valor de μ_{\max} aumenta até 24h de fermentação, onde se verifica a maior taxa de crescimento. Após esse período ocorre uma redução gradativa no seu valor, devido à desaceleração de crescimento e morte dos microorganismos. Os parâmetros k_s e $Y_{x/s}$ apresentaram comportamento semelhante à condição experimental com $ART = 70 \text{ g.L}^{-1}$. As maiores alterações foram verificadas nos parâmetros α , β e λ . Na prática, esta condição experimental apresentou comportamento contrário ao caso anterior e das demais condições experimentais. O parâmetro α apresentou um acréscimo pronunciado no seu valor no decorrer das etapas de fermentação. Porém, β apresentou um sensível diminuição com o passar das etapas. O maior responsável pela característica de aumentar a produção da enzima no final da fermentação foi a diminuição gradativa do parâmetro λ , principalmente a partir de 36h de fermentação.

Tabela V.5: Valores dos parâmetros estimados pelas redes neurais no modelo híbrido

Intervalo de tempo (h)	$0 \leq t < 12$	$12 \leq t < 24$	$24 \leq t < 36$	$36 \leq t < 48$	$48 \leq t < 60$	$60 \leq t < 72$
ART = 70 g.L⁻¹						
μ_{\max} (h ⁻¹)	0,282	0,296	0,364	0,380	0,404	0,412
k_s (g.L ⁻¹)	10,899	10,615	10,720	11,694	13,413	15,112
$Y_{x/s}$	0,160	0,156	0,178	0,180	0,197	0,209
α (U.mL ⁻¹)	$4,234 \times 10^{-2}$	$6,885 \times 10^{-2}$	0,374	0,908	3,214	7,396
β (U.mL ⁻¹ .h ⁻¹)	1,911	1,465	0,761	0,595	0,431	0,344
λ (h ⁻¹)	$5,034 \times 10^{-2}$	$5,012 \times 10^{-2}$	$5,383 \times 10^{-2}$	$5,244 \times 10^{-2}$	$5,052 \times 10^{-2}$	$4,738 \times 10^{-2}$
ART = 100 g.L⁻¹						
μ_{\max} (h ⁻¹)	0,366	0,369	0,341	0,319	0,297	0,281
k_s (g.L ⁻¹)	17,059	19,224	20,053	21,243	21,680	21,930
$Y_{x/s}$	0,114	0,269	0,270	0,393	0,409	0,439
α (U.mL ⁻¹)	0,757	3,908	5,350	11,508	13,503	15,428
β (U.mL ⁻¹ .h ⁻¹)	1,604	1,090	1,144	0,957	0,961	0,916
λ (h ⁻¹)	$6,230 \times 10^{-2}$	$5,064 \times 10^{-2}$	$4,674 \times 10^{-2}$	$3,575 \times 10^{-2}$	$3,203 \times 10^{-2}$	$2,810 \times 10^{-2}$

V.4 CONSIDERAÇÕES

Este capítulo apresentou o emprego de modelos híbridos como alternativa de modelagem da produção de inulinase em biorreator batelada, bem como os resultados obtidos. As redes neurais foram usadas para estimar os parâmetros do processo e os modelos fenomenológicos foram usados como modelos de tendência. No primeiro momento foram definidos o número de neurônios internos, o número de entradas e o modelo cinético que melhor representou o processo. Por fim, foram apresentados os resultados da simulação para a melhor configuração do modelo híbrido.

Neste trabalho, apesar da configuração com 5 neurônios na camada intermediária apresentar o menor valor da FO, foram usados 8 neurônios, pois com essa configuração foi possível obter um conjunto de parâmetros que representasse melhor a dinâmica do processo. A combinação de tempo de fermentação, concentração inicial de ART, concentração inicial de AMM, concentração inicial de melaço e pH apresentou-se como a melhor configuração de entrada para a rede. O modelo de crescimento microbiano 4 foi definido como sendo o modelo que melhor representa o processo de produção de inulinase.

O emprego de modelos híbridos apresentou os melhores resultados quando comparados com a modelagem fenomenológica e a modelagem empírica. O ajuste obtido

para o crescimento microbiano não foi plenamente satisfatório, porém esse era um comportamento esperado devido às limitações encontradas. O modelo híbrido foi eficiente no ajuste para produto e substrato em todas as condições experimentais, inclusive as condições da validação do modelo. A utilização de redes neurais como alternativa de estimar parâmetros não facilmente mensuráveis ou entendidos é interessante para solucionar o problema de estimação.

Para finalizar a modelagem matemática da produção de inulinase em biorreator batelada o Capítulo VI apresenta uma comparação entre as alternativas de modelagem, bem como a evolução do trabalho.

CAPÍTULO VI

**COMPARAÇÃO DAS DIFERENTES TÉCNICAS DE
MODELAGEM: MODELO FENOMENOLÓGICO,
EMPÍRICO E HÍBRIDO.**

VI.1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de modelos matemáticos em bioprocessos requer um cuidadoso estudo sobre os fenômenos envolvidos durante os experimentos. A modelagem de processos muito complexos e/ou cujo conhecimento é incompleto tende a ser mais eficiente através de redes neurais. Já em situações onde o conhecimento teórico é altamente consolidado, os modelos fenomenológicos tendem a ser mais robustos. Os modelos híbridos possibilitam a utilização de todo o conhecimento sobre o assunto da maneira mais adequada em cada parte do modelo, além de combinar as técnicas de forma a melhor acomodar os objetivos e os custos de desenvolvimento. A modelagem matemática da produção de inulinase abordou três técnicas de modelagem distintas.

O Cap III apresentou a modelagem fenomenológica da produção de inulinase, onde foi considerado o balanço de massa para as variáveis de estado. Foram abordadas três estratégias de modelagem, que são: escolha do modelo cinético do processo, desenvolvimento de um modelo de 2 fases e modificação na equação de balanço para produto.

O Capítulo IV apresentou a modelagem empírica baseada no emprego de redes neurais como uma ferramenta do tipo “caixa-preta”, ou seja, as redes desempenharam apenas a tarefa de fornecer uma relação entrada/saída do processo de produção de inulinase em batelada. Nenhuma informação sobre o comportamento do processo foi usada durante o desenvolvimento da modelagem empírica.

O Cap V apresentou a modelagem híbrida da produção de inulinase. Os modelos híbridos combinaram as vantagens dos modelos fenomenológicos, os quais permitem uma maior extrapolação das condições de operação, com a habilidade das redes em aproximar fenômenos complexos e de difícil compreensão. As redes neurais foram usadas para estimar os parâmetros do processo e as equações de balanço foram usadas como modelos de tendência do mesmo.

A melhor técnica matemática para representar o processo é a que forneça os resultados mais precisos e de qualidade. Dessa forma, o Cap. VI tem por objetivo apresentar uma comparação entre as três técnicas de modelagem abordadas nesta

dissertação. Os resultados serão apresentados de forma a mostrar os avanços obtidos durante a realização das diversas etapas, bem como as principais vantagens e desvantagens de cada técnica.

VI.2 COMPARAÇÃO QUALITATIVA DAS TÉCNICAS DE MODELAGEM

Após o desenvolvimento e aplicação das três técnicas de modelagem abordadas nessa dissertação é necessário apresentar uma comparação entre os resultados obtidos em cada uma das técnicas. A seguir serão apresentados os resultados para algumas condições experimentais, envolvendo os três modelos. Os resultados referentes ao modelo fenomenológico e ao modelo híbrido dizem respeito ao emprego do modelo cinético 4, além da modificação proposta na equação de balanço para produto, a qual leva em conta a desnaturação sofrida pela inulinase. O modelo empírico e a configuração da rede para o modelo híbrido são as mesmas apresentadas na configuração ótima em cada um dos casos.

A Figura VI.1 apresenta os resultados da simulação para a condição com $ART = 80 \text{ g.L}^{-1}$ nas três abordagens de modelagem. O modelo empírico apresentou o melhor ajuste para o crescimento microbiano, consumo de substrato e formação de produto, apesar das RNAs não apresentar dificuldades em estimar as condições iniciais. As redes neurais conseguiram prever com eficiência todas as fases do crescimento microbiano. Porém, os modelos híbrido e fenomenológico não representaram bem o processo, possivelmente devido à carência de informações a cerca da produção e consumo de metabólitos primários e a simplificação na equação de balanço para células, desconsiderando a morte celular.

O modelo fenomenológico não representou bem a cinética do consumo de substrato. O desenvolvimento de modelos fenomenológicos exige que os dados usados sejam representativos dos fenômenos que ocorrem durante a fermentação. Na carência de informações, os parâmetros do modelo não são bem estimados, implicando num ajuste ruim. O aspecto que chama mais a atenção na Figura VI.1 é o ajuste para a formação de produto. O modelo fenomenológico prevê um forte efeito de desnaturação no final da fermentação, apesar deste fenômeno não ser verificado experimentalmente. Como a modificação proposta na equação do balanço sugere é função do tempo de fermentação, o modelo sempre irá prever este efeito, mesmo em condições onde não ocorre. O modelo

híbrido apresenta uma melhor capacidade de predição, onde a modificação proposta apresentou melhor resultados, pois o termo não é somente dependente do tempo de fermentação, mas também das entradas do modelo híbrido.

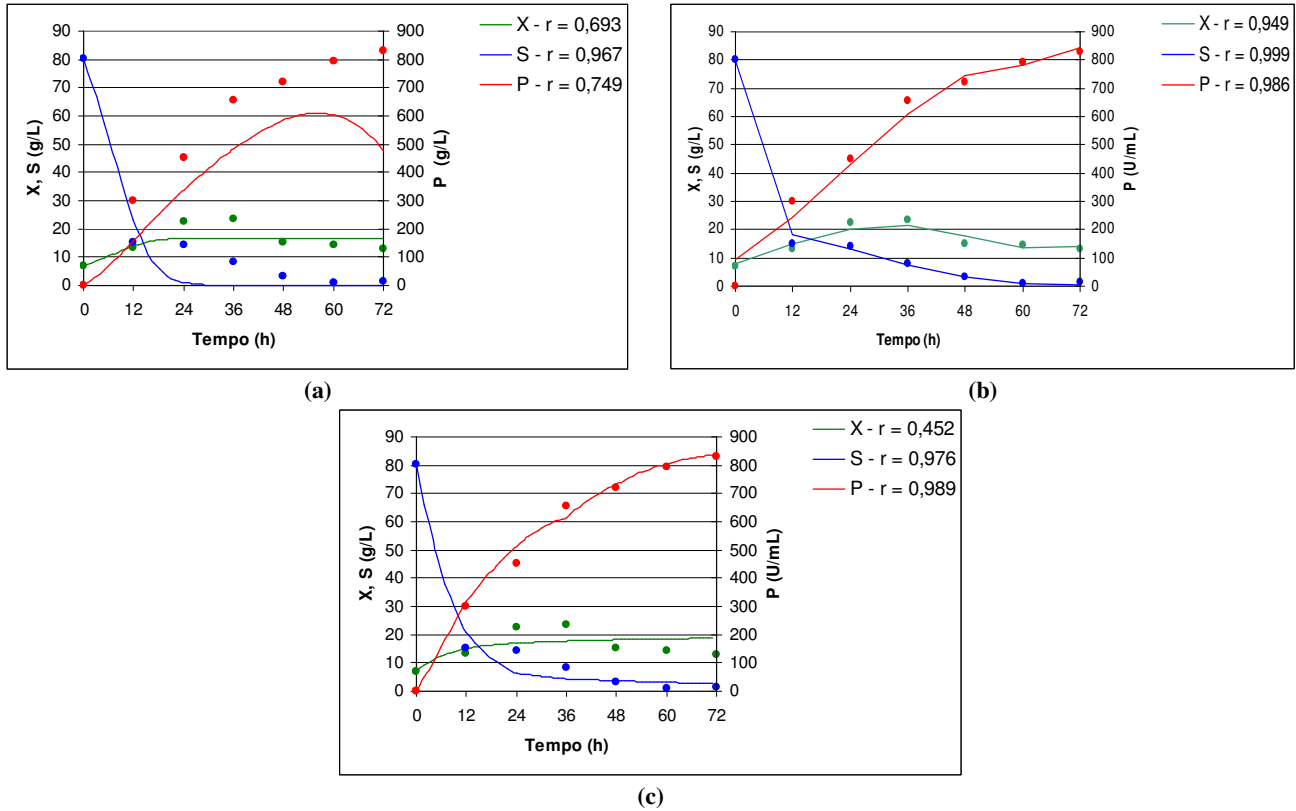


Figura VI.1: Ajuste dos modelos fenomenológico (a), empírico (b) e híbrido (c)
(ART = 80 g.L⁻¹)

A Figura VI.2 apresenta os resultados da simulação para a condição com ART = 85 g.L⁻¹. O melhor ajuste para a concentração celular foi obtido empregando o modelo empírico, apesar dos modelos híbrido e fenomenológico apresentarem resultados satisfatórios, dentro das limitações dos dados experimentais. Os modelos empírico e híbrido apresentaram bons resultados com relação ao ajuste para consumo de substrato, apresentando um valor de $r = 0,997$. A modificação proposta na equação de balanço para produto apresentou bons resultados nessa condição experimental, tanto para o modelo híbrido quanto para o modelo fenomenológico. As RNAs apresentaram resultados insatisfatórios com relação ao ajuste da formação de produto. Como o número de dados

experimentais usados durante o treinamento das redes não foi muito grande, existe a dificuldade em estimar os pesos de maneira que pudesse prever a desnaturação sofrida pela enzima. A existência de fenômenos complexos ou difíceis de serem explicados necessita de uma quantidade maior de dados experimentais para poder treinar as redes de maneira satisfatória. Essa é uma das limitações do emprego de RNAs para a modelagem de bioprocessos.

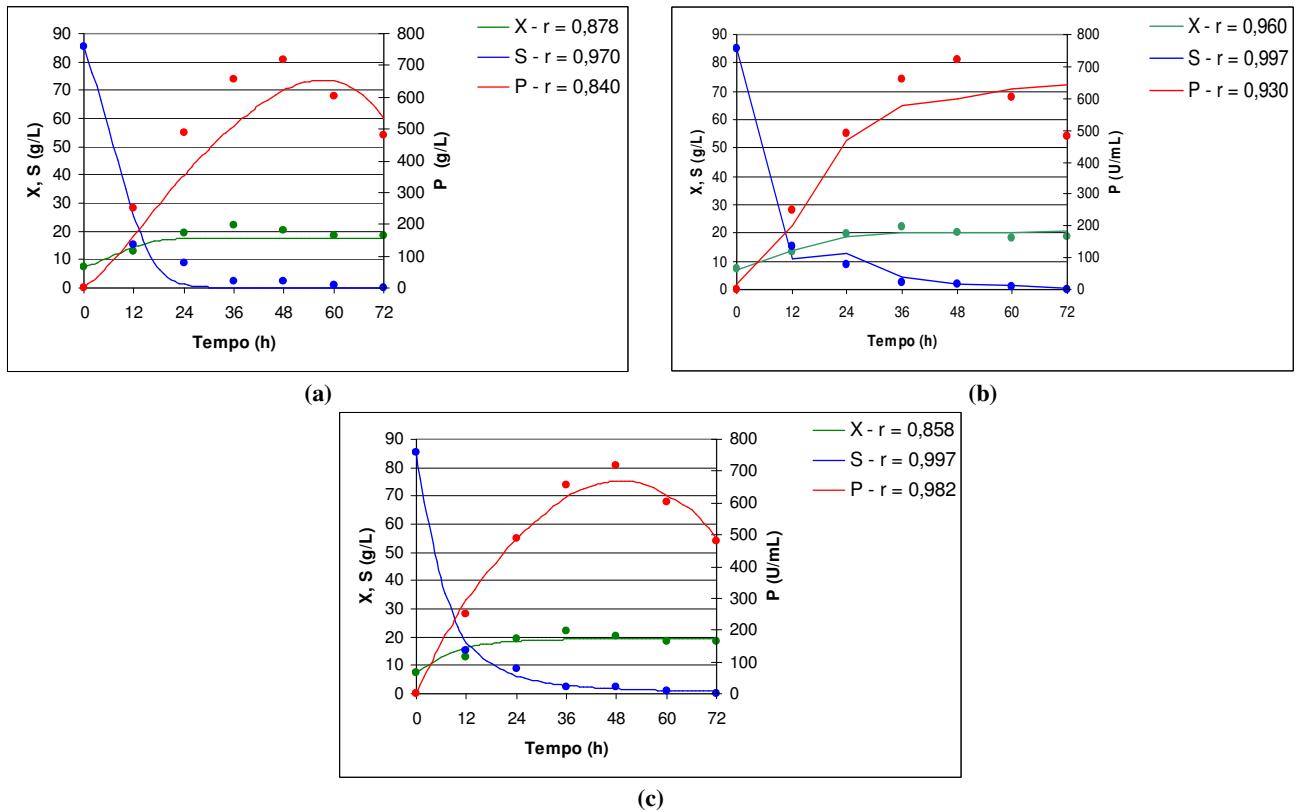


Figura VI.2: Ajuste dos modelos fenomenológico (a), empírico (b) e híbrido (c)

$$(ART = 85 \text{ g.L}^{-1})$$

A Figura VI.3 apresenta os resultados da simulação para a condição com $ART = 100 \text{ g.L}^{-1}$. Nesta condição experimental ocorre a maior produção da inulinase e, conseqüentemente, deseja-se que os modelos testados ajustem bem estes dados. O ajuste para crescimento microbiano apresentou comportamento semelhante ao observado anteriormente. Apesar do coeficiente de regressão para o ajuste do consumo de substrato ser menor no modelo híbrido em comparação com o modelo empírico, o modelo híbrido

apresenta um comportamento mais estável. O ajuste para a formação de produto foi melhor representado empregando o modelo híbrido. Comparando o ajuste dos três modelos percebe-se uma estabilidade maior empregando o modelo híbrido do que comparando ao uso exclusivo do modelo fenomenológico ou redes neurais.

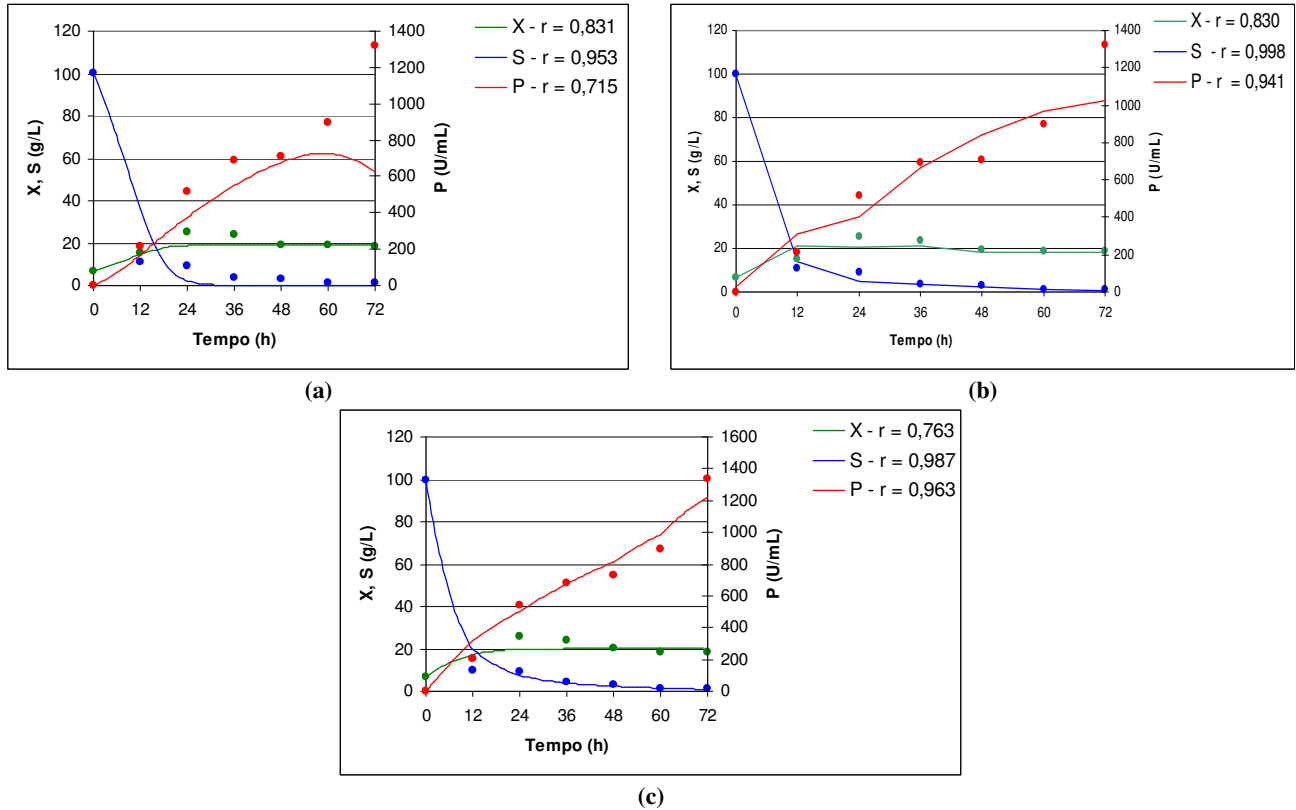


Figura VI.3: Ajuste dos modelos fenomenológico (a), empírico (b) e híbrido (c)
(ART = 100 g.L⁻¹)

A Figura VI.4 apresenta os resultados da simulação para a condição com ART = 110 g.L⁻¹. Esta condição experimental foi usada durante a validação dos modelos. O modelo fenomenológico ajustou bem a formação de produto, com um aumento nos desvios a partir de 36h de fermentação. O crescimento celular, apesar das limitações apresentadas, apresentou foi bem ajustado. As RNAs ajustaram bem o consumo de substrato e o crescimento celular. O ajuste com relação a formação de produto apresentou resultados insatisfatórios (r = 0,623). Os melhores resultados foram obtidos com o emprego do modelo híbrido, o qual representou de forma satisfatória a cinética do consumo de substrato

e formação de produto. O crescimento celular não apresentou um ajuste insatisfatório. Os resultados da Figura VI.4 são muito importantes do ponto de vista da modelagem. Em virtude da qualidade do ajuste obtido com o emprego do modelo híbrido há a possibilidade da utilização desse modelo no projeto de novas configurações de biorreatores ou na utilização do modelo como uma ferramenta de controle do processo.

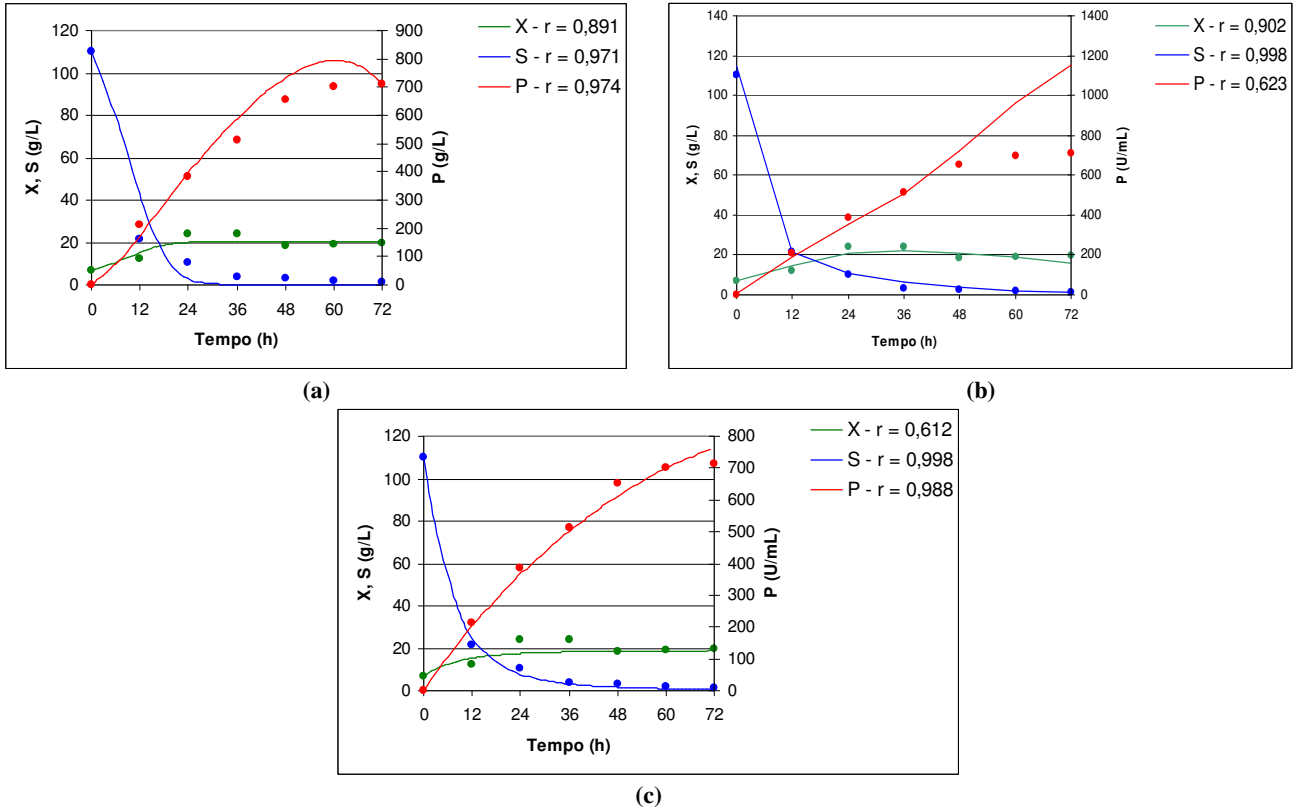


Figura VI.4: Ajuste dos modelos fenomenológico (a), empírico (b) e híbrido (c)
(ART = 110 g.L⁻¹)

VI.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE AS TÉCNICAS DE MODELAGEM

A partir dos resultados apresentados para cada uma das técnicas de modelagem, é interessante apresentar algumas considerações importantes sobre as mesmas. Serão discutidos e comparados os aspectos como: grau de conhecimento teórico sobre o processo, quantidade de dados experimentais, qualidade dos dados experimentais e abrangência de

cada modelo. Uma boa discussão desses itens facilita o entendimento dos resultados obtidos nesse trabalho.

O desenvolvimento de um modelo fenomenológico requer um estudo detalhado sobre o conjunto de fenômenos bioquímicos e físico-químicos do processo, onde o mesmo sempre é governado pelas leis fundamentais. Em se tratando de processos fermentativos é necessário também conhecer os efeitos de interação entre microrganismo e substrato, para que seja possível a escolha do modelo cinético adequado para a representação do sistema. A escolha desse modelo cinético deve levar em conta aspectos como inibição por substrato ou produto e/ou efeitos de desnaturação de enzimas ou proteínas. As redes neurais, por outro lado, requerem um menor conhecimento teórico sobre o processo. Normalmente, as entradas das redes são variáveis manipuladas do processo. No caso de fermentações é comum usar como entradas a concentração inicial de substrato, temperatura, pH, entre outros.

Um modelo fenomenológico exige um conjunto mínimo de dados necessários de maneira que os mesmos consigam explicar os fenômenos envolvidos e sejam adequados para estimar os parâmetros do modelo. A quantidade insuficiente de dados causa uma grande dificuldade durante a etapa de estimação de parâmetros. As redes neurais, por outro lado, exigem uma grande quantidade de dados de entrada, o que por vezes acaba inviabilizando o seu uso. A necessidade de um grande número de dados experimentais reside no fato de que as redes precisam ser treinadas para que possam simular bem o processo. Sendo assim, é muito difícil obter bons resultados com poucos dados, mostrando uma das principais deficiências das redes.

Um outro aspecto muito importante relacionado aos dados experimentais diz respeito à qualidade dos mesmos. Como os modelos fenomenológicos são baseados em fenômenos físicos (ou seja, fenômenos reais) há a necessidade de que os dados experimentais sejam os mais precisos possíveis. Dados com imprecisão podem levar a falhas durante a estimação de parâmetros, levando o modelo proposto a não representar o que se deseja. A teoria das redes neurais indica que elas podem ser treinadas com dados contendo ruídos, uma vez que a informação é distribuída pelos vários neurônios, que por sua vez, apresentam uma pequena influência no resultado final. Pela lógica, quanto maior o

conjunto de dados de treinamento, menor será a influência dos ruídos no resultado final. No entanto, a eliminação dos ruídos irá melhorar o desempenho da rede e possibilitar o treinamento do modelo com um conjunto menor de dados.

De uma maneira geral, os modelos fenomenológicos permitem uma maior extrapolação e/ou variação nas condições de processo, pois a simples alteração nas condições do processo não altera os fenômenos físicos, químicos e biológicos que ocorrem num fermentador, por exemplo. No entanto, é importante saber como os parâmetros do modelo comportam-se a esta extrapolação das condições operacionais. Este comportamento pode ser determinado através da análise da sensibilidade paramétrica. Por outro lado, as redes neurais são limitadas pela faixa de operação para as quais foram treinadas. Esta limitação é mais evidente quando a inter-relação entre as variáveis se torna mais complexa.

Os modelos híbridos, por sua vez, apresentam como principal vantagem à combinação do conhecimento dos princípios físicos para aproximar as partes explicáveis do processo, com as redes neurais para estimar os parâmetros não-lineares ou complexos, de forma a minimizar as incertezas. De uma maneira geral, os modelos híbridos necessitam de um número menor de dados para assimilar o comportamento do sistema, quando comparados com as redes neurais puras. Além disso, há uma melhora considerável na capacidade de extrapolação das condições operacionais com o emprego do modelo híbrido, devido à existência das equações de balanço que atuam como um modelo de tendência do processo.

Analisando as equações do modelo fenomenológico apresentadas no Cap III é fácil identificar que o consumo de ART afeta diretamente o crescimento microbiano que, conseqüentemente, afeta a formação de produto associado ao crescimento. Em outras palavras, pela simples análise das equações do modelo é possível determinar a importância de determinado parâmetro ou variável de estado no processo. Ao se observar os neurônios de uma rede neural, seus pesos e fatores, é impossível afirmar quem afeta mais o processo, pois os neurônios não trazem a informação de cada variável separadamente, mas do resultado do somatório entre todas elas. O modelo híbrido, por sua vez, permite identificar com mais clareza as variáveis e/ou parâmetros que possuem maior ação sobre o processo.

VI.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O *SIMULATED ANNEALING*

O *Simulated Annealing* (SA) é um método estocástico de otimização que vem sendo amplamente usado nas mais diversas áreas do conhecimento. Dentro da engenharia de bioprocessos o seu emprego está restrito a problemas envolvendo a otimização dinâmica de biorreatores operando em batelada ou batelada alimentada (KOOKOS, 2004). Neste trabalho, o SA foi usado para a otimização dos parâmetros cinéticos do modelo fenomenológico e otimização dos pesos e *bias* da RNAs e do modelo híbrido. Nesta seção serão apresentadas algumas considerações sobre o emprego do SA para a estimação de parâmetros em bioprocessos.

No Cap. III foi apresentado o desenvolvimento da modelagem fenomenológica, onde o SA foi empregado para estimar os parâmetros cinéticos do modelo. O emprego do SA como um método de estimação de parâmetros de bioprocessos mostrou ser atrativa. No caso da modelagem fenomenológica, onde havia um número reduzido de parâmetros o SA apresentou um tempo computacional em torno de 15 segundos (INTEL Core Duo 1,66 GHz, 1024 MB RAM), apresentando em torno de 1500 avaliações da FO, dependendo do modelo cinético selecionado.

No Cap. IV o SA foi usado para estimar os pesos e *bias* da RNAs, onde apresentou um tempo computacional de aproximadamente 45 segundos (INTEL Core Duo 1,66 GHz, 1024 MB RAM). Cabe ressaltar que no emprego de RNAs o número de pesos a ser otimizado é muito maior quando comparado com a modelagem fenomenológica.

Cap. V o SA foi usado para estimar os pesos e *bias* do modelo híbrido. Nesse caso, o SA apresentou uma eficiência computacional menos expressiva que nos casos anteriores, apresentando um tempo computacional em torno de 15 minutos (INTEL Core Duo 1,66 GHz, 1024 MB RAM), apresentando em torno de 70.000 avaliações da FO dependendo do modelo cinético.

Como pode ser observado, quando se aumenta o número de parâmetros a serem otimizados, ou utiliza uma FO mais complexa (como é o caso do modelo híbrido) a eficiência computacional do método reduz drasticamente. No entanto, o elevado custo computacional é compensado pela robustez. Neste trabalho não é apresentada uma

comparação entre o SA com outros métodos de otimização. EFTAXIAS *et al.* (2002) compararam a performance do SA na estimação de parâmetros cinéticos não lineares com o método tradicional de Levenberg-Marquardt (L-M). Ambos os métodos foram testados em três modelos cinéticos diferentes aumentando progressivamente a complexidade. O método de L-M apresentou melhor performance na estimação de reações com poucos parâmetros cinéticos. O SA apresentou excelente performance conforme a complexidade do problema aumentou.

Uma das principais vantagens do emprego do SA para a otimização de parâmetros de bioprocessos é a possibilidade de definir os limites de busca para os parâmetros cinéticos. Tal característica do método permite que se estipulem os limites condizentes com o bioprocessos em questão, impedindo a estimação de parâmetros sem significado biológico. Uma das dificuldades desse trabalho foi justamente definir os limites para os parâmetros, e uma vez que se dispunha de poucas informações sobre o comportamento cinético do microrganismo *Kluyveromyces marxianus*.

VI.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este capítulo apresentou alguns resultados obtidos após o desenvolvimento das três estratégias de modelagem. Além disso, foram discutidos aspectos qualitativos de cada técnica, suas vantagens e desvantagens. Os resultados foram apresentados de maneira que permitisse a comparação entre os modelos fenomenológico, empírico e híbrido.

A falta de informações a respeito da produção e consumo de etanol, acetato e glicerol, prejudicaram o desenvolvimento de um modelo fenomenológico mais eficiente. Estes dados seriam importantíssimos para uma melhor estimação dos parâmetros, o que, conseqüentemente, implicaria numa melhor qualidade do ajuste. A alteração proposta na equação de balanço para produto é interessante, mas da maneira como foi colocada não representou bem os dados. As redes neurais, apesar de ajustar bem o consumo de substrato e o crescimento microbiano, não representaram bem a formação de produto. Os resultados obtidos evidenciaram a necessidade de uma quantidade maior de dados para o treinamento da rede.

O modelo híbrido apresentou excelentes resultados com relação ao ajuste para substrato e produto. No entanto, o crescimento celular apresentou um ajuste ruim, devido às razões exemplificadas na discussão do modelo fenomenológico. O emprego de redes neurais é uma boa alternativa para estimar parâmetros não lineares e que são extremamente dependentes das condições de operação do processo. O resultado obtido para o ajuste de substrato e, principalmente, produto confirma tal afirmação. Por exemplo, o parâmetro λ na modelagem fenomenológica foi estimado pelo SA sem ter nenhuma correlação com a operação do biorreator. Os resultados obtidos foram pouco satisfatórios. Na modelagem híbrida, este parâmetro era dependente das entradas da rede neural e os resultados foram melhores.

CAPÍTULO VII

**CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS
FUTUROS**

VII.1 CONCLUSÕES

Este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento da modelagem matemática da produção de inulinase em biorreator batelada, empregando resíduos agroindustriais como substratos. Foram desenvolvidas três técnicas de modelagem: modelo fenomenológico, modelo empírico e modelo híbrido. Dentro da modelagem fenomenológica foram desenvolvidas três estratégias de modelagem: na primeira foi investigada a influência de 27 modelos cinéticos de crescimento microbiano, objetivando escolher o modelo que melhor representasse o processo; na segunda foi empregado um modelo de duas fases; na terceira foi proposta uma modificação no balanço para produto, de maneira que pudesse levar em consideração a desnaturação sofrida pela inulinase nos períodos finais de fermentação. Na modelagem empírica, baseada nas redes neurais, foi investigada a arquitetura ideal da rede que melhor representasse os dados experimentais. Foram testados o número de neurônios na camada intermediária, a melhor função de ativação e o número de entradas da rede. Na modelagem híbrida as redes neurais foram usadas para fornecer os parâmetros do modelo e as equações de balanço atuaram como modelos de tendência do processo. Na parte fenomenológica foi investigada a influência do modelo cinético no ajuste e na parte empírica foi investigada a configuração ideal da rede.

Os resultados obtidos com o emprego da modelagem fenomenológica não foram satisfatórios com relação ao ajuste. Ficou evidente que a falta de dados experimentais referentes à produção e consumo de etanol, acetato e glicerol prejudicou a etapa de estimação dos parâmetros. Como o crescimento microbiano era dependente apenas da concentração de ART e, esta atingia valores críticos em até 24h de fermentação, o modelo não previa mais crescimento celular. Sendo assim, o ajuste para a concentração celular e, conseqüentemente, o ajuste para formação de produto na parte associada ao crescimento ficou prejudicado.

A maior limitação do emprego de redes neurais é a quantidade de dados experimentais necessários para o treinamento da rede. Neste trabalho, onde o efeito de desnaturação enzimática é complexo e não há dados experimentais para elucidá-lo, percebeu-se a dificuldade de ajustar estes pontos. Uma maior quantidade de dados para o

treinamento possibilitaria um melhor ajuste. Com relação ao ajuste para a concentração celular e consumo de substrato as RNAs apresentaram boa performance.

A modelagem híbrida apresentou a melhor performance neste trabalho, mostrando a melhor capacidade de predição quando se utiliza uma combinação de duas técnicas distintas de modelagem, aproveitando as principais vantagens de cada uma. As principais conclusões obtidas com a modelagem híbrida foram:

- Na parte empírica, a configuração com 8 neurônios na camada intermediária reproduziu os melhores resultados. A combinação das entradas tempo de fermentação, concentração inicial de ART, concentração inicial de melaço, concentração inicial de AMM e pH foi definida como sendo as entradas para a rede, por melhorar sua performance.
- Na parte fenomenológica, o modelo cinético 4 apresentou os melhores resultados e foi selecionado como o modelo representativo do processo.
- O ajuste obtido para células no modelo híbrido não foi plenamente adequado, devido às limitações dos dados experimentais. No entanto, o ajuste para substrato e produto foi satisfatório, tanto para os experimentos usados na etapa de treinamento quanto na etapa de validação do modelo.
- A modificação proposta na equação de balanço para produto apresentou uma boa performance, pois o parâmetro λ do novo termo passou a ser dependente das entradas da rede neural. Assim o termo deixou de ser dependente exclusivamente do tempo de fermentação.

VII.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O desenvolvimento desta dissertação, além de propiciar um incremento no conhecimento da modelagem de bioprocessos, abriu caminho para uma série de trabalhos que possam ser realizados no futuro. A seguir serão apresentadas algumas sugestões para trabalhos futuros:

- A determinação experimental do comportamento cinético da produção e consumo de etanol, acetato e glicerol. Além disso, é necessário identificar as causas da desnaturação sofrida pela inulinase em determinadas condições experimentais.
- Usar os novos dados para estimar os parâmetros do modelo fenomenológico e propor uma alteração na equação de balanço.
- Desenvolver estratégias de controle de processos, a partir do modelo matemático.
- Desenvolver a otimização dinâmica da produção de inulinase em biorreator batelada alimentada, visando uma melhora na produção da enzima.

CAPÍTULO VIII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMRANE, A.; PRIGENT, Y., **Analysis of growth and production coupling for batch cultures of *Lactobacillus helveticus* with the help of an unstructured model.** Process Biochemistry, v. 34, p. 1-10, 1999.
- BANGA, J. R.; BALSACANTO, E.; MOLES, C. G.; ALONSO, A. A., **Dynamic optimization of bioprocess: efficient and robust numerical strategies.** Journal of Biotechnology, v. 117, p. 407-419, 2005.
- BANGA, J. R.; ALONSO, A. A., SINGH, R. P., **Stochastic dynamic optimization of batch and semicontinuous bioprocesses.** Biotechnology Progress, v. 13, p. 326-335, 1997.
- BAS, D.; DUDAK, F. C.; BOYACI, I. H., **Modeling and optimization IV: investigation of reaction kinetics and kinetic constants using a program in which artificial neural network (ANN) was integrated.** Journal of Food Engineering, v. 79, p. 1152 – 1158, 2007a.
- BAS, D.; DUDAK, F. C.; BOYACI, I. H., **Modeling and optimization III: reaction rate estimation using artificial neural network (ANN) without a kinetic model.** Journal of Food Engineering, v. 79, p. 622-628, 2007b.
- BIEGLER, L. T.; GROSSMANN, I. E., **Retrospective on optimization.** Computers and Chemical Engineering, v. 28, p. 1169-1192, 2004a.
- BIEGLER, L. T.; GROSSMANN, I. E., **Future perspective on optimization.** Computers and Chemical Engineering, v. 28, p. 1193 – 1218, 2004b.
- BIROL, G.; DORUKER, P.; KIRDAR, B.; ÖNSAN, I.; ÜLGEN, K., **Mathematical description of ethanol fermentation by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*.** Process Biochemistry, v. 33, n. 7, p. 763 – 771, 1998.
- BURHAN, N.; SAPUNDZHIEV, T.; BESCHKOV, V., **Mathematical modeling of cyclodextrin-glucanotransferase production by batch cultivation.** Biochemical Engineering Journal, v. 24, p. 73 – 77, 2005.

- CHUNG, T. P.; WU, C. Y.; JUANG, R. S., **Improved dynamic analysis on cell growth with substrate inhibition using two-phase models.** Biochemical Engineering Journal, v. 25, p. 209-217, 2005.
- COSTA, A. C.; HENRIQUES, A. S. W.; ALVES, T. L. M.; MACIEL FILHO, R.; LIMA, E. L., **A hybrid neural model for the optimization of fed-batch fermentations.** Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 16 n. 1, p. 53-63, 1999.
- DESAI, K. M.; VAIDYA, B. K.; SINGHAL, R. S.; BHAGWAT, S. S., **Use of an artificial neural network in modeling yeast biomass and yield of β -glucan.** Process Biochemistry, v. 40, p. 1617-1626, 2005.
- DEUFLHARD, E.; HAIRER, E.; ZUGCK, J., **One step and extrapolation methods for differential-algebraic systems.** Numerical Mathematics, v. 51, p. 501-516, 1987.
- EFTAXIAS, A.; FONT, J.; FORTUNY, A.; FABREGAT, A.; STÜBER, F., **Nonlinear kinetic parameter estimation using simulated annealing.** Computers and Chemical Engineering, v. 26, p. 1725-1733, 2002.
- ETTALIBI, M.; BARATTI, J. C., **Sucrose hydrolysis by thermostable immobilized inulinases from *Aspergillus ficuum*.** Enzyme and Microbial Technology, v. 28, n. 7, p. 596-601, 2001.
- FABER, R.; JOCKENHOVEL, T.; TSATSARONIS, G., **Dynamic optimization with simulated annealing.** Computers and Chemical Engineering, v. 29, p. 273-290, 2005.
- GARCIA, R., **Combustíveis e combustão industrial.** Editora Interciência, Rio de Janeiro, 2002.
- GENOVESE, K.; LAMBERTI, L.; PAPPALETTERE, C., **Improved global-local simulated annealing formulation for solving non-smooth engineering optimization problems.** International Journal of Solids and Structures, v. 42, p. 203-237, 2005.

- GILL, P. K.; SHARMA, A. D.; HARCHAND, R. K.; SINGH, P., **Effect of media supplements and culture conditions on inulinase production by an actinomycete strain.** Bioresource Technology, v. 87, n. 3, p. 359-362, 2003.
- GOKULAKRISHNAN, S.; GUMMADI, S. N., **Kinetics of cell growth and caffeine utilization by *Pseudomonas* sp. GSC 1182.** Process Biochemistry, v. 41, p. 1417-1421, 2006.
- GONZÁLES, T. A., **Estudo fenomenológico do reator batelada alimentada utilizando dois processos fermentativos distintos.** Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2004.
- HAAG, J. E.; WOUWER, A. V.; BOGAERTS, P., **Dynamic modeling of complex biological systems: a link between metabolic and macroscopic description.** Mathematical Biosciences, v. 193, n. 1, p. 25-49, 2005a.
- HAAG, J. E.; VANDE WOUWER, E. A.; REMY, E. M., **A general model of reaction kinetics in biological systems.** Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 27, p. 303-309, 2005b.
- HAAG, J. E.; VANDE WOUWER, E. A.; QUEINNEC, I., **Macroscopic modeling and identification of an anaerobic waste treatment process.** Chemical Engineering Science, v. 58, p. 4307-4316, 2003.
- HENSING, M. C. M.; VROUWENVELDER, S.; HELLINGA, C.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T., **Use of chemostat data for modeling extracellular-inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* in a high-cell-density fed-batch process.** Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 79, n. 1, p. 54-58, 1995.
- IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** Disponível em www.ibge.gov.br.
- JING, W.; ZHENGYU, J.; BO, J.; AUGUSTINE, A., **Production and separation of exo- and endoinulinase from *Aspergillus ficuum*.** Process Biochemistry, v. 39, n. 1, p. 5-11, 2003.

- KALIL, S. J.; SUZAN, R.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I., **Optimization of inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* using factorial design.** Applied Biochemical and Biotechnology, v. 94, n. 3, p. 257-264, 2001.
- KIRKPATRICK, S.; GELLAT, C. D. JR.; VECCHI, M. P., **Optimisation by simulated annealing.** Science, v. 220, p. 671 – 680, 1983.
- KOOKOS, I. O., **Optimization of batch and fed-batch bioreactors using simulated annealing.** Biotechnology Progress, v. 20, p. 1285-1288, 2004.
- LI, P.; LOWE, K.; ARELLANO-GARCIA, H.; WOZNY, G., **Integration of simulated annealing to a simulation tool for dynamic optimization of chemical process.** Chemical Engineering and Processing, v. 39, p. 357-363, 2000.
- LINKO, S.; LUOPA, J.; ZHU, Y. H., **Neural networks as 'software sensors' in enzyme production.** Journal of Biotechnology, v. 52, p. 257-266, 1997.
- MANDENIUS, C. F., **Recent developments in the monitoring, modeling and control of biological production systems.** Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 26, p. 347-351, 2004.
- MAZUTTI, M. A.; CENI, G.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M., **Production of inulinase by solid state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations.** Bioprocess and Biosystems Engineering, Aceito para publicação, 2006a.
- MAZUTTI, M. A.; BENDER, J. P.; DI LUCCIO, M. TREICHEL, H., **Optimization of inulinase production by solid state fermentation using sugar cane bagasse.** Enzyme and Microbial Technology, v. 39, n. 1, p. 56-59, 2006b.
- MENDES, G. L., **Produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em processo batelada alimentada a partir de meios industriais pré-tratados.** Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP, 2006.

- MOLES, C. G.; MENDES, P.; BANGA, J. R., **Parameter estimation in biochemical pathways: a comparison of global optimization methods.** Genome Research, v. 13, p. 2467-2474, 2003.
- POORNA, V.; KULKARNI, P. R., **A study of Inulinase Production in *Aspergillus niger* using Fractional Factorial Design.** Bioresource Technology, v. 54, p. 315-320, 1995.
- RIVERA, E. C.; COSTA, A. C.; ATALA, D. I. P.; MAUGERI, F.; MACIEL, M. R. W.; MACIEL FILHO, R., **Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: application to ethanol fermentation considering the effect of temperature.** Process Biochemistry, v. 41, p. 1682-1687, 2006.
- ROBERFROID, M. B., **Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose.** Journal of Nutrition, v. 128, p. 11-19, 1998.
- SALAS, E. F. M., **Identificação de processos dinâmicos não lineares: desenvolvimento de software e aplicação a uma coluna fracionadora de eteno.** Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- SANGEETHA, P. T.; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G., **Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides.** Trends in Food Science & Technology, v. 16, n. 10, p. 442-457, 2005.
- SANTISTEBAN-SILVA B. O. Y.; MAUGERI F., **Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*.** Enzyme and Microbial Technology, v. 36, n. 5-6, p. 17-724, 2005.
- SANTOS, A. M. P., **Síntese de Oligossacarídeos a partir da sacarose por Inulinase de *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus*.** Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

- SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; BORZANI, W., **Biotecnologia Industrial**, v. 2, ed. Edgard Blücher, São Paulo, 2001.
- SCHWAAB, M., **Avaliação de algoritmos heurísticos de otimização em problemas de estimação de parâmetros**. Tese (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- SELVAKUMAR, P.; PANDEY, A., **Solid state fermentation for the syntesis of inulinase from *Staphylococcus* sp. And *Kluyveromyces marxianus***. Process Biochemistry, v. 34, p. 851-858, 1999a.
- SELVAKUMAR, P.; PANDEY, A., **Comparative studies on inulinase synthesis by *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus* in submerged culture**. Bioresource Technology, v. 69, p. 123-127, 1999b.
- SHARMA, A. D.; KAINTH, S.; GILL, P. K., **Inulinase production using garlic (*Allium sativum*) powder as a potential substrate in *Streptomyces* sp.** Journal of Food Engineering, v. 77, n. 3, p. 486-491, 2006.
- SILVA, R. G.; CRUZ, A. J. G.; HOKKA, C. O.; GIORDANO, R. L. C.; GIORDANO, R. C., **A hybrid feed forward neural network model for the cephalosporin C production process**. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 17, n. 4-7, p. 587-598, 2000.
- SIMÕES, P, S. R. **Estudo sobre a viabilidade da simulação e predição de efeitos difusivos em reações de polimerização através de modelos determinísticos e redes neurais**. Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.
- SKOWRONEK, M.; FIEDUREK, J., **Inulinase biosynthesis using immobilized mycelium of *Aspergillus niger***. Enzyme and Microbial Technology, v. 3338, n. 1-2, p. 162-167, 2006.

- TEIXEIRA, A.; CUNHA, A. E.; CLEMENTE, J. J.; MOREIRA, J. L.; CRUZ, H. J.; ALVES, P. M.; CARRONDO, M. J. T.; OLIVEIRA, R., **Modeling and optimization of a recombinant BHK-21 cultivation process using hybrid grey-box systems.** Journal of Biotechnology, v. 118, p. 290-303, 2005.
- TREICHEL, H. **Estudo da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados, para viabilidade econômica da etapa de recuperação e purificação da enzima.** Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- UZUNOVA, K.; VASSILEVA, A.; IVANOVA, V.; SPASOVA, D.; TONKOVA, A., **Thermostable exo-inulinase production by semicontinuous cultivation of membrane-immobilized *Bacillus* sp. 11 cells.** Process Biochemistry, v. 37, n. 8, p. 863-868, 2002.
- VALDUGA, E., **Bioprodução de compostos voláteis e carotenóides por *Sporodiobolus salmonicolor* CBS 2636.** Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- VELIZAROV, S.; BESCHKOV, V., **Biotransformation of glucose to free gluconic acid by *Gluconobacter oxydans*: substrate and product inhibition situations.** Process Biochemistry, v. 33, n. 5, p. 527-534, 1998.
- VOLESKI B.; VOTRUBA, J., **Modeling and optimization of fermentation processes.** Elsevier, 2001.
- WANG, X.; XU, P.; YUAN, Y.; LIU, C.; ZHANG, D.; YANG, Z.; YANG, C.; MA, C., **Modeling for gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC31461 in a simplified medium.** Applied and Environmental Microbiology, v. 72, n. 5, p. 3367-3374, 2006.
- WIECHERT, W., **Modeling and Simulation: tools for metabolic engineering.** Journal of Biotechnology, v. 94, p. 37-63, 2002.

YE, K.; JIN, S.; SHIMIZU, K., Journal of fermentation and Biotechnology, v. 77, p. 663-673, 1994.

ZELIC, B.; VASIC-RACKI, D.; WANDREY, C.; TAKORS, R., **Modeling of the piruvate production with *Escherichia coli* in a fed-batch bioreactor.** Bioprocess and Biosystem Engineering, v. 26, p. 249-258, 2004.

ZORZETTO, L. F. M.; MACIEL FILHO, R.; WOLF-MACIEL, M. R., **Process modeling development through artificial neural networks.** Computers and Chemical Engineering, v. 24, p. 1355-1360, 2000.

CAPÍTULO IX

ANEXO I: DADOS EXPERIMENTAIS

DADOS EXPERIMENTAIS DA PRODUÇÃO DE INULINASE EM BIORREATOR BATELADA

Os dados experimentais utilizados durante a realização da modelagem matemática foram obtidos a partir de TREICHEL (2004), onde foi aplicada a metodologia de planejamentos de experimentos para otimizar a concentração de melão e AMM na produção de inulinase em biorreator batelada. Todas as fermentações foram realizadas a 36°C, aeração de 1,5 vvm e agitação de 300 rpm empregando a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. Os dados experimentais foram obtidos em intervalos regulares de 12h, num período entre 0h – 72h de fermentação e dizem respeito à: concentração de células (X), concentração de açúcar redutor total (ART), atividade da inulinase (P) e pH do meio fermentativo. A seguir serão apresentadas as Tabelas com os resultados experimentais das 9 fermentações usadas neste trabalho de modelagem.

Tabela IX.1: Dados experimentais da produção de inulinase com ART inicial = 60 g.L⁻¹, AMM = 69 g.L⁻¹, Melão = 200 g.L⁻¹

Tempo (h)	pH	X (g.L ⁻¹)	ART (g.L ⁻¹)	P (U.mL ⁻¹)
0,0	5,0	6,8	60,0	0,0
12,0	5,5	14,1	13,0	265,0
24,0	5,7	12,3	7,4	308,0
36,0	6,2	19,3	3,2	499,0
48,0	6,9	20,2	2,2	587,0
60,0	5,9	19,0	1,1	699,0
72,0	6,3	19,5	1,0	612,0

Tabela IX.2: Dados experimentais da produção de inulinase com ART inicial = 70 g.L⁻¹, AMM = 50 g.L⁻¹, Melão = 250 g.L⁻¹

Tempo (h)	pH	X (g.L ⁻¹)	ART (g.L ⁻¹)	P (U.mL ⁻¹)
0,0	4,9	7,2	70,3	0,0
12,0	5,2	14,2	10,3	238,0
24,0	6,3	18,3	8,8	598,0
36,0	6,5	19,2	2,1	624,0
48,0	6,9	19,2	1,9	684,0
60,0	7,1	18,1	1,0	523,0
72,0	7,2	18,5	0,0	389,0

Tabela IX.3: Dados experimentais da produção de inulinase com ART inicial = 80 g.L⁻¹, AMM = 69 g.L⁻¹, Melaço = 300 g.L⁻¹

Tempo (h)	pH	X (g.L ⁻¹)	ART (g.L ⁻¹)	P (U.mL ⁻¹)
0,0	5,0	7,0	80,1	0,0
12,0	5,2	13,2	15,2	298,0
24,0	6,1	22,4	14,2	451,0
36,0	7,2	23,6	8,1	654,0
48,0	7,2	15,2	3,1	721,0
60,0	6,9	14,3	1,1	792,0
72,0	7,1	13,1	1,2	830,0

Tabela IX.4: Dados experimentais da produção de inulinase com ART inicial = 85 g.L⁻¹, AMM = 80 g.L⁻¹, Melaço = 180 g.L⁻¹

Tempo (h)	pH	X (g.L ⁻¹)	ART (g.L ⁻¹)	P (U.mL ⁻¹)
0,0	5,1	7,2	85,3	0,0
12,0	5,8	13,1	15,2	249,0
24,0	6,2	19,6	8,8	488,0
36,0	6,9	22,1	2,3	658,0
48,0	7,1	20,2	2,1	720,0
60,0	6,9	18,3	1,0	602,0
72,0	7,2	18,5	0,0	480,0

Tabela IX.5: Dados experimentais da produção de inulinase com ART inicial = 90 g.L⁻¹, AMM = 101 g.L⁻¹, Melaço = 200 g.L⁻¹

Tempo (h)	pH	X (g.L ⁻¹)	ART (g.L ⁻¹)	P (U.mL ⁻¹)
0,0	5,0	6,8	89,9	0,0
12,0	6,3	12,3	10,2	221,0
24,0	6,2	20,3	8,8	338,0
36,0	7,3	21,1	3,9	499,0
48,0	6,9	19,2	3,2	601,0
60,0	6,4	18,3	1,0	680,0
72,0	7,2	19,5	0,0	512,0

Tabela IX.6: Dados experimentais da produção de inulinase com ART inicial = 100 g.L⁻¹, AMM = 80 g.L⁻¹, Melaço = 250 g.L⁻¹

Tempo (h)	pH	X (g.L ⁻¹)	ART (g.L ⁻¹)	P (U.mL ⁻¹)
0,0	5,0	7,1	99,6	0,0
12,0	6,3	15,2	10,1	205,0
24,0	6,2	25,9	9,4	541,0
36,0	7,0	23,7	4,2	681,0
48,0	7,1	20,5	3,3	731,0
60,0	7,0	18,7	1,1	894,0
72,0	7,1	18,7	1,1	1337,0

Tabela IX.7: Dados experimentais da produção de inulinase com ART inicial = 110 g.L⁻¹, AMM = 101 g.L⁻¹, Melaço = 300 g.L⁻¹

Tempo (h)	pH	X (g.L ⁻¹)	ART (g.L ⁻¹)	P (U.mL ⁻¹)
0,0	5,0	7,0	110,0	0,0
12,0	5,5	12,1	21,4	212,0
24,0	5,8	24,3	10,2	385,0
36,0	5,9	24,1	3,4	512,0
48,0	6,2	18,2	2,8	654,0
60,0	5,8	19,2	1,9	700,0
72,0	6,1	19,4	1,5	712,0

Tabela IX.8: Dados experimentais da produção de inulinase com ART inicial = 120 g.L⁻¹, AMM = 110 g.L⁻¹, Melaço = 250 g.L⁻¹

Tempo (h)	pH	X (g.L ⁻¹)	ART (g.L ⁻¹)	P (U.mL ⁻¹)
0,0	5,1	6,9	120,0	0,0
12,0	5,5	12,9	25,4	245,0
24,0	5,9	19,1	19,2	401,0
36,0	6,1	21,1	10,2	500,0
48,0	6,2	19,2	5,2	529,0
60,0	6,3	18,3	3,1	602,0
72,0	7,2	18,5	1,2	400,0

Tabela IX.9: Dados experimentais da produção de inulinase com ART inicial = 130 g.L⁻¹, AMM = 80 g.L⁻¹, Melação = 320 g.L⁻¹

Tempo (h)	pH	X (g.L ⁻¹)	ART (g.L ⁻¹)	P (U.mL ⁻¹)
0,0	5,0	7,1	130,0	0,0
12,0	5,6	11,2	31,2	299,0
24,0	6,2	18,1	21,3	426,0
36,0	6,1	20,3	10,2	601,0
48,0	6,9	21,2	4,5	699,0
60,0	5,9	19,2	3,1	585,0
72,0	6,1	18,5	2,2	501,0

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)