Álvaro José Boareto Mendes

Modelagem matemática híbrida cibernética / neuronal do processo contínuo de produção de etanol por *Zymomonas mobilis*.

Tese submetida ao corpo docente da Escola de Química / Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciência em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadores: Prof. Maurício Bezerra de Souza Júnior, D. Sc.
Profa. Belkis Valdman, Ph.D.

Rio de Janeiro - RJ
2012

B662m Boareto, Álvaro José B. Mendes

Modelagem matemática híbrida cibernética neuronal do processo contínuo de produção de etanol por *Zymomonas mobilis*. / Álvaro José Boareto Mendes. – 2012.

xxxiv, 251 f.: il.

Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2012.

Orientador: Maurício Bezerra de Souza Júnior, Belkis Valdman.

1. Engenharia Química. 2. Produção de etanol. 3. Processo contínuo. 4. Fermentação alcoólica. 5. Bioetanol. 6. Modelo Matemático. 7. Modelo Fenomenológico. 8. Modelo Empírico. 9. Rede Neuronal Artificial. 10. Modelo Híbrido. 11. Processos subsimbólicos. 13. Inteligência Artificial. 14. Modelo cibernético. I. Souza Júnior, Maurício Bezerra de (orient.). II. Valdman, Belkis (orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. IV. Título.

CDD: 665.776

Álvaro José Boareto Mendes

Modelagem matemática híbrida cibernética / neuronal do processo contínuo de produção de etanol por *Zymomonas mobilis*.

Rio de Janeiro, 29 de outubro de 2012.

Tese submetida ao corpo docente da Escola de Química / Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciência em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada por:

_____

Prof. Maurício Bezerra de Souza Júnior, D. Sc., Escola de Química / UFRJ

_____

Profa. Vivianni Marques Leite dos Santos, D. Sc. / UNIVASF

_____

Prof. Anderson Wilson da Silva Henriques, D. Sc. / IFRJ

_____

Profa. Ninoska Isabel Bojorge-Ramirez, D. Sc. / UFF

_____

Profa. Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc., Escola de Química / UFRJ

_____

Profa. Rossana Odette Mattos Folly, D. Sc., Escola de Química / UFRJ

Ao Criador pela benção concedida.

A minha família Cristina, Álvaro, Fernanda,
Mendes, Rosa, Aldo, Claudia e Carla pelo amor,
apoio e por compreenderem a ausência constante
durante a dedicação a este trabalho.

A memória da Profa. Belkis Valdman, com carinho.
Orientadora e amiga desde o mestrado, apesar da
ausência física, será sempre lembrada.

AGRADECIMENTOS

No momento do encerramento de um trabalho vem-nos a lembrança agradecer àqueles que contribuíram para a sua conclusão. Portanto deixo registrado meu tributo de gratidão.

Aos meus orientadores Profa. Belkis Valdman e Prof. Maurício pela orientação, amizade e compreensão.

A Profa. Heizir de Castro, professora e amiga. Grande incentivadora desde o início do mestrado.

Aos amigos Júlio César, Euza e a sobrinha Priscila, por compartilharem a alegria, mesmo nos momentos turbulentos.

A Anna Carolina R. Camêlo pela amizade e auxílio em ceder o material de sua tese para o prosseguimento deste trabalho.

Ao Douglas do INPI pela ajuda com o programa de treinamento de redes neuronais, pela cordialidade e atenção.

Aos amigos e Profs. Priamo Melo, Márcio Nele e Domingos Fabiano, Andréa Salgado e Eliana Alhadeff pela amizade, convivência e apoio irrestrito nos momentos importantes.

Aos chefes do Instituto Militar de Engenharia, TC Gabriel e TC Cano, pelo apoio e amizade.

Aos meus amigos Fernanda Taborda, Anderson Pereira, Renato Tonelli, Dayner David e Quintiliano pela amizade, incentivo e auxílio constante, sem o que não seria possível concluir o trabalho.

A Profa. Mônica Damaso pela ajuda e amizade.

Ao Cap Sandro do IME e Prof. Carlos André da EQ pela ajuda com o Matlab.

Ao Maj Tanos e Evandro e Ten Rezende pelo incentivo.

Aos companheiros do IME Paulo, Luiz Valente, Avanilson, Getúlio, Correia, Osmaura e Elisabete pelo convívio harmonioso.

A secretária da pós-graduação Roselee e Marlene pela amizade e atenção constantes, em nome das quais agradeço aos demais integrantes da secretaria da pós-graduação.

"O pesquisador deve duvidar, fugir das idéias fixas e conservar sempre a sua liberdade de espírito".

Claude Bernard (1813 - 1878)

Fisiologista francês

"...em lugar desse grande número de preceitos de que se compõe a lógica, achei que me seriam suficientes os quatro seguintes, ...

O primeiro era o de nunca aceitar algo como verdadeiro que eu não conhecesse claramente como tal, ou seja, de evitar cuidadosamente a pressa e a prevenção, e de nada fazer constar de meus juízos que não se apresentasse tão clara e distintamente a meu espírito que eu não tivesse motivo algum de duvidar dele..."

Discurso do Método

René Descartes (1596 - 1650)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 1
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS 1
1.1 INTRODUÇÃO 1
1.2 OBJETIVOS 2
1.2.1 Objetivo geral 2
1.2.2 Objetivos específicos 2
1.3 JUSTIFICATIVA 3
1.4 ORGANIZAÇÃO DO TEXTO 4
CAPÍTULO 2 6
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 6
2.1 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA 6
2.1.1 Aspectos gerais 6
2.1.2 Matéria-prima: substrato 13
2.1.4 Micro-organismos: matérias-primas e processos 14
2.1.4.1 Leveduras 16
2.1.4.2 Bactérias *Zymomonas mobilis* 18
2.1.4.2.1 Aspectos gerais 18
2.1.4.2.2 Metabolismo: rota de Entner-Doudoroff 21
2.1.4.2.3 Comportamento oscilatório em *Zymomonas mobilis* 23
2.2 MODELAGEM MATEMÁTICA DE BIOPROCESSOS 24
2.2.1 Fundamentos básicos e classificação 25
2.2.1.1 Fundamentos básicos 25
2.2.1.2 Classificação de modelos 27
2.2.2 Modelos mecanicistas e redes neuronais artificiais 31
2.2.2.1 Modelos mecanicistas 32
2.2.2.2 Redes neuronais artificiais: inteligência artificial 35
2.2.2.2.1 Fundamentos dos modelos neuronais 39
2.2.2.2.2 Tipos de redes neuronais artificiais 42
2.2.3 Modelos cibernéticos e modelos híbridos 43
2.2.3.1 Modelos cibernéticos 44
2.2.3.2 Modelos híbridos 51
CAPÍTULO 3 57
DADOS EXPERIMENTAIS E METODOLOGIA 57

3.1 PROGRAMAS COMPUTACIONAIS 57
3.1.1 Programa para treinamento das redes neuronais artificiais 57
3.1.2 Programa para implementação do modelo híbrido cibernético/neuronal 57
3.2 DADOS EXPERIMENTAIS 57
3.2.1 Processo de produção de bioetanol 58
3.2.1.1 Características gerais 58
3.2.1.2 Operação do processo em modo contínuo 59
3.2.1.3 Obtenção dos dados experimentais 61
3.3 METODOLOGIA PARA INTERPOLAÇÃO DE DADOS 67
3.4 PROPOSTA DO MODELO CIBERNÉTICO 68
3.5 TREINAMENTO DAS REDES NEURONAIS 69
3.5.1 Estrutura das RNA 69
3.5.2 Programa de treinamento das redes 71
3.6 PROPOSTA DO MODELO HÍBRIDO CIBERNÉTICO/NEURONAL (MHCN) 74
3.7 MODELO FENOMENOLÓGICO 75
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS RESPOSTAS DO MHCN 75
CAPÍTULO 4 77
MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO 77
4.1 CONCEPÇÃO DO MODELO CIBERNÉTICO 77
4.1.1 Estudo das enzimas e rotas bioquímicas 78
4.1.2 Estequiometria 85
4.1.3 Rendimento e fator de conversão 85
4.1.4 Comparação com o rendimento teórico para levedura 90
4.1.5 Proposta do modelo cibernético 91
4.1.5.1 Definição das equações do modelo cibernético 91
4.1.5.2 Condições iniciais e operacionais do processo 95
4.1.5.3 Parâmetros do modelo cibernético 98
4.2 CONCEPÇÃO DO MODELO HÍBRIDO CIBERNÉTICO / NEURONAL 102
4.2.1 Definição das variáveis de entrada e de saída da RNA 102
4.2.1.1 Variáveis de entrada 102
4.2.1.2 Variáveis de saída 102
4.2.1.2.1 Variável Z1 - fermentação alcoólica: 103
4.2.1.2.2 Variável Z2 - Crescimento celular: 103
4.2.1.2.3 Variável Z3 - fermentação lática: 103
CAPÍTULO 5 107

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES 107
5.1 RESULTADOS DA INTERPOLAÇÃO DE DADOS 107
5.2 REDES NEURONAIS ARTIFICIAIS 110
5.2.1 Análise do desempenho das RNA 112
5.2.1.1 Seleção da RNA autônoma 112
5.2.1.1.1 Características e desempenho 112
5.2.1.1.2 Dados preditos pelas RNA versus observados 115
5.2.1.1.3 Comparação dos dados experimentais com os dados preditos pela RNA 117
5.2.1.2 Seleção da RNA para integrar o modelo híbrido cibernético/neuronal 120
5.2.1.2.1 Características e desempenho 120
5.2.1.2.2 Dados preditos pelas RNA *versus* observados 123
5.2.1.2.3 Comparação dos dados experimentais com os dados preditos pela RNA 126
5.3 MODELO HÍBRIDO CIBERNÉTICO/NEURONAL (MHCN) 128
5.3.1 MHCN alimentado com variáveis experimentais (EExp XExp e GExp) - Teste 1 129
5.3.1.1 Análise estatística das simulações (FC01 – FC11) 129
5.3.1.2 Fermentação contínua 01 (FC01) 131
5.3.1.3 Fermentação contínua 02 (FC02) 133
5.3.1.4 Fermentação contínua 04 (FC04) 134
5.3.1.5 Fermentação contínua 05 (FC05) 135
5.3.1.6 Fermentação contínua 06 (FC06) 136
5.3.1.7 Considerações gerais 138
5.3.2 MHCN alimentado com variáveis experimentais (EExp XExp e GExp) - Teste 1 com correção do erro de predição 139
5.3.2.1 Análise estatística das simulações (FC01 – FC11) 140
5.3.2.2 Fermentação contínua 01 (FC01) 142
5.3.2.3 Fermentação contínua 05 (FC05) 143
5.3.2.4 Fermentação contínua 11 (FC11) 144
5.3.2.5 Considerações gerais 145
5.4 COMPARAÇÃO DO MHCN COM A RNA AUTÔNOMA E COM O MODELO FENOMENOLÓGICO 146
5.4.1 Análise estatística das comparações entre os modelos 147
5.4.2 Fermentação contínua 01 (FC01) 149
5.4.3 Fermentação contínua 02 (FC02) 150
5.4.4 Fermentação contínua 03 (FC03) 151
5.4.5 Fermentação contínua 04 (FC04) 152
5.4.6 Fermentação contínua 05 (FC05) 153

5.4.7 Fermentação contínua 06 (FC06) 154

5.5 MHCN PARA INFERÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE LACTATO - Teste 1 com correção do erro de predição 156

CAPÍTULO 6 161

6 INVESTIGAÇÃO DO DESEMPENHO DO MHCN 161

6.1 MHCN NO CASO DE AUSÊNCIA DE MEDIÇÕES 161

6.1.1 MHCN realimentado no caso de ausência parcial de medições 162

6.1.1.1 MHCN alimentado com variáveis experimentais (EExp e XExp) e híbrida (GHyb) – Teste 2 163

6.1.1.1.1 Análise estatística das simulações (FC05 – FC07) 163

6.1.1.1.2 Fermentação contínua 05 (FC05) 164

6.1.1.1.3 Fermentação contínua 06 (FC06) 165

6.1.1.1.4 Fermentação contínua 07 (FC07) 165

6.1.1.2 MHCN alimentado com variáveis experimentais (EExp e GExp) e híbrida (XHyb) - Teste 3 166

6.1.1.2.1 Análise estatística das simulações (FC05 – FC07) 167

6.1.1.2.2 Fermentação contínua 05 (FC05) 168

6.1.1.2.3 Fermentação contínua 06 (FC06) 168

6.1.1.2.4 Fermentação contínua 07 (FC07) 169

6.1.1.3 MHCN alimentado com variáveis experimentais (XExp e GExp) e híbrida (EHyb) - Teste 4 170

6.1.1.3.1 Análise estatística das simulações (FC05 – FC07) 170

6.1.1.3.2 Fermentação contínua 05 (FC05) 171

6.1.1.3.3 Fermentação contínua 06 (FC06) 172

6.6.1.3.4 Fermentação contínua 07 (FC07) 173

6.1.1.4 MHCN alimentado com variáveis experimentais (EExp) e híbridas (XHyb e GHyb) - Teste 5 174

6.6.1.4.1 Análise estatística das simulações (FC05 – FC07) 175

6.6.1.4.2 Fermentação contínua 05 (FC05) 176

6.1.1.4.3 Fermentação contínua 06 (FC06) 176

6.1.1.4.4 Fermentação contínua 07 (FC07) 177

6.1.1.5 MHCN alimentado com variáveis experimentais (XExp) e híbridas (EHyb e GHyb) - Teste 6 178

6.1.1.5.1 Análise estatística das simulações (FC05 – FC07) 179

6.1.1.5.2 Fermentação contínua 05 (FC05) 180

6.1.1.5.3 Fermentação contínua 06 (FC06) 181

6.1.1.5.4 Fermentação contínua 07 (FC07) 181

6.1.1.6 MHCN realimentado com variáveis experimentais (GExp) e híbridas (EHyb e XHyb) - Teste 7 182

6.1.1.6.1 Análise estatística das simulações (FC05 – FC07) 183

6.1.1.6.2 Fermentação contínua 05 (FC05) 184

6.6.1.6.3 Fermentação contínua 06 (FC06) 184

6.6.1.6.4 Fermentação contínua 07 (FC07) 185

6.1.2 MHCN alimentado no caso de ausência completa de medições 186

6.1.2.1 MHCN alimentado com variáveis híbridas (EHyb, XHyb e GHyb) - Teste 8 186

6.1.2.1.1 Análise estatística das simulações (FC05 – FC07) 187

6.6.2.1.2 Fermentação contínua 05 (FC05) 188

6.1.2.1.3 Fermentação contínua 06 (FC06) 189

6.1.2.1.4 Fermentação contínua 07 (FC07) 189

6.1.3 Comparação dos testes de alimentação do MHCN para cada variável de estado 190

6.1.3.1 Comparação dos testes de alimentação do MHCN para cada variável de estado para toda a sequência de dados de cada fermentação 191

6.1.3.2 Comparação dos testes de realimentação do MHCN para cada variável de estado até o ponto nº 20 da sequência de dados de cada fermentação 193

6.1.3.3 Comparação dos testes de realimentação do MHCN para cada variável de estado até o ponto nº 10 da sequência de dados de cada fermentação 194

6.1.3.4 Comparação da capacidade preditiva do MHCN para cada FC nos teste de substituição das variáveis medidas (experimentais) pelas variáveis simuladas na alimentação da RNA MLP.51 do MHCN 196

CAPÍTULO 7 198

CONCLUSÕES, CONTRIBUIÇÕES E SUGESTÕES 198

7.1 CONCLUSÕES 198

7.2 CONTRIBUIÇÃO DO TRABALHO 200

7.3 SUGESTÕES 201

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 202

APÊNDICE A 216

MODELO FENOMENOLÓGICO – DAUGULIS et al. (1997) / CAMÊLO (2009) 216

A.1 MODELO FENOMENOLÓGICO 216

A.1.1 Equações do modelo fenomenológico 216

A.1.2 Parâmetros do modelo fenomenológico 221

APÊNDICE B 223

MODELO CIBERNÉTICO - Jones e Kompala (1999) 223

B.1 MODELO CIBERNÉTICO 223

B.1.1 Equações do modelo cibernético 223

B.1.2 Condições de processo: modelo cibernértico 227
B.1.3 Parâmetros do modelo cibernértico 228
APÊNDICE C 233
DADOS EXPERIMENTAIS DE CAMÊLO (2009) 233
APÊNDICE D 238
MODELO HÍBRIDO CIBERNÉTICO/NEURONAL (MHCN) – TESTE 1 238
D.1 MHCN alimentado com variáveis experimentais (EExp XExp e GExp) - Teste 1 238
D.1.1 Fermentação contínua 03 (FC03) 238
D.1.2 Fermentação contínua 07 (FC07) 239
D.1.3 Fermentação contínua 10 (FC10) 241
D.1.4 Fermentação contínua 11 (FC11) 242
D.2 MHCN alimentado com variáveis experimentais (EExp XExp e GExp) - Teste 1 com correção do erro de predição 243
D.2.1 Fermentação contínua 02 (FC02) 243
D.2.2 Fermentação contínua 03 (FC03) 244
D.2.3 Fermentação contínua 04 (FC04) 245
D.2.4 Fermentação contínua 06 (FC06) 246
D.2.5 Fermentação contínua 07 (FC07) 247
D.2.6 Fermentação contínua 10 (FC10) 248

RESUMO

BOARETO, Álvaro José Mendes. Modelagem matemática híbrida cibernética / neuronal do processo contínuo de produção de etanol por *Zymomonas mobilis*. Rio de Janeiro, 2012. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

O desenvolvimento de processos para a obtenção de energia a partir de fontes sustentáveis é recorrente. Fatores como a eminente extinção dos combustíveis fósseis e potencial de geração de poluentes ocasiona um grande número de trabalhos na literatura científica. Face à premente necessidade de inovação da matriz energética, a produção de bioetanol como uma alternativa às fontes de energia oriundas de combustíveis fósseis tem sido um assunto de grande interesse desde a crise petrolífera nos anos 1970. Nestes termos, o Brasil destaca-se mundialmente como detentor do maior conhecimento tecnológico para produção de etanol por processo fermentativo, tendo uma indústria sucroalcooleira autossustentável em uso de energia e em termos ecológicos. Atualmente, a síntese de etanol é convencionalmente realizada por linhagens de *Saccharomyces*, porém o gênero bacteriano *Zymomonas* tem uma especial habilidade para essa produção. Desta forma, a otimização da produção de bioetanol empregando *Zymomonas* surge como uma alternativa atraente. Concomitantemente, o contínuo aumento da complexidade, eficiência e confiabilidade dos modernos sistemas industriais implicam em constante desenvolvimento no monitoramento e de estratégias de controle de processo. Neste contexto, a escolha dos modelos híbridos em relação aos modelos fenomenológicos, neuronais e cibernéticos empregados isoladamente têm motivado investigações. Em conformidade com os objetivos específicos deste trabalho, os dados experimentais obtidos por Camêlo (2009) em processo contínuo para produção de bioetanol empregando a bactéria *Zymomonas mobilis* Ag11 DAUFPE 198, foram selecionados. Camêlo (2009) realizou as fermentações contínuas para avaliar possíveis comportamentos dinâmicos complexos diante de diferentes condições operacionais. Um modelo híbrido cibernético neuronal (MHCN) foi proposto para esse processo. A capacidade de predição do modelo proposto foi comparada com uma rede neuronal autônoma e um modelo fenomenológico. A performance do MHCN sob situações de indisponibilidade de medidas de concentrações de etanol, célula e glicose foi investigada. O modelo MHCN foi eficiente para predizer o comportamento do processo para horizontes grandes, tal como 10 h. Diversos testes de realimentação para a RNA MLP (rede neuronal artificial *multilayer perceptron*) híbrida foi realizada. Os testes consideraram a realimentação da RNA MLP híbrida com variáveis calculadas pelo MHCN (concentrações de etanol, células e glicose), substituindo-as sucessivamente pelos correspondentes dados históricos. Os testes foram avaliados graficamente e por estatísticas apropriadas. A capacidade de predição do MHCN tornou-se mais eficiente à medida que as variáveis híbridas eram substituídas na realimentação pelos dados históricos. Nesta condição, o MHCN mostrou ser capaz para predizer o comportamento dinâmico exibido pelas nove fermentações contínuas de produção de etanol realizadas por Camêlo (2009). Além disso, o MHCN realimentado com dados históricos foi comparado com uma RNA autônoma (contendo nas saídas as concentrações de etanol, de células e de glicose, um passo à frente) e o modelo fenomenológico de Daugulis et al. (1997) implementado por Camêlo (2009). O MHCN apresentou similar capacidade de predição em relação a RNA autônoma e significativamente melhor quando comparado ao modelo fenomenológico.

ABSTRACT

BOARETO, Álvaro José Mendes. Modelagem matemática híbrida cibernética / neuronal do processo contínuo de produção de etanol por *Zymomonas mobilis*. Rio de Janeiro, 2012. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Processes development for sustainable energies is highlighted nowadays. The environmental pollution and the coming soon extinction of fossil fuels is currently in the scientific literature. Thus the bioethanol production has been a great energy way since the oil crisis in the 1970s. The Brazil stands out worldwide for it the largest know-how to produce ethanol by fermentation and it has an alcohol industry sustainable. The most usual Brazilian ethanol synthesis is performed by *Saccharomyces* and the bacterial genus *Zymomonas* has a important role in this production. So the optimization of the bioethanol production using *Zymomonas* shows up as an attractive alternative. Simultaneously, the continuous increase of modern industrial systems involves developing, monitoring and process control strategies. In this context, the choice of hybrid models for phenomenological models, neural and cybernetic employees have led to more investigations. According to the objectives of this study, the experimental data obtained by Camêlo (2009) in a continuous process to produce bioethanol using bacteria *Zymomonas mobilis* AG11 DAUFPE 198, were selected. Camêlo (2009) continuous fermentations conducted to assess possible dynamic behaviors of complex on different operating conditions. A hybrid model cyber neuronal (MHCN) was proposed for this process. The prediction ability of the proposed model was compared with a standalone neural network and a phenomenological model. The performance of MHCN under situations of unavailability of measures ethanol concentrations, cell and glucose was investigated. MHCN model was able to predict the process behavior for large time horizons, such as 10 h. Several tests feedback MLP for RNA hybrid was performed. The tests considered the feedback MLP RNA hybrid with variables calculated by MHCN (ethanol concentrations, cells and glucose), replacing them successively by the corresponding historical data. The tests were evaluated graphically and appropriate statistics. The ability to predict MHCN became more efficient as the variables were replaced in hybrid feedback by historical data. Thereby the MHCN proved able to predict the dynamic behavior exhibited by nine continuous fermentation of ethanol production performed by Camêlo (2009). Furthermore, the MHCN refuel with historical data was compared to standalone RNA (containing the outputs concentrations of ethanol, glucose and cells, one step ahead) and the phenomenological model of Daugulis et al. (1997) implemented by Camêlo (2009). The MHCN showed similar predictive ability respecting standalone RNA and significantly better than phenomenological model.

LISTA DE FIGURAS

		pág
Figura 2.1 -	Mapa da produção do setor sucroenergético no Brasil	8
Figura 2.2 -	Estatística da produção de etanol total (anidro + hidratado) no Brasil em mil metros cúbicos nas safras 1980/1981 – 2011/2012	11
Figura 2.3 -	Formação de etanol e CO_2 a partir de glicose pela rota metabólica de Embden-Meyerhoff-Parnass	17
Figura 2.4 -	*Zymomonas mobilis*. (a) Foto da cepa industrial CP4 em fermentação de etanol, tendo glicose como substrato e agitação realizada borbulhando CO_2. (b) Microscopia da bactéria *Z. mobilis* Ag11	20
Figura 2.5 -	Metabolismo de sacarose, glicose e frutose por *Zymomonas mobilis*	22
Figura 2.6 -	Formação de etanol a partir de glicose por *Zymomonas mobilis* em fermentação via Entner-Doudoroff	23
Figura 2.7 -	Etapas para modelagem matemática de processos fermentativos	27
Figura 2.8 -	Proposta de classificação dos modelos em grupos distintos conforme os conjuntos de ferramentas e técnicas matemáticas disponíveis na literatura	29
Figura 2.9 -	Correlação de características de sistemas de inteligência artificial	36
Figura 2.10 -	RNA de topologia multicamada, com conexões *feedforward* contendo três camadas	40
Figura 2.11 -	j-ésimo neurônio da camada k+1	41
Figura 2.12 -	Ilustração de uma rede especialista	53
Figura 3.1 -	Fermentação Contínua (FC01)	64
Figura 3.2 -	Fermentação Contínua (FC05)	64
Figura 3.3 -	Rendimentos $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ na etapa contínua da Fermentação FC05 em função do tempo na etapa contínua do processo	65
Figura 3.4 -	Rendimentos $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ na etapa contínua da Fermentação FC06 em função do tempo na etapa contínua do processo	66
Figura 3.5 -	Rendimentos $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ na etapa contínua da Fermentação FC07 em função do tempo na etapa contínua do processo	66
Figura 3.6 -	Esquema da estrutura das RNA pesquisadas	69
Figura 3.7 -	Esquema de funcionamento do treinamento com os subconjuntos de dados para treinamento e para teste	73
Figura 4.1 -	Metabolismo de sacarose, glicose e frutose em *Zymomonas mobilis*	80

Figura 4.2 -	Formação de etanol e CO_2 por *Saccharomyces cerevisae* a partir de glicose pela rota metabólica de Embden-Meyerhoff-Parnass	81
Figura 4.3 -	Formação de etanol a partir de glicose por *Zymomonas mobilis* em fermentação via Entner-Doudoroff	82
Figura 4.4 -	Principais rotas de carboidrato em *Zimomonas mobilis*	87
Figura 4.5 -	Esquema do catabolismo da glicose	88
Figura 5.1 -	Comparação dos valores da variável de saída concentração de etanol um passo a frente (E_{k+1}) ($g.L^{-1}.h^{-1}$). Valores preditos pela RNA autônoma MLP.8 para a concentração de etanol versus valores-alvo para concentração de etanol	115
Figura 5.2 -	Comparação dos valores da variável de saída concentração de glicose um passo a frente (G_{k+1}) ($g.L^{-1}.h^{-1}$). Valores preditos pela RNA autônoma MLP.8 para a concentração de glicose versus valores-alvo para concentração de glicose	116
Figura 5.3 -	Comparação dos valores da variável de saída concentração de células um passo a frente (X_{k+1}) ($g.L^{-1}.h^{-1}$). Valores preditos pela RNA autônoma MLP.8 para a concentração de células versus valores-alvo para concentração de células	117
Figura 5.4 -	Comparação dos valores da concentração de etanol (E_{k+1}) ($g\ L^{-1}$). Valores preditos pela RNA autônoma MLP.8 e valores observados versus sequência de dados históricos	118
Figura 5.5 -	Comparação dos valores da concentração de etanol (G_{k+1}) ($g\ L^{-1}$). Valores preditos pela RNA autônoma MLP.8 e valores observados versus sequência de dados históricos	119
Figura 5.6 -	Comparação dos valores da concentração de etanol (X_{k+1}) ($g\ L^{-1}$). Valores preditos pela RNA autônoma MLP.8 e valores observados versus sequência de dados históricos	119
Figura 5.7 -	Comparação dos valores da variável cibernética de saída referente à rota metabólica da fermentação alcoólica (Z_1) (h^{-1}). Valores preditos pela RNA MLP.51 (Z_1 RNA) versus valores calculados pelo modelo cibernético no Matlab	124
Figura 5.8 -	Comparação dos valores da variável cibernética de saída referente à rota metabólica de formação de células (Z_2) (h^{-1}). Valores preditos pela RNA MLP.51 (Z_2 RNA) versus valores calculados pelo modelo cibernético no Matlab	125
Figura 5.9 -	Comparação dos valores da variável cibernética de saída referente à rota metabólica da fermentação lática (Z_3) (h^{-1}). Valores preditos pela RNA MLP.51 (Z_3 RNA) versus valores calculados pelo modelo cibernético no Matlab	125
Figura 5.10 -	Comparação dos valores da variável cibernética de saída referente à rota metabólica da fermentação alcoólica (Z_1) (h^{-1}). Valores preditos pela RNA MLP.51 e valores calculados no Matlab	126
Figura 5.11 -	Comparação dos valores da variável cibernética de saída referente à rota metabólica de formação de células (Z_2) (h^{-1}). Valores preditos pela RNA MLP.51 e valores calculados no Matlab	127

Figura 5.12 -	Comparação dos valores da variável cibernética de saída referente à rota metabólica da fermentação lática (Z_3) (h^{-1}). Valores preditos pela RNA MLP.51 e valores calculados no Matlab	128
Figura 5.13 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC01 – Teste 1	132
Figura 5.14 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC02 – Teste 1	133
Figura 5.15 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC04 – Teste 1	134
Figura 5.16 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC05 – Teste 1	135
Figura 5.17 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC06 – Teste 1	137
Figura 5.18 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC01 – Teste 1 com correção do erro de predição	143
Figura 5.19 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC05 – Teste 1 com correção do erro de predição	144
Figura 5.20 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC11 – Teste 1 com correção do erro de predição	145
Figura 5.21 -	Comparação das respostas do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} - Teste 1 com correção do erro de predição, da RNA autônoma MLP.8 e do modelo fenomenológico com os dados experimentais para a FC01	150
Figura 5.22 -	Comparação das respostas do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} - Teste 1 com correção do erro de predição, da RNA autônoma MLP.8 e do modelo fenomenológico com os dados experimentais para a FC02	151
Figura 5.23 -	Comparação das respostas do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} - Teste 1 com correção do erro de predição, da RNA autônoma MLP.8 e do modelo fenomenológico com os dados experimentais para a FC03	152
Figura 5.24 -	Comparação das respostas do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} - Teste 1 com correção do erro de predição, da RNA autônoma MLP.8 e do modelo fenomenológico com os dados experimentais para a FC04	153
Figura 5.25 -	Comparação das respostas do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} - Teste 1 com correção do erro de predição, da RNA autônoma MLP.8 e do modelo fenomenológico com os dados experimentais para a FC05	154
Figura 5.26 -	Comparação das respostas do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} - Teste 1 com correção do erro de predição, da RNA autônoma MLP.8 e do modelo fenomenológico com os dados experimentais para a FC06	155
Figura 5.27	Concentração de lactato (L_{Hyb}) simulada pelo MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} *versus* sequência de dados – Teste 1 com correção do erro de predição para as FC01, 02 e 03	158

Figura 5.28	Curva da concentração de lactato (L_{Hyb}) simulada pelo MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} *versus* sequência de dados – Teste 1 com correção do erro de predição para as FC04, 10 e 11	159
Figura 5.29	Curva da concentração de lactato (L_{Hyb}) simulada pelo MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} *versus* sequência de dados – Teste 1 com correção do erro de predição para as FC05, 06 e 07	160
Figura 6.1 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Hyb} para a FC05 – Teste 2	164
Figura 6.2 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Hyb} para a FC06 – Teste 2	165
Figura 6.3 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Hyb} para a FC07 – Teste 2	166
Figura 6.4 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Hyb} e G_{Exp} para a FC05 – Teste 3	168
Figura 6.5 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Hyb} e G_{Exp} para a FC06 – Teste 3	169
Figura 6.6 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Hyb} e G_{Exp} para a FC07 – Teste 3	170
Figura 6.7 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC05 – Teste 4	172
Figura 6.8 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC06 – Teste 4	173
Figura 6.9 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC07 – Teste 4	174
Figura 6.10 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Hyb} e G_{Hyb} para a FC05 – Teste 5	176
Figura 6.11 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Hyb} e G_{Hyb} para a FC06 – Teste 5	177
Figura 6.12 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Hyb} e G_{Hyb} para a FC07 – Teste 5	178
Figura 6.13 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Exp} e G_{Hyb} para a FC05 – Teste 6	180
Figura 6.14 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Exp} e G_{Hyb} para a FC06 – Teste 6	181
Figura 6.15 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Exp} e G_{Hyb} para a FC07 – Teste 6	182
Figura 6.16 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Hyb} e G_{Exp} para a FC05 – Teste 7	184
Figura 6.17 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Hyb} e G_{Exp} para a FC06 – Teste 7	185
Figura 6.18 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Hyb} e G_{Exp} para a FC07 – Teste 7	186
Figura 6.19 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Hyb} e G_{Hyb} para a FC05 – Teste 8	188

Figura 6.20 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Hyb} e G_{Hyb} para a FC06 – Teste 8	189
Figura 6.21 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Hyb} e G_{Hyb} para a FC07 – Teste 8	190
Figura C.1 -	Fermentação Contínua (FC02)	233
Figura C.2 -	Fermentação Contínua (FC03)	234
Figura C.3 -	Fermentação Contínua (FC04)	234
Figura C.4 -	Fermentação Contínua (FC06)	235
Figura C.5 -	Fermentação Contínua (FC07)	235
Figura C.6 -	Fermentação Contínua (FC08)	236
Figura C.7 -	Fermentação Contínua (FC09)	236
Figura C.8 -	Fermentação Contínua (FC10)	237
Figura C.9 -	Fermentação Contínua (FC11)	237
Figura D.1	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC03 – Teste 1	239
Figura D.2 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC07 – Teste 1	240
Figura D.3 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC10 – Teste 1	241
Figura D.4 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC11 – Teste 1	242
Figura D.5 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC02 – Teste 1 com correção do erro de predição	244
Figura D.6 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC03 – Teste 1 com correção do erro de predição	245
Figura D.7 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC04 – Teste 1 com correção do erro de predição	246
Figura D.8 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC06 – Teste 1 com correção do erro de predição	247
Figura D.9 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC07 – Teste 1 com correção do erro de predição	248
Figura D.10 -	Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC10 – Teste 1 com correção do erro de predição	249

LISTA DE TABELAS

		pág
Tabela 2.1 -	Estatística de licenciamento de automóveis e comerciais leves por tipo de combustível	9
Tabela 2.2 -	Alguns microrganismos produtores significativos de etanol e a maioria dos carboidratos utilizados como substratos	15
Tabela 2.3 -	Comparação da variação das concentrações dos processos autoclavados e não autoclavados	21
Tabela 3.1 -	Composição do meio de crescimento de LI (1995)	58
Tabela 3.2 -	Características de operação do reator BIOSTAT	59
Tabela 3.3 -	Condições operacionais das fermentações contínuas - FC01 a FC11	60
Tabela 3.4 -	Quantidade de dados experimentais obtidos por Camêlo (2009) para cada fermentação alcoólica operada em processo contínuo empregando *Zymomonas mobilis*	63
Tabela 3.5 -	Valores de μ, $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ das fermentações FC01 a FC11	65
Tabela 3.6 -	Sequência de entrada das variáveis de alimentação e condições de treinamento para a RNA do MHCN e para a RNA autônoma	70
Tabela 3.7 -	Sequência de saída das variáveis e condições de treinamento para: RNA do MHCN e RNA autônoma	70
Tabela 4.1 -	Massas moleculares das enzimas da rota bioquímica de Entner-Doudoroff da bactéria *Zymomonas mobilis*	79
Tabela 4.2 -	Rendimento (η) e fatores de conversão (Y) para produção de etanol por *Zymomonas mobilis* a partir de glicose	86
Tabela 4.3 -	Rendimento (η) e fatores de conversão (Y) para produção de etanol por *Zymomonas mobilis* a partir de glicose considerando a água	89
Tabela 4.4 -	Rendimento, fatores de conversão e coeficientes estequiométricos para produção de etanol por *Zymomonas mobilis* a partir de glicose incluindo as três rotas metabólicas competitivas	90
Tabela 4.5 -	Proposta do modelo cibernético para *Zymomonas mobilis* em operação em modo contínuo iniciado por operação em batelada	92
Tabela 4.6 -	Condições iniciais das variáveis e condições de operação do processo contínuo de produção de bioetanol por *Zymomonas* mobilis para o modelo cibernético – etapa operada em BATELADA	96
Tabela 4.7 -	Condições iniciais das variáveis e condições de operação do processo contínuo de produção de bioetanol por *Zymomonas* mobilis para o modelo cibernético – etapa operada no modo CONTÍNUO	97

Tabela 4.8 -	Fatores de conversão e velocidades específicas de crescimento operação do processo contínuo de produção de bioetanol por *Zymomonas mobilis* para o modelo cibernético	98
Tabela 4.9 -	Parâmetros para o modelo cibernético	99
Tabela 4.10 -	Comparação entre números de equações, parâmetros e grau de liberdade do modelo matemático fenomenológico utilizado por Camêlo (2009) versus o modelo cibernético proposto neste trabalho para o processo contínuo de produção de etanol por *Zymomonas mobilis*	101
Tabela 4.11 -	Variáveis cibernéticas de saída da RNA do MHCN	103
Tabela 4.12 -	Fontes das condições iniciais, condições de operação e parâmetros necessários para simulação das equações das variáveis cibernéticas de saída para as três rotas metabólicas do processo contínuo de produção de etanol por *Zymomonas mobilis*	105
Tabela 5.1 -	Comparação da quantidade de dados experimentais (Camêlo, 2009) e da quantidade de dados interpolados para fermentações alcoólicas operadas em processo contínuo empregando *Zymomonas mobilis*. Os dados desta tabela referem-se somente a etapa de operação contínua sem adição de etanol exógeno	109
Tabela 5.2 -	Seqüência dos intervalos dos dados históricos dentro de cada fermentação contínua (FC) e de tratamentos aplicados aos dados	110
Tabela 5.3 -	Distribuição do conjunto de dados interpolados em subconjuntos para treinamento e para teste, conforme a condição de treinamento definida com ou sem atrasos dinâmicos. Proporção: 80% de dados para treinamento e 20% de dados para teste	111
Tabela 5.4 -	Relação com as características próprias das melhores RNA autônomas obtidas dentro de cada estrutura de rede com variáveis de estado na saída investigada.	113
Tabela 5.5 -	Relação com as características próprias das melhores RNA autônoma obtidas dentro de cada estrutura de rede com variáveis de estado na saída investigada	121
Tabela 5.6 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de etanol – Teste 1	130
Tabela 5.7 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de células – Teste 1	130
Tabela 5.8 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de glicose – Teste 1	131
Tabela 5.9 -	Resumo da capacidade de predição do MHCN para as fermentações contínuas do processo de produção de etanol por *Zymomonas mobilis* – Teste 1	139
Tabela 5.10 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de etanol – Teste 1 com correção do erro de predição	141
Tabela 5.11 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de células – Teste 1 com correção do erro de predição	141

Tabela 5.12 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de glicose – Teste 1 com correção do erro de predição	142
Tabela 5.13 -	Resumo da capacidade de predição do MHCN para as fermentações contínuas do processo de produção de etanol por *Zymomonas mobilis* – Teste 1 com correção do erro de predição	146
Tabela 5.14 -	Parâmetro estatístico para comparação da capacidade preditiva dos modelos avaliados para a variável de concentração de etanol	147
Tabela 5.15 -	Parâmetro estatístico para comparação da capacidade preditiva dos modelos avaliados para a variável de concentração de células	148
Tabela 5.16 -	Parâmetro estatístico para comparação da capacidade preditiva dos modelos avaliados para a variável de concentração de glicose	148
Tabela 6.1 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de etanol – Teste 2	163
Tabela 6.2 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de células – Teste 2	163
Tabela 6.3 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de glicose – Teste 2	164
Tabela 6.4 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de etanol – Teste 3	167
Tabela 6.5 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de células – Teste 3	167
Tabela 6.6 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de glicose – Teste 3	167
Tabela 6.7 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de etanol – Teste 4	171
Tabela 6.8 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de células – Teste 4	171
Tabela 6.9 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de glicose – Teste 4	171
Tabela 6.10 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de etanol – Teste 5	175
Tabela 6.11 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de células – Teste 5	175
Tabela 6.12 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de glicose – Teste 5	175
Tabela 6.13 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de etanol – Teste 6	179
Tabela 6.14 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de células – Teste 6	179
Tabela 6.15 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de glicose – Teste 6	179
Tabela 6.16 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de etanol – Teste 7	183

Tabela 6.17 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de células – Teste 7	183
Tabela 6.18 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de glicose – Teste 7	183
Tabela 6.19 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de etanol – Teste 8	187
Tabela 6.20 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de células – Teste 8	187
Tabela 6.21 -	Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de glicose – Teste 8	188
Tabela 6.22 -	Coeficiente de determinação (R^2) obtidos para cada teste de alimentação do MHCN para a variável de concentração de etanol dentro de cada fermentação contínua, para toda a sequência de dados – Testes de 1 a 8	191
Tabela 6.23 -	Coeficiente de determinação (R^2) obtidos para cada teste de realimentação do MHCN para a variável de concentração de células dentro de cada fermentação contínua, para toda a sequência de dados – Testes de 1 a 8	192
Tabela 6.24 -	Coeficiente de determinação (R^2) obtidos para cada teste de realimentação do MHCN para a variável de concentração de glicose dentro de cada fermentação contínua, para toda a sequência de dados – Testes de 1 a 8	192
Tabela 6.25 -	Coeficiente de determinação (R^2) obtidos para cada teste de realimentação do MHCN para a variável de concentração de etanol dentro de cada fermentação contínua, até o ponto nº 20 da sequência de dados – Testes de 1 a 8	193
Tabela 6.26 -	Coeficiente de determinação (R^2) obtidos para cada teste de realimentação do MHCN para a variável de concentração de células dentro de cada fermentação contínua, até o ponto nº 20 da sequência de dados – Testes de 1 a 8	194
Tabela 6.27 -	Coeficiente de determinação (R^2) obtidos para cada teste de realimentação do MHCN para a variável de concentração de glicose dentro de cada fermentação contínua, até o ponto nº 20 da sequência de dados – Testes de 1 a 8	194
Tabela 6.28 -	Coeficiente de determinação (R^2) obtidos para cada teste de realimentação do MHCN para a variável de concentração de etanol dentro de cada fermentação contínua, até o ponto nº 10 da sequência de dados – Testes de 1 a 8	195
Tabela 6.29 -	Coeficiente de determinação (R^2) obtidos para cada teste de realimentação do MHCN para a variável de concentração de células dentro de cada fermentação contínua, até o ponto nº 10 da sequência de dados – Testes de 1 a 8	195
Tabela 6.30 -	Coeficiente de determinação (R^2) obtidos para cada teste de realimentação do MHCN para a variável de concentração de glicose dentro de cada fermentação contínua, até o ponto nº 10 da sequência de dados – Testes de 1 a 8	195
Tabela 6.31 -	Comparação da capacidade preditiva do MHCN para cada FC nos teste de substituição das variáveis medidas (experimentais) pelas variáveis simuladas na alimentação da RNA MLP.51 do MHCN	196

Tabela A.1	Parâmetros obtidos na literatura por Daugulis et al. (1997). Utilizados nas FC01 a FC04 e FC05 - FC06 de Camêlo (2009)	222
Tabela A.2	Parâmetros estimados por Camêlo (2009) para uso nas FC01 a FC04 e FC05 - FC06	222
Tabela B.1	Condições iniciais das variáveis de processo para simulações do modelo cibernético proposto por Jones e Kompala (1999)	228
Tabela B.2	Condições de processo para simulações do modelo cibernético proposto por Jones e Kompala (1999)	228
Tabela B.3	Parâmetros do modelo usados para simulação das operações de batelada e contínuas, com as origens de cada parâmetro (Jones e Kompala, 1999)	230

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS – Comuns

AI	inteligência artificial (a*rtificial intelligence*)
ANN	redes neuronais artificiais (*artificial neural networks*)
Ats	atraso dinâmico inserido nas variáveis de estado = elemento de atraso unitário
Bat	abreviatura ou subscrito para designar operação em modo batelada
Coef	coeficiente
Cont	operação em modo contínuo
Exp	abreviatura ou subscrito para designar variável experimental
Ferm	fermentação
Feno	abreviatura ou subscrito para designar modelo fenomenológico
Hyb	abreviatura ou subscrito para designar modelo híbrido
Int	abreviatura ou subscrito para designar variável interpolada a partir dos dados experimentais
MHCN	modelo híbrido cibernético / neuronal
Nr_Exp	numeração seqüencial dos dados experimentais das fermentações contínuas. Sequência: FC01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 10 e 11
Obs	nos gráficos significa valores observados = valores-alvo
Old	abreviatura ou subscrito para indicar variável com um atraso dinâmico
Plus	abreviatura ou subscrito para indicar variável com um avanço dinâmico na variável
Pred	em gráficos significa valores preditos (na saída da RNA)
RNA	rede(s) neuronal(ais) artificial(ais) ≡ ANN (*artificial neural network*)
rnaegx	rede neuronal com tendo como variáveis de saída as concentrações de etanol, glicose e célula
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio
Seq	numeração seqüencial dos dados históricos (interpolados) das fermentações contínuas. Sequência: FC01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 10 e 11
SOS	soma dos quadrados = mínimos quadrados
Tanh	tangente hiperbólica
Trein	treinamento
Var	variável

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS – Modelos fenomenológico e neuronal

BFGS	Método de otimização Quasi-Newton (Algoritimo - Broyden, Fletcher, Goldfarb e Shanno, 1970)
Bias	limite interno de ativação de uma unidade neuronal
BP	retropropagação ("*backpropagation*")
CER	velocidade de produção de gás carbônico
Entner-Doudoroff	rota metabólica empregada por *Zymomonas mobilis* para fermentação alcoólica
Feedforward	diz-se das RNA cuja alimentação de dados históricos seguem do início para o final para frente
GRNN	rede neuronal de regressão generalizada (*general regression neural network*)
MLP	*perceptron* muticamada (*multilayer perceptron*)
MLST	modelo de séries temporais lineares
PNN	rede neuronal probabilística (*probabilistic neural network*)
PSP	função potencial pós-sináptico
RBF	função de bases radiais (*radial of bases function*)
RMS	raiz da distância média dos quadrados
SOS	soma dos quadrados (*sum of square*)
Trein.	Treinamento
Tanh	tangente hiperbólia

Lista de abreviaturas – Modelos cibernéticos e híbridos

CO_2	gás carbônico
FBA	análise de balanço de fluxo (*flux balance analysis*)
FFN	rede neuronal de alimentação para frente (*feedforward neural network*), com função de ativação sigmoidal
HNN	modelo neuronal híbrido (*hibrid neural network*)
MCA	análise de controle metabólico (*metabolic control analysis*)
MFA	análise de fluxo metabólico (*metabolic flux analysis*)
MHCN	Modelo híbrido cibernético/neuronal
MLP	*perceptron* muticamadas *(multilayer perceptron*)
OMCT	teoria de controle metabólico ótimo (*optimal metabolic control theory*)
RBF	função de bases radiais (*radial of bases function*)

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE SÍMBOLOS

(a) Geral

-	SÍMBOLOS
E	concentração de etanol no meio de cultura (g L^{-1})
F	vazão volumétrica na linha de alimentação (L h^{-1})
$\mathbf{F_G}$	vazão volumétrica na linha de alimentação de glicose (L h^{-1})
G	concentração de glicose no meio de cultura (g L^{-1})
k + 1	índice para designação do estado dinâmico da variável, ou seja, um passo à frente
L	concentração de lactato no meio de cultura (g L^{-1})
$\mathbf{L_{Est}}$	concentração de lactato estimada pela Equação 5.4 (g L^{-1})
n	número de dados disponível para cada variável de estado
Nr	numeração sequencial do vetor. Indica a sequência da disposição dos dados históricos ao longo do tempo para cada Fermentação Continua(FC)
r	coeficente de correlação
X	concentração de células no meio reacional (g L^{-1})
-	**SÍMBOLOS GREGOS**
τ	tempo de residência (h) – No processo fermentativo tempo histórico (h) – No modelo de Daugulis et al., (1997)

(b) Modelo cibernético

-	SÍMBOLOS
C	concentração de carboidrato armazenado intracelular ($g_{Carboidrtato}$ $g^{-1}_{Massa\ de\ célula}$)
D	taxa de diluição na alimentação de glicose (h^{-1})
$\mathbf{D_E}$	taxa de diluição na alimentação de etanol exógeno (h^{-1})
E	concentração de etanol no meio de cultura (g L^{-1})
$\mathbf{E_{ad}}$	concentração de etanol exógeno na linha de alimentação (g L^{-1})
$\mathbf{e_i}$	concentração intracelular da enzima chave para a i-ésima rota metabólica (g_{Enzima} $g^{-1}_{Célula}$)
$\mathbf{e_1}$	concentração intracelular da enzima chave para a rota metabólica da fermentação da glicose (g_{Enzima} $g^{-1}_{Célula}$)
$\mathbf{e_2}$	concentração intracelular da enzima chave para a rota metabólica da oxidação do etanol (g_{Enzima} $g^{-1}_{Célula}$)

e_3	concentração intracelular da enzima chave para a rota metabólica da oxidação da glicose ($g_{Enzima}\ g^{-1}_{Célula}$)
G_0	concentração de substrato na linha de alimentação (g L^{-1})
G	concentração de substrato no meio de cultura (g L^{-1})
G_F	concentração de substrato na linha de alimentação (g L^{-1})
$\frac{dX}{dt}$	taxa de crescimento celular (g L^{-1} h^{-1})
$\frac{dG}{dt}$	taxa de consumo de substrato (g L^{-1} h^{-1})
$\frac{dC}{dt}$	taxa de consumo de carboidrato armazenado intracelular ($g_{Carboidratato}\ g^{-1}_{Massa\ de\ célula}\ h^{-1}$)
$\frac{dE}{dt}$	taxa de formação de etanol (g L^{-1} h^{-1})
$\frac{dO}{dt}$	taxa de consumo de oxigênio (g L^{-1} h^{-1})
$\frac{de_i}{dt}$	taxa de formação de enzima intracelulares para a i-ésima rota metabólica ($g_{Enzima\ i}\ g_{Célula}^{-1}\ h^{-1}$)
k_i	constante de saturação para a i-ésima rota metabólica (g L^{-1})
k_1	constante de saturação para via de fermentação da glicose (g L^{-1})
k_2	constante de saturação para via de oxidação do etanol (g L^{-1})
k_3	constante de saturação para via de oxidação da glicose (g L^{-1})
K_{O_i}	constante de saturação para oxigênio dissolvido da i-ésima rota oxidativa (mg L^{-1})
k_{O_2}	constante de saturação para oxigênio dissolvido da rota oxidativa de etanol (mg L^{-1})
k_{O_3}	constante de saturação para oxigênio dissolvido da rota oxidativa de glicose (mg L^{-1})
k_{La}	coeficiente de transferência de oxigênio em massa (h^{-1})
$max_j\ r_j$	valor máximo das taxas instantâneas de consumo de substrato para j-ésima rota metabólica (h^{-1})
O	concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura (mg L^{-1})
O^*	limite de solubilidade do oxigênio dissolvido (mg L^{-1})
q_{CO_2}	taxa específica de produção de CO_2 total no processo (h^{-1})
q_{O_2}	taxa específica de consumo de O_2 na rota metabólica da oxidação da glicose e etanol (h^{-1})
r_i	taxa instantânea de consumo de substrato para a i-ésima rota metabólica (h^{-1})
r_j	valor das taxas instantâneas de consumo de substrato para j-ésima rota metabólica (h^{-1})

r_1	taxa instantânea de consumo de substrato para via de fermentação da glicose (h^{-1})
r_2	taxa instantânea de consumo de substrato para via de oxidação do etanol (h^{-1})
r_3	taxa instantânea de consumo de substrato para via de oxidação da glicose (h^{-1})
RQ	quociente de respiração na rota metabólica da oxidação da glicose (admensional)
S_i	concentração de substrato de carbono para a i-ésima rota metabólica ($g\ L^{-1}$)
u_i	variável de controle cibernético da síntese enzimática para a i-ésima rota metabólica (admensional)
u_1	variável de controle cibernético da síntese enzimática para a rota metabólica de (admensional): - fermentação alcoólica (nesta pesquisa) - fermentação a glicose (para Jones e Kompala, 1999).
u_2	variável de controle cibernético da síntese enzimática para a rota metabólica de (admensional): - fermentação alcoólica (nesta pesquisa) - fermentação a glicose (para Jones e Kompala, 1999).
u_3	variável de controle cibernético da síntese enzimática para a rota metabólica de (admensional): - formação de lactato (nesta pesquisa); - oxidação da glicose (para Jones e Kompala, 1999).
V_{max}	velocidade máxima
X	concentração celular no meio reacional ($g\ L^{-1}$)
Y_i	coeficiente de rendimento para a i-ésima rota metabólica ($g\ g^{-1}$)
Y_1	coeficiente de rendimento para a rota metabólica da fermentação da glicose ($g_{Etanol}\ g_{Glicose}^{-1}$)
Y_2	coeficiente de rendimento para a rota metabólica de oxidação do etanol ($g_{Célula}\ g_{Etanol}^{-1}$)
Y_3	coeficiente de rendimento para a rota metabólica de oxidação da glicose ($g_{Célula}\ g_{Glicose}^{-1}$)

- SÍMBOLOS GREGOS

α	taxa de síntese enzimática (h^{-1})
α^*	síntese enzimática constitutiva (h^{-1})
β	taxa de degradação enzimática (h^{-1})
γ_i	coeficiente estequiométrico para armazenamento intracelular da síntese e do consumo de carboidrato referente à iésima rota metabólica ($g\ g^{-1}$)
γ_1	coeficiente estequiométrico para armazenamento intracelular da síntese e do consumo de carboidrato referente à rota metabólica de fermentação da glicose ($g\ g^{-1}$)
γ_2	coeficiente estequiométrico para armazenamento intracelular da síntese e do consumo de carboidrato referente à rota metabólica de oxidação do etanol ($g\ g^{-1}$)

γ_3 coeficiente estequiométrico para armazenamento intracelular da síntese e do consumo de carboidrato referente à rota metabólica de oxidação da glicose (g g^{-1})

μ_1 taxa específica de crescimento para a rota metabólica de (h^{-1}):
- fermentação alcoólica (nesta pesquisa)
- fermentação a glicose (para Jones e Kompala, 1999).

μ_2 taxa específica de crescimento para a rota metabólica de (h^{-1}):
- crescimento celular (nesta pesquisa);
- oxidação do etanol (para Jones e Kompala, 1999).

μ_3 taxa específica de crescimento para a rota metabólica de (h^{-1}):
- formação de lactato (nesta pesquisa);
- oxidação da glicose (para Jones e Kompala, 1999).

$\mu_{i,max}$ taxa específica de crescimento máxima para a i-ésima rota metabólica (h^{-1})

$\mu_{1,max}$ taxa específica de crescimento máxima para a rota de fermentação alcoólica (h^{-1})

$\mu_{2,max}$ taxa específica de crescimento máxima para a rota de crescimento de células (h^{-1})

$\mu_{3,max}$ taxa específica de crescimento máxima para a rota de fermentação lática (h^{-1})

υ_i variável de controle cibernético da atividade enzimática para a i-ésima rota metabólica (admensional)

υ_j variável de controle cibernético da atividade enzimática para a j-ésima rota metabólica (admensional)

υ_1 variável de controle cibernético da atividade enzimática para a rota metabólica de (admensional):
- fermentação alcoólica (nesta pesquisa);
- fermentação a glicose (para Jones e Kompala, 1999).

υ_2 variável de controle cibernético da atividade enzimática para a rota metabólica de (admensional):
- formação de lactato (nesta pesquisa);
- oxidação da glicose (para Jones e Kompala, 1999).

υ_3 variável de controle cibernético da atividade enzimática para a rota metabólica de (admensional)
- formação de lactato (nesta pesquisa);
- oxidação da glicose (para Jones e Kompala, 1999).

$\varnothing_i$ parâmetro estequiométricos para a i-ésima rota metabólica (g g^{-1})

$\varnothing_1$ parâmetro estequiométricos para a rota metabólica de fermentação da glicose (g g^{-1})

$\varnothing_2$ parâmetro estequiométricos para a rota metabólica de oxidação do etanol (g g^{-1})

$\varnothing_3$ parâmetro estequiométricos para a rota metabólica de oxidação da glicose (g g^{-1})

$\varnothing_4$ parâmetro estequiométricos referente ao carboidrato armazenado intracelular (g g^{-1})

(c) Rede Neuronal Artificial

- SÍMBOLOS

$E_{RNA}\bar{x}$	o erro global da rede calculado para o valor médio dos dados antecessores (na Equação 3.3 para calculo do RATIO)
$E_{RNA}x$	erro global da rede calculado para o valor real do dado (na Equação 3.3 para calculo do RATIO)
$f(\bullet)$	quando referida a um neurônio denota função de ativação ou função de transferência
f_{pj}	função de ativação gausiana
i	número índice
j	designação do j-ésimo neurônio de uma camada k+1
k	designação da camada de unidades neuroniais anterior à camada k+1
K+1	designação da camada de unidades neuroniais seguinte
k-1	índice indicativo da inserção de 1 atrasos dinâmicos na variável
k-2	índice indicativo da inserção de 2 atrasos dinâmicos na variável
k+1	índice indicativo da condição da variável um passo adiante em relação ao tempo de fermentação
L	número de neurônios na camada escondida nas redes neuronais de função de bases radiais
L	camada de saída da rede neuronal
M	unidades de soma lineares da camada de saída de rede neuronal de funções de bases radiais
n_h	número de neurônios na camada escondida
n_i	número de neurônios na camada de entrada
n_k	número de neurônios na camada “k”
n_L	número de neurônios na camada de saída
N	dimensão do vetor de entradas nas redes neuronais de função de bases radiais
N_p	número total de padrões de treinamento
p	padrão de treinamento
P	número de vizinhos mais próximos c_{kp} nas redes de bases radiais
RATIO	razão de sensibilidade (Equação 3.3)
s	saída predita pela rede neuronal
s	direção de busca para otimização ou saída da rede neuronal
SD	razão indicativa do desempenho da rede neuronal artificial (Equação 3.2)
$s_{pi,k}$	saída ou ativação de um neurônio “i” da camada k, para um padrão “p”

$S_{pj,k+1}$	resposta do j-ésimo neurônio de acordo com a função de ativação oriunda da camada k+1
$S_{pj,L}$	resposta do j-ésimo neurônio de acordo com a função de ativação oriunda da camada de saída
$s_{pn_L,L}$	sinal de saída de um neurônio "L" na camada de saída
t	saída alvo
t_{pl}	saída alvo de um neurônio "l" da camada de saída, para um padrão "p"
w	forma vetorial das variáveis independentes de otimização (pesos e *biases*)
w_0	forma vetorial das variáveis independentes de otimização nas condições iniciais (pesos e *biases*)
w_k	forma vetorial das variáveis independentes de otimização (pesos e *biases*) na iteração k
w_{k+1}	forma vetorial das variáveis independentes de otimização (pesos e *biases*) na iteração k+1
w_{jik}	peso entre o neurônio "j" da camada "k+1" e o neurônio "i" da camada anterior
w_{kj}	fator peso entre a saída da camada escondida e a camada de saída de rede neuronal de funções de bases radiais
x	vetor de entradas nas redes neuronal de função de bases radiais
$\bar{X}$	média aritmética dos valores-alvo (na Equação 3.2 para calculo da razão SD)
X_i	valor-alvo individual (na Equação 3.2 para calculo da razão SD)
X_{pi}	valor predito para cada variável alvo individual (na Equação 3.2 para calculo da razão SD)
y_j	camada de saída de rede neuronal de funções de bases radiais
-	**SÍMBOLOS GREGOS**
ε	termo de momento
η	taxa de aprendizagem
θ_j	limite interno de ativação do j-ésimo neurônio na camada de saída para redes de bases radiais (*bias*)
$\theta_{j,k+1}$	limite interno de ativação do j-ésimo neurônio na camada k+1 (*bias*)
$\theta_{j,L}$	limite interno de ativação do j-ésimo neurônio na camada de saída (*bias*)
$\lambda_{j,k+1}$	nível de ativação do j-ésimo neurônio
$\lambda_{pj,k+1}$	nível de ativação do j-ésimo neurônio para um padrão de treinamento na camada k+1
$\lambda_{pj,L}$	nível de ativação do j-ésimo neurônio para um padrão de treinamento na camada de saída
μ_{ji}	Centro da função de ativação gaussiana

ξ	função degrau linear
σ_j	fator escala para redes de bases radiais
σ_k	fator escala para redes de bases radiais

(d) Modelo híbrido

-	**SÍMBOLOS**
A	constante empírica (mol g_x^{-1})
B	constante empírica (mol g_x^{-1} h^{-1})
CER	velocidade de produção de gás carbônico (mol L^{-1} h^{-1} 10^5)
$\frac{dX}{dt}$	taxa de crescimento celular (g L^{-1} h^{-1})
$\frac{dS}{dt}$	taxa de consumo de substrato intracelular ($g_{Substrato\ intracelular}$ $g^{-1}_{Biomassa\ seca}$ h^{-1})
$\frac{dS_0}{dt}$	taxa de consumo de substrato extracelular ($g_{Substrato\ extracelular}$ L^{-1} h^{-1})
E	concentração de etanol no meio reacional (g L^{-1})
G	concentração de glicose no meio reacional (g L^{-1})
K_{11}	velocidade máxima de adsorção da lipase extracelular na interface orgânica – aquosa (g_{So} L^{-1})
K_{12}	constante de saturação da adsorção da lipase extracelular na interface orgânica - aquosa (g_{So} L^{-1})
K_{13}	constante de saturação da adsorção da lipase extracelular na interface orgânica – aquosa (mL U^{-1})
K_{1m}	velocidade máxima para a síntese de lipase intracelular (U mg_x^{-1} h^{-1})
K_{1S}	constante de saturação para a síntese de lipase intracelular (g_{So} g_x^{-1})
K_{es}	constante associada a existência de recursos energéticos para realizar a excreção da lipase intracelular (g_s g_x^{-1})
K_i	constante para a inibição da síntese de lipase intracelular (g_x g_{So}^{-1})
K_m	velocidade máxima de transporte da lipase para o meio extracelular (U mg_x h^2)
K_μ	constante de saturação no transporte da lipase para o meio extracelular (h^{-1})
K_S	constante de saturação no transporte de lipase para o meio extracelular (U mg_x^{-1})
K_{So}	velocidade máxima de transporte de substrato (h^{-1})
K_{So1}	constante de saturação no transporte de substrato (g_{So} L^{-1})
K_{SS}	constante de saturação no crescimento referida ao substrato intracelular (g g^{-1})
PHB	poli-β-hidroxibutirato
q_0	velocidade de adição de substrato (g h^{-1})
S	concentração de substrato intracelular ($g_{Substrato\ intracelular}$ $g^{-1}_{Biomassa\ seca}$)

S_0	substrato extracelular (g L^{-1})
t	tempo (h)
V	volume do biorreator (L)
X	concentração celular (g L^{-1})
$Y_{X/S}$	rendimento biomassa / substrato (g $_{\text{Biomassa seca}}$ g $^{-1}{}_{\text{Ácido oléico}}$)
$\mathbf{Z_1}$	variável cibernética de saída referente à rota metabólica da fermentação alcoólica (h^{-1})
$\mathbf{Z_2}$	variável cibernética de saída referente à rota metabólica do crescimento celular (h^{-1})
$\mathbf{Z_1}$	variável cibernética de saída referente à rota metabólica da fermentação lática (h^{-1})
$\mathbf{Z_{(i)}}$	variáveis cibernéticas de saída referentes às rotas metabólicas abrangidas pelo processo, onde i = 1, 2, 3
z	elemento de atraso unitário

-	**SÍMBOLOS GREGOS**
β	coeficiente de manutenção (g_{So} g_x^{-1} h)
δS	função de excreção para transporte ativo com saturação (adimensional)
μ	taxa de crescimento celular específico (h^{-1})
μ_x	taxa de crescimento celular específico (h^{-1})
$\mu_{máx}$	taxa de crescimento celular específico máxima (h^{-1})

(e) Modelo fenomenológico (Daugulis et al., 1997)

-	**SÍMBOLOS**
a	parâmetro para taxa específica de crescimento instantânea (adimensional)
b	parâmetro para taxa específica de crescimento instantânea (adimensional)
D	taxa de diluição para substrato (h^{-1})
D_e	taxa de diluição para etanol exógeno (h^{-1})
f_μ	fator de inibição para taxa específica de crescimento dinâmica (adimensional)
K_i	parâmetro de inibição de substrato para taxa específica de crescimento (g L^{-1})
K_s	parâmetro de saturação de substrato para taxa específica de crescimento (g L^{-1})
K_{mp}	parâmetro de saturação de substrato para taxa de produção de etanol (g L^{-1})
P	concentração de etanol (g L^{-1})
P_e	concentração de etanol exógeno (g L^{-1})
P_{ma}	limite de inibição do etanol para taxa específica de crescimento instantânea (g L^{-1})
P_{mb}	limite máximo de inibição de etanol para crescimento celular (g L^{-1})

P_{me}	limite máximo de inibição de etanol para produção de etanol (g L^{-1})
P_{ob}	limite de inibição de etanol para taxa específica de crescimento instantânea (g L^{-1})
Q_p	taxa específica de produção de etanol (g $g^{-1}h^{-1}$)
Q_{pmax}	taxa específica máxima de produção de etanol (g $g^{-1}h^{-1}$)
S	concentração de substrato (glicose) (g L^{-1})
S_f	concentração de substrato na linha de alimentação (glicose) (g L^{-1})
S_i	limite inferior de inibição por substrato de taxa específica de crescimento (g L^{-1})
t	tempo atual(h)
X	concentração de celular (g L^{-1})
W	média ponderada de 1ª ordem da taxa de mudança da concentração de etanol (g $L^{-1}h^{-1}$)
$Y_{X/S}$	coeficiente de rendimento para crescimento de células (g g^{-1})
$Y_{P/S}$	coeficiente de rendimento para formação de etanol (g g^{-1})
Z	média ponderada de 2ª ordem da taxa de mudança da concentração de etanol (g $L^{-1}h^{-1}$)
-	**SÍMBOLOS GREGOS**
α	expoente de inibição por etanol para a taxa de produção de etanol (adimensional)
β	parâmetro histórico ponderado para a taxa de mudança de concentração de etanol. Indica a magnitude do tempo LAG para o atraso do efeito de inibição (h^{-1})
$1/\beta$	tempo no passado quando ocorre a mudança na concentração de etanol, a qual causa a mais significativa influência na performance da célula (h) no tempo atual "t" (h)
δ	parâmetro do fator de inibição da taxa de mudança da concentração de etanol (adimensional)
λ	parâmetro do fator de inibição da taxa de mudança da concentração de etanol (adimensional)
σ	variável de contagem para adição de etanol exógeno (adimensional)
τ	tempo histórico (h)
ψ_w	média ponderada da taxa de mudança da concentração de etanol anterior (h^{-1})
$\mu(S,P)$	taxa de crescimento específica instantânea (h^{-1})
$\mu(S,P,Z)$	taxa específica de crescimento dinâmica (h^{-1})
μ_{max}	taxa de crescimento específica instantânea na concentração de etanol instantânea zero (h^{-1})

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de processos para a obtenção de energia a partir de fontes sustentáveis é recorrente. Fatores como a eminência da extinção dos combustíveis fósseis e geração de poluentes imprimem preocupação, gerando um grande número de trabalhos na literatura científica.

Face à premente necessidade de inovação da matriz energética, a produção de bioetanol como uma alternativa às fontes de energia oriundas de combustíveis fósseis tem sido um assunto de grande interesse desde a crise petrolífera dos anos 1970. Nestes termos, o Brasil destaca-se mundialmente como detentor da maior tecnologia de processo fermentativo para produção de etanol, tendo uma indústria sucroalcooleira autossustentável em uso de energia e em termos ecológicos (Porto, 2005).

Neste contexto, a indústria de bioetanol tem se desenvolvido rapidamente nos últimos anos. Assim, face aos aspectos econômicos e ambientais já discutidos, essa produção demanda a aplicação de várias técnicas para permitir a obtenção desse biocombustível com eficiência, com baixo custo de matéria-prima e minimizando o consumo de energia.

A síntese de etanol é convencionalmente realizada por leveduras. Todavia, no esforço de melhoria e otimização da produção, as bactérias *Zymomonas mobilis* despontam como micro-organismo promissor para produção industrial de etanol, devido às suas características de elevada tolerância ao etanol, de menor produção de biomassa, além de cinéticas e produtividade superiores quando comparadas com estas mesmas características em leveduras.

Apesar de sua promissora adequação ao processo, uma desvantagem associada à fermentação contínua empregando *Zymomonas mobilis* é a ocorrência de oscilações peculiares na concentração de substrato, na concentração celular e na concentração de produto

sob certas condições de processo, implicando em condições inaceitáveis de processo como o decréscimo da produtividade de etanol e conseqüente alto nível de substrato residual. Concomitante a essa limitação específica desta cepa microbiana, o contínuo aumento da complexidade, eficiência e confiabilidade dos modernos sistemas industriais necessita de um constante desenvolvimento no monitoramento e controle do processo. Neste contexto, a proposição de modelo matemático que represente com significância estatística apropriada o processo produtivo, possibilitando a simulação, otimização e implementação de malhas de controle faz-se fundamental.

1.2 OBJETIVOS

Tendo por foco a problemática acima exposta, nesta seção são estabelecidos os objetivos para o desenvolvimento do presente estudo.

1.2.1 Objetivo geral

Estudar a dinâmica e propor metodologia de modelagem matemática fundamentada na abordagem cibernética e neuronal para o processo fermentativo de produção de etanol por *Zymomonas mobilis*, operado em modo contínuo.

1.2.2 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral acima definido, foram seguidos os objetivos específicos:

- estudar processos fermentativos de produção alcoólica, operados em modo contínuo, envolvendo condições anormais onde ocorrem oscilações;

- selecionar na literatura dados experimentais desses processos contínuos de produção de etanol;

- definido o conjunto de dados experimentais descritos no item anterior, estudar o processo e entender a dinâmica associada à produção do bioetanol;

- definir, com base na literatura, modelos com abordagem cibernética para representar o processo;

- propor um modelo cibernético para aplicação no processo contínuo de produção de etanol empregando *Zymomonas mobilis;*

- definir uma rede neuronal para representação adequada do processo contínuo de produção de etanol, com flexibilidade para integração ao modelo cibernético proposto;

- tratar os dados experimentais selecionados para aplicação da técnica de modelagem definida;

- desenvolver um modelo híbrido cibernético / neuronal para contornar os óbices do processo para implementação do modelo cibernético e compará-lo com a RNA autônoma e com o modelo fenomenológico.

1.3 JUSTIFICATIVA

Seguindo a linha definida nos objetivos específicos, foram selecionados os dados experimentais obtidos por Camêlo (2009) utilizando como micro-organismo para produção de bioetanol as bactérias *Zymomonas mobilis* Ag11 DAUFPE 198. A autora realizou as fermentações contínuas para avaliar possíveis comportamentos dinâmicos diante de diferentes condições - como concentração de glicose no meio de crescimento, concentração de glicose na linha de alimentação, adição de etanol exógeno - para analisar os efeitos de tais condições nas proteínas das bactérias *Zymomonas mobilis*.

A literatura científica reporta a alta sensibilidade a mudanças anormais em condições operacionais nos processos bioquímicos, sendo assim primordial garantir a manutenção dessas condições numa trajetória pré-especificada para assegurar o máximo rendimento possível de produto. Frente a tal quadro, a já argüida necessidade de desenvolvimento de modelos matemáticos com capacidade preditiva adequada como via para o constante desenvolvimento de monitoramento e controle do processo para sistemas industriais, é ratificada.

No contexto evolucionário dos processos industriais, muito embora a maior tendência atual de pesquisa na área envolva a tecnologia de etanol de segunda geração, onde matérias-primas lignocelulósicas são empregadas de forma a não prejudicar a produção de alimentos, o esforço no desenvolvimento de modelos matemáticos para a consolidada tecnologia de primeira geração não pode ser relegada a plano secundário. Mesmo porque após a hidrólise destes materiais os açúcares fermentescíveis são disponibilizados, retornando as vias já consagradas da primeira geração.

1.4 ORGANIZAÇÃO DO TEXTO

A presente pesquisa é apresentada em capítulos. Para facilitar a visualização geral da sistemática adotada, os capítulos são descritos sumariamente abaixo.

Neste Capítulo 1 o problema a ser estudado é contextualizado dentro do escopo tecnológico, econômico e ambiental. Desta forma os objetivos são apresentados e a sequência das etapas descrita.

O Capítulo 2 traz a revisão bibliográfica com base na literatura científica. Neste sentido, o assunto é inserido no contexto econômico / estratégico e ambiental da produção de biocombustível. Um breve apanhado sobre as condições de processo é exibido, discutindo as matérias-primas e micro-organismos mais utilizados, quando a fundamentação bioquímica também é abordada. Ao enveredar pelo campo da modelagem matemática de bioprocessos, as técnicas são analisadas quanto à fundamentação básica e classificadas, culminando com a proposição esquemática para classificação.

No Capítulo 3, os dados experimentais e a metodologia empregada para o desenvolvimento do trabalho são tratados. Portanto, os programas computacionais utilizados são enunciados. Ao apresentar os dados experimentais selecionados, o processo de produção de bioetanol correlato é descrito, incluindo as condições de operação e métodos analíticos empregados por Camêlo (2009). São também apresentadas as metodologias para tratamento dos dados experimentais e de análise estatística dos resultados e, por fim, as propostas dos modelos matemáticos selecionados.

A sistemática adotada para a proposição dos modelos é exposta no Capítulo 4. Desta forma, as enzimas, rotas bioquímicas, estequiometria, parâmetros e condições de processo são analisados, culminando com a concepção dos modelos cibernético e híbrido cibernético / neuronal.

No Capítulo 5, os resultados do modelo híbrido são apresentados, analisados e discutidos. A comparação do modelo híbrido com os modelos neuronal autônomo e fenomenológico é mostrada.

O Capítulo 6 traz os vários testes de realimentação realizados para a RNA MLP híbrida, os quais foram avaliados graficamente e empregando critérios estatísticos apropriados.

No Capítulo 7 são formuladas as conclusões, apresentadas as sugestões para trabalhos futuros na linha ora abordada, bem como discutidas as contribuições do estudo realizado.

As descrições detalhadas do modelo fenomenológico de Daugulis *et al*. (1997) e do modelo cibernético de Jones e Kompala (1999) estão nos Apêndices A e B, respectivamente.

No Apêndice C são relacionadas as figuras correspondentes aos dados experimentais obtidos por Camêlo (2009), que não foram apresentadas no Capítulo 3.

O Apêndice D exibe as figuras contendo as respostas do MHCN referentes às variáveis das fermentações contínuas cujo comportamento da curva simulada em relação aos dados experimentais é semelhante ao da figura apresentada no Capítulo 5.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

O desenvolvimento de processos para a obtenção de energia a partir de fontes sustentáveis é recorrente. Fatores como a eminência da extinção dos combustíveis fósseis e geração de poluentes geram um grande número de trabalhos, os quais ocupam extenso espaço na literatura científica.

Desta forma, a produção de etanol como uma alternativa às fontes de energia oriundas de combustíveis fósseis tem sido um assunto de grande interesse desde a crise petrolífera dos anos 1970. Portanto, existe uma forte necessidade de produção de etanol com eficiência, com baixo custo das matérias-primas e também baixo consumo de energia (Tao et al., 2005).

2.1.1 Aspectos gerais

Segundo Porto (2005), o Brasil era há época, mundialmente, o país com a maior tecnologia de processo fermentativo para produção de álcool e possui mercado garantido, devido ao álcool anidro adicionado à gasolina - obrigatório por lei nacional em substituição ao chumbo - ou hidratado para uso como combustível. O desenvolvimento do motor multicombustível para automóveis, iniciado em 1994, aumenta ainda mais o mercado nacional. Além disso, a indústria sucroalcooleira é autossustentável em uso de energia além de sua produção ser ecologicamente adequada, por reduzir os gases geradores do efeito estufa provenientes da queima de combustíveis fósseis no país numa taxa próxima de 20%.

Todavia, segundo Glazer e Nikaido (2007), na primeira destilação do fermentado de açúcar de cana há a formação de 12 L de vinhoto para cada litro de etanol produzido. Esse subproduto do processo possui como principais componentes matéria orgânica (40-65 g L^{-1}),

nitrogênio (07-1,0 g L^{-1}), fósforo (0,1-0,7 g L^{-1}) e potássio (4,0-8,0 g L^{-1}). Dependendo de sua aplicação, pode se torna um grave problema das águas residuais ou um subproduto com valor agregado. Assim, citam sua utilização na produção de alimentos de alto valor nutritivo para gado.

Para Cortez e Brossard Pérez (1997) a vinhaça constitui-se no principal efluente industrial da produção de etanol, contendo componentes orgânicos e inorgânicos persistentes após as diferentes etapas do processo. Isso implica em elevada DBO (30-40.000) – demanda bioquímica de oxigênio – e em pH na faixa de 4 a 5. Assim, concluem que sua eliminação nas bacias hidrográficas representa um grande problema ambiental, especialmente quando depositado em grandes volumes. Devido ao seu alto teor de potássio, no Brasil a maior parte da vinhaça proveniente da produção de etanol é empregada como fertilizante, todavia apresenta a desvantagem econômica da necessidade de evaporação da água para a redução do custo de transporte, além dos problemas advindos quando alguns solos não respondem positivamente a aplicação deste produto ácido. Nesse sentido, Cortez e Brossard Pérez (1997) investigaram a viabilidade técnica da disposição do vinhoto no local da produção via combustão. Por fim concluem que a mistura deste resíduo a óleo combustível pode ser um caminho apropriado para a sua disposição por combustão.

Haandel (2000) direcionou seu trabalho para demonstrar a possibilidade da conversão dos resíduos de processo de produção de álcool em produto para a própria usina. Assim, citou ter o vinhoto enorme potencial posto que o material nele contido pode ser transformado em biogás, o qual tem emprego na produção de energia elétrica e vapor. Concluiu então que uma vantagem importante do uso racional dos subprodutos é a diminuição considerável da poluição ambiental.

Navarro et al. (2000) estudaram a bioconcentração de vinhoto oriundo da fermentação alcoólica a partir de melaço de cana-de-açúcar, usando este concentrado na preparação do meio de fermentação em substituição à água. Empregaram diversas porcentagens de vinhaça no meio reacional e repetiram o processo em várias bateladas. Concluíram que o sistema de bioconcentração proposto tem importância econômica para aplicação industrial, além da vantagem da disposição não poluente dos resíduos.

Associando as práticas de descarte inadequado de rejeito da indústria do álcool como uma das causas do desequilíbrio ambiental, Simões et al. (2004) estudaram a viabilidade econômica da concentração do vinhoto através da técnica de osmose inversa para uso como fertilizante, em substituição à adubação mineral. Concluíram que a proposta da concentração do vinhoto também pode ser justificada pela diminuição do descarte de poluentes no meio

ambiente e por diminuir a necessidade de captação de água de fontes naturais para uso nas usinas de álcool.

A demanda de etanol combustível em veículos pode ser verificada por meio da estatística de licenciamento de automóveis e comerciais leves por tipo de combustível elaborada pela União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento a partir dos dados da Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores - Brasil / ANFAVEA. Essa comparação da quantidade de veículos comercializados no país e os diferentes combustíveis no período de 1979 a 2012 é apresentada na Tabela 2.1.

Para visualizar geograficamente a distribuição da produção de etanol no território nacional e facilitar a interpretação das estatísticas apresentadas abaixo, a Figura 2.1 apresenta as regiões de produção do setor sucroenergético no Brasil.

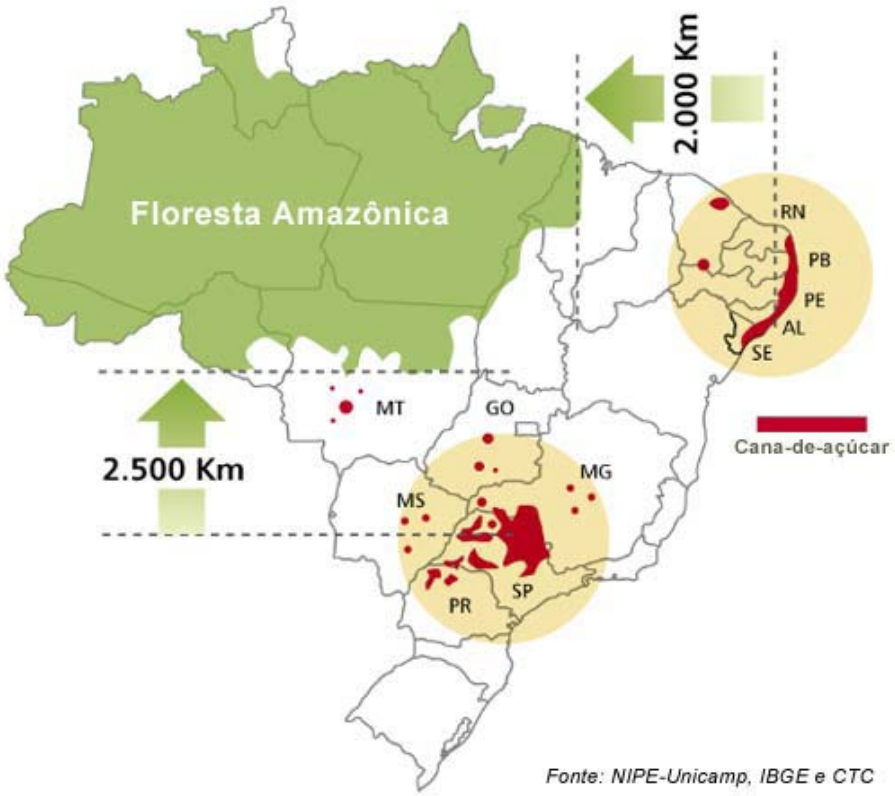


Figura 2.1 – Mapa da produção do setor sucroenergético no Brasil. Fonte: União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA). http://www.unica.com.br/content/show.asp?cntCode={D6C39D36-69BA-458D-A95C-815C87E4404D}#10 – Acessado em 10 Ago 2012 as 23h00min

Conforme relatada pela UNICA, a produção de cana-de-açúcar se concentra nas regiões Centro-Sul e Nordeste do Brasil. O mapa da Figura 2.1 mostra as áreas onde se concentram as plantações e usinas produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade, segundo dados oficiais do

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas – SP) e do CTC (Centro de Tecnologia Canavieira).

Tabela 2.1 - Estatística de licenciamento de automóveis e comerciais leves por tipo de combustível

MESES	AUTOMÓVEIS E COMERCIAIS LEVES			TOTAL
	GASOLINA	ÁLCOOL	FLEX-FUEL	
1979	905.706	3.114	-	908.820
1980	626.467	240.643	-	867.110
1981	344.467	136.242	-	480.709
1982	365.434	232.575	-	598.009
1983	78.618	579.328	-	657.946
1984	33.482	565.536	-	599.018
1985	28.655	645.551	-	674.206
1986	61.916	697.049	-	758.965
1987	31.190	458.683	-	489.873
1988	77.312	566.482	-	643.794
1989	260.821	399.529	-	660.350
1990	542.855	81.996	-	624.851
1991	546.258	150.982	-	697.240
1992	498.927	195.503	-	694.430
1993	764.598	264.235	-	1.028.833
1994	1.127.485	141.834	-	1.269.319
1995	1.557.674	40.706	-	1.598.380
1996	1.621.968	7.647	-	1.629.615
1997	1.801.688	1.120	-	1.802.808
1998	1.388.734	1.224	-	1.389.958
1999	1.122.229	10.947	-	1.133.176
2000	1.310.479	10.292	-	1.320.771
2001	1.412.420	18.335	-	1.430.755
2002	1.283.963	55.961	-	1.339.924
2003	1.152.463	36.380	48.178	1.237.021
2004	1.077.945	50.949	328.379	1.457.273
2005	697.004	32.357	812.104	1.541.465
2006	316.561	1.863	1.430.334	1.748.758
2007	245.660	107	2.003.090	2.248.857
2008	217.021	84	2.329.247	2.546.352
2009	221.709	70	2.652.298	2.874.077
2010	280.704	50	2.876.173	3.156.927
2011	376.998	51	2.848.071	3.225.120
2012	144.602	21	1.402.672	1.547.295

Obs: 1) Os dados até 2004 referem-se a vendas internas no atacado. Os dados a partir de 2004 fazem referência ao número de veículos licenciados;

2) Inclui somente os veículos do Ciclo Otto (não estão contabilizados os comerciais leves movidos a diesel).

Fonte: Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores - Brasil / ANFAVEA; Elaboração: União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) - http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/ - Acessado em 10 Ago 2009 e http://www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn=54 - atualização em 10 Ago 2012 as 23h00min.

Neste contexto, a indústria de bioetanol tem se desenvolvido rapidamente nos últimos anos para lidar, novamente, com o esgotamento dos combustíveis fósseis (FU et al., 2009). Essa afirmação pode ser corroborada pela estatística apresentada pela União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA) e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o volume de metros cúbicos de etanol produzido no Brasil por safra, englobando as safras no período de 1980/1981 – 2011/2012. A Figura 2.2 demonstra a mencionada estatística. A UNICA ressalta que os dados da safra 2011/2012 são preliminares, pois os dados referentes à moagem de cana-de-açúcar e à produção de etanol dos Estados que compõem a região Norte-Nordeste estão atualizados até 31/05/2012; já para os Estados da região Centro-Sul, estes valores são os consolidados finais. Apesar da Figura 2.1 mostrar a concentração das plantações e usinas produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade no Nordeste, Centro-oeste e Sudeste, a estatística de produção de etanol da Figura 2.2 inclui também os estados do Norte do país (Tocantins - TO, Pará - PA, Amapá - AP, Rondônia - RO, Amazonas - AM, Acre - AC e Roraima - RR).

Na Figura 2.2 as abreviaturas significam: ALCOPAR (Associação dos Produtores de Bioenergia do Estado do Paraná), BIOSUL (Associação dos Produtores de Bionergia de Mato Grosso do Sul), SIAMIG (Sindicato da Indústria de Fabricação do Álcool no Estado de Minas Gerais), SINDALCOOL (Sindicato da Indústria de Fabricação do Álcool no Estado da Paraíba), IFAEG (Sindicatos da Indústria de Fabricação de Etanol e Açúcar do Estado de Goiás), SINDAAF (Sindicato Fluminense dos Produtores de Açúcar e de Álcool).

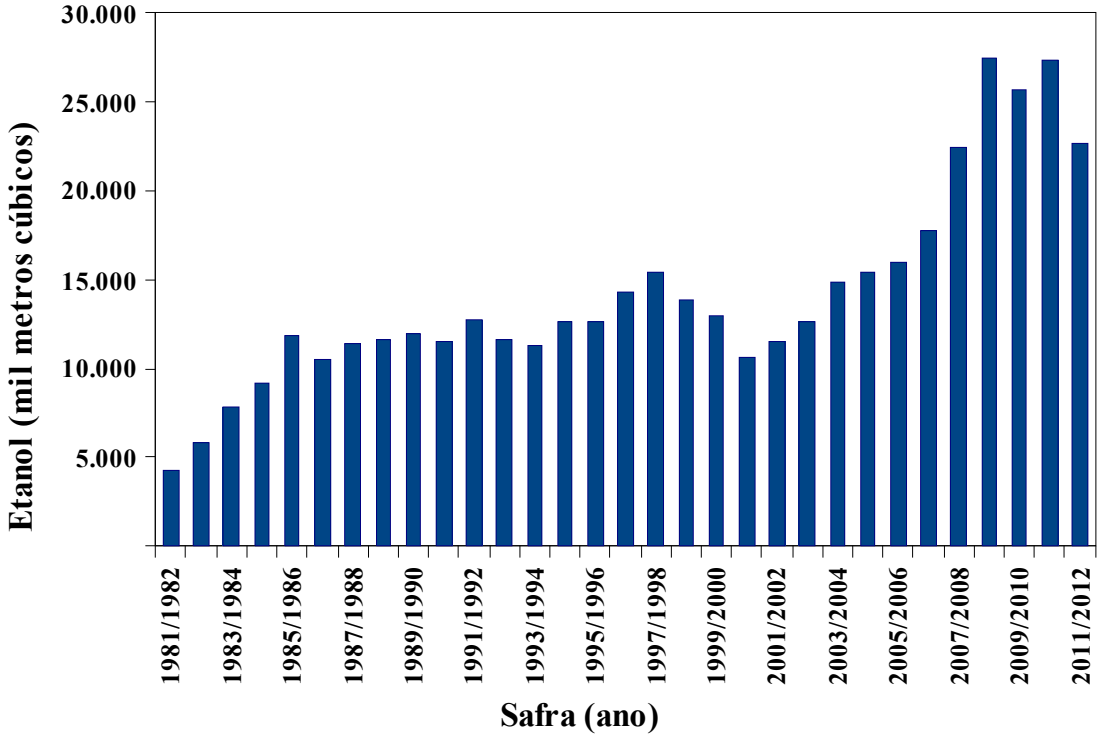


Figura 2.2 – Estatística da produção de etanol total (anidro + hidratado) no Brasil em mil metros cúbicos nas safras 1980/1981 – 2011/2012.
Fonte: União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA), ALCOPAR, BIOSUL, SIAMIG, SINDALCOOL, SIFAEG, SINDAAF e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) - http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=31&tipoHistorico=2 - Acessado em 10 Ago 2012 as 23h00min

Neste contexto, face aos aspectos econômicos e ambientais, para satisfazer a forte necessidade de produção de etanol com eficiência, com baixo custo das matérias-primas e também com baixo consumo de energia, várias técnicas têm sido empregadas, tais como: a utilização de cepas com capacidade de produção eficiente de etanol ou hábeis à co-fermentação de pentoses/hexoses, processos com células imobilizadas com/sem transportadores, processos com reciclo celular através de sedimentação ou por retenção em membrana (Tao et al., 2005).

A crise do petróleo nos anos 70 motivou o governo brasileiro a desenvolver uma forma alternativa de substituir a gasolina. Nasceu então o bioetanol, um combustível obtido a partir da fermentação do caldo da cana-de-açúcar, melaço ou ambos. Existem relatos da produção de açúcar no Brasil que datam de 1532, quando os portugueses trouxeram as primeiras mudas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarun* – cepa original) originária da Índia. Neste cenário, o Brasil se insere com destacada projeção desde a criação do PROÁLCOOL (Programa Nacional do Álcool) em 1973 como alternativa viável frente à crise energética existente.

Assim, o Brasil, que sempre se destacou como produtor de açúcar, passa a ocupar lugar de evidência como o primeiro país a produzir e fazer uso de um biocombustível em 80-85% de sua frota automotiva, sendo esta estatística corroborada pela análise dos dados referentes à quantidade de veículos licenciados no período de 1982 a 1988 na Tabela 2.1. Incentivos foram oferecidos aos investidores do setor e novas unidades que produziam exclusivamente etanol foram implantadas (Andrietta et al., 2006).

Ernandes e Garcia-Cruz (2009) complementam as informações com relação ao Proálcool, relatando que o Brasil foi o primeiro país a adotar a bioenergia em larga escala com a implantação do Programa Nacional do Álcool pelo Decreto nº 76.593 do Governo Federal, em 14 de novembro de 1975.

O programa PROÁLCOOL como estratégia de abastecimento energético fracassou nos anos 80, mas o conhecimento acumulado e as unidades instaladas persistiram (Andrietta et al., 2006).

Desta forma, a indústria de bioetanol tem-se desenvolvido rapidamente nos últimos anos para lidar, novamente, com o esgotamento dos combustíveis fósseis. A utilização de amido comestível, tal como o oriundo de milho, para a produção de bioetanol tem provocado uma pressão indevida sobre o abastecimento alimentar mundial (Katz, 2008; Tenenbaum, 2008).

Nos dias de hoje, a fermentação exclusiva do caldo de cana não é uma prática observada nas unidades industriais brasileiras. Atualmente, as denominadas destilarias autônomas, migraram para usinas produtoras de açúcar e, além de fermentarem o caldo da cana-de-açúcar, processam também o que é obtido como subproduto da cristalização da sacarose do caldo, isto é, o melaço. Trata-se do produto ideal para a fermentação, uma vez que, além de conter em média 90% de Brix, sendo 60% de açúcares redutores. (Andrietta et al., 2006).

Assim, materiais impróprios para consumo humano são considerados substratos ideais para a produção de bioetanol, por exemplo, a biomassa lignocelulósica. Uma completa e eficiente conversão de hexose, pentoses e açúcares componentes de hidrolisados lignocelulósicos ao etanol é uma condição prévia para a maximização da rentabilidade de um processo industrial de produção de bioetanol (Krishnan et al., 2000; van Maris et al., 2006).

Neste contexto surge a designação de etanol de segunda geração, o qual é produzido a partir de materiais lignocelulósicos presente, por exemplo, nos resíduos do bagaço e palha de cana-de-açúcar. Essa tecnologia é uma alternativa fundamental para produzir o combustível renovável e sem prejudicar a produção de alimentos.

O novo conceito de etanol combustível focaliza a sua produção utilizando matérias-primas de composição lignocelulósica, em particular as denominadas biomassas residuais,

provenientes de atividades agrícolas, agro-industriais e florestais. A tecnologia de produção de etanol com base na biomassa lignocelulósica utiliza processos químicos e enzimáticos para a hidrólise das moléculas de celulose, que gera carboidratos, que serão então fermentados a etanol (Santos et al., 2009).

Além dos processos de hidrólise, as pesquisas em etanol têm sido orientadas, também, para o processo de sacarificação e fermentação alcoólica simultâneas (SSF), que combina em uma só etapa a hidrólise enzimática e a fermentação alcoólica da glicose oriunda da hidrólise da celulose (Pereira Jr., 2008).

Segundo Fu et al. (2009), glicose e xilose são dois açúcares dominantes nos hidrolisados de lignocelulósicos. A principal dificuldade da utilização de dois micro-organismos para a cofermentação destes dois açúcares é a incapacidade de fornecer ótimas condições ambientais para as duas linhagens simultaneamente. A maioria dos estudos anteriores sobre cepas de coculturas relata que a fermentação da glicose na mistura de açúcares avançou eficientemente com uma linhagem tradicional, contudo a fermentação da xilose foi frequentemente lenta e de baixa eficiência. Estes autores ainda consideram ser este fato é explicado devido ao conflito de necessidade de oxigênio entre as duas estirpes e/ou à repressão catabólica na assimilação da xilose causada pela glicose. Abordagens em ambos - engenharia de processos e engenharia de linhagem, têm sido realizados para contornar essas dificuldades e melhorar a eficiência do sistema. Exemplos de engenharia de processo incluem cultura contínua, a imobilização de uma das cepas, coimobilização de duas linhagens, dois estágios de fermentação em um biorreator (isto é, cultura sequencial) e fermentação separada em dois bioreatores.

2.1.2 Matéria-prima: substrato

Os principais substratos para a produção de álcool por fermentação microbiana são provenientes de matérias-primas sacaríneas (ex: cana-de-açúcar e beterraba), amiláceas (ex: cereais como milho, trigo, sorgo e cevada; raízes como batata) e celulísicas (ex: madeira, resíduos agrícolas, papel de jornal, resíduo sólido municipal, etc.) (Glazer e Nikaido, 2007). Nestas matérias-primas os carboidratos estão em forma que requerem um pré-tratamento para disponibilizar prontamente os açúcares na forma fermentescível para os micro-organismos.

Sacarose (glicose-α-1,2-frutose) é o mais comum adoçante utilizado para consumo humano. A cana-de-açúcar e o açúcar de beterraba contêm até 20% de sacarose em peso, sendo os outros principais componentes a água (cerca de 75%), a celulose (5%) e sais inorgânicos (cerca de 1%). Para processá-la a levedura produz a enzima invertase – nas

formas citoplasmática e secretada (permanecendo aderida à parede celular), que hidrolisa a sacarose gerando glicose e frutose disponíveis para a fermentação (Glazer e Nikaido, 2007).

Nos Estados Unidos o milho é a principal matéria-prima para a produção de álcool combustível. Sua composição consiste em uma fração solúvel em água - amilose (20%), e uma fração de maior massa molecular insolúvel em água - amilopectina (80%). Para obter o açúcar fermentável a partir do amido de milho, este é moído, dissolvido em água e aquecido, tornando-o vulnerável a hidrólise enzimática pela termostável α-amilase. Na seqüência, a sacarificação é catalisada pela glicoamilase - hidrólise dos polímeros de amido em glicose (Glazer e Nikaido, 2007).

Coelho et al. (2008) relataram o emprego de materiais lignocelulósicos para a produção de etanol, destacando como principais exemplos a cana-de-açúcar - juntamente com seus resíduos (bagaço e palha), e alguns resíduos celulósicos como sabugo de milho e palha de arroz e de trigo. Segundo os autores, estes materiais têm como componente mais abundante a celulose (40-60% da massa seca), tendo também a hemicelulose (20-40%) e a lignina (10-25%). Os compostos lignocelulósicos requerem pré-tratamento para tornar a celulose acessível à ação das enzimas hidrolíticas e, dessa forma, começarem a romper, pelo menos em parte, a estrutura demasiadamente cristalina das fibras da celulose. Dentre os inúmeros processos de pré-tratamento citados na literatura, tem-se a hidrólise ácida (empregando H_2SO_4, HNO_3 e HCl diluídos), a hidrólise alcalina (para remoção total da lignina e parcial da hemicelulose utilizando NaOH e KOH), a "explosão a vapor" (injeção de vapor à pressão de 20-50 bar na temperatura de 210-290ºC, seguida de repentina descompressão) e a biodeslignificação (utilização de fungos e/ou lignina peroxidase para remoção da lignina).

2.1.4 Micro-organismos: matérias-primas e processos

Estando as matérias-primas pré-tratadas conforme a necessidade específica de cada caso, os açúcares simples obtidos são empregados como substrato nas fermentações microbianas para produzir etanol.

Muitas leveduras, mas poucas bactérias, realizam significativa conversão de glicose em álcool (Glazer e Nikaido, 2007). A Tabela 2.2 relaciona algumas leveduras e bactérias que produzem significante quantidade de etanol e a maioria dos carboidratos utilizados como substrato.

Para a utilização de cepas em engenharia, têm sido empregados mutantes com deficiência respiratória de *Saccharomyces cerevisiae*, de *Saccharomyces diastaticus* e uma

mutante de *Pichia stipitis* mostrando restrita repressão catabólica por glicose. Além das leveduras, uma cepa etanologênica geneticamente modificada de *Escherichia coli* também foi incluída no estudo (Fu et al., 2009).

Tabela 2.2 – Alguns micro-organismos produtores significativos de etanol e a maioria dos carboidratos utilizados como substratos. Adaptado de Glazer e Nikaido, 2007

Leveduras ou Bactérias	Substratos
Levedura	-
Saccharomyces spp.	-
S. cerevisiae	Glicose, frutose, galactose, maltose, maltotriose, xilulose
S. carlsbergensis	Glicose, frutose, galactose, maltose, maltotriose, xilulose
S. rouxii (osmofílica)	Glicose, frutose, maltose, sacarose
Kluyveromyces spp.	-
K. fragilis	Glicose, galactose, lactose
K. lactis	Glicose, galactose, lactose
Candida spp.	-
C. pseudotropicalis	Glicose, galactose, lactose
C. tropicalis	Glicose, xilose, xilulose
Bactérias	-
Zymomonas mobilis	Glicose, frutose, sacarose
Clostridium spp.	-
Clostridium thermocellum (termofílico)	Glicose, celobiose, celulose
Clostridium thermohydrosulfuricum (termofílico)	Glicose, xilose, sacarose, celobiose, amido
Thermoanaerobium brockii (termofílico)	Glicose, sacarose, maltose, lactose, celobiose, amido
Thermobacterioides acetoethylicus (termofílico)	Glicose, sacarose, celobiose

Fu et al. (2009) consideraram uma eficiente conversão de glicose e de xilose como um requisito para um processo proveitoso na produção de bioetanol a partir de lignocelulose. Considerando as abordagens disponíveis para esta conversão, definiram a cocultura como um processo simples, empregando dois organismos diferentes para a fermentação dos dois açúcares. Estes autores relataram resultados promissores quando foram utilizadas coculturas de mutante anaeróbica de *Saccharomyces cerevisiae* com *Pichia stipitis*, de coimobilizado de *Saccharomyces cerevisiae* com *Pichia stipitis*, de *Saccharomyces cerevisiae* com

recombinante *Escherichia coli* e uma cultura sequencial de *Zymomonas mobilis* e *Pachysolen tannophilus*.

2.1.4.1 Leveduras

Segundo Andrietta et al. (2006) e Glazer e Nikaido (2007), *Saccharomyces* é o gênero de levedura largamente utilizada na indústria produtora de fermentados que tem como produto final o álcool, seja para uso carburante ou para obtenção de bebidas alcoólicas. Para o primeiro grupo de autores, os fatores que consagram esse gênero de levedura como o mais indicado para esse fim estão relacionados aos atributos desejados para a condução de um processo de produção de álcool, quais sejam: (a) transformar rapidamente açúcares em etanol; (b) alta tolerância ao produto formado; (c) tolerância osmótica; (d) tolerância a grandes variações de temperatura; (e) atividade celular em ambiente ácido. Contudo, para Glazer e Nikaido (2007), apesar das leveduras terem muitos atributos para um produtor ideal de etanol, apresentam limitações significativas dentre as quais destacam um restrito grupo de substrato para uso e uma limitada tolerância ao álcool, destoando em parte da visão apresentada por Andrietta et al. (2006).

Mais adiante Glazer e Nikaido (2007) ampliam de forma geral as especificações para um produtor ideal de álcool via fermentação: (a) capacidade para fermentar rapidamente uma ampla gama de substratos originários de carboidratos; (b) tolerância ao etanol; (c) tolerância à temperatura; (d) capacidade de produzir altas concentrações de etanol; (e) gerar baixos níveis de subprodutos, tais como ácidos e glicerol; (f) tolerância osmótica - capacidade para suportar as altas pressões osmóticas encontradas em altas concentrações de açúcar utilizado como substrato; (g) alta viabilidade celular para repetidas reciclagens; (h) características de floculação e de sedimentação adequadas para facilitar a reciclagem de células. Por fim, estes autores concluíram que estirpes de *Saccharomyces* satisfazem bem as especificações para constituírem-se em bom produtor de etanol quando comparadas com quaisquer outros organismos conhecidos para a mesma atividade. Destacaram existir apenas dois outros bons produtores de etanol, os quais têm atraído grande atenção: *Zymomonas mobilis* e certas espécies de *Clostridium* termófilos.

Até meados de 1990, a maioria das unidades produtoras de etanol tradicionalmente iniciava a produção da nova safra com toneladas de levedura oriunda da indústria de panificação. Essa estratégia permitia uma partida rápida e mais segura, minimizando possíveis problemas de acidentes fermentativos. A posterior, no entanto, constatou-se que as leveduras

utilizadas como inóculo eram completamente substituídas por leveduras nativas da região produtora ainda no inicio da safra. Verificou-se, ainda, que a única levedura que tinha a capacidade de permanecer durante todo o processo era a isolada da mesma unidade em safras anteriores. Desde então, as usinas começaram a propagar as próprias leveduras para a partida do processo no início da safra (Andrietta et al., 2006; Porto, 2005).

Linhagens de *Saccharomyces* são responsáveis por quase toda a atual produção industrial de álcool via fermentativa. Estas cepas convertem glicose pela via glicolítica de Embden-Meyerhoff, obtendo alto rendimento de etanol e formando dióxido de carbono. A rota metabólica de Embden-Meyerhoff é mostrada na Figura 2.3. Como pode ser observado, apenas um rendimento líquido de dois ATPs é gerado por mol de glicose metabolizada, sendo utilizados para crescimento celular. O etanol produzido é recuperado em 90% a 95% do rendimento teórico, o qual é de 51,1% por peso, conforme equação estabelecida por Gay-Lussac em 1810 para conversão fermentativa de glicose a etanol por levedura (Glazer e Nikaido, 2007):

$$\underset{180g}{C_6H_{12}O_6} \longrightarrow \underset{92g}{2C_2H_5OH} + \underset{88g}{2CO_2} \tag{2.1}$$

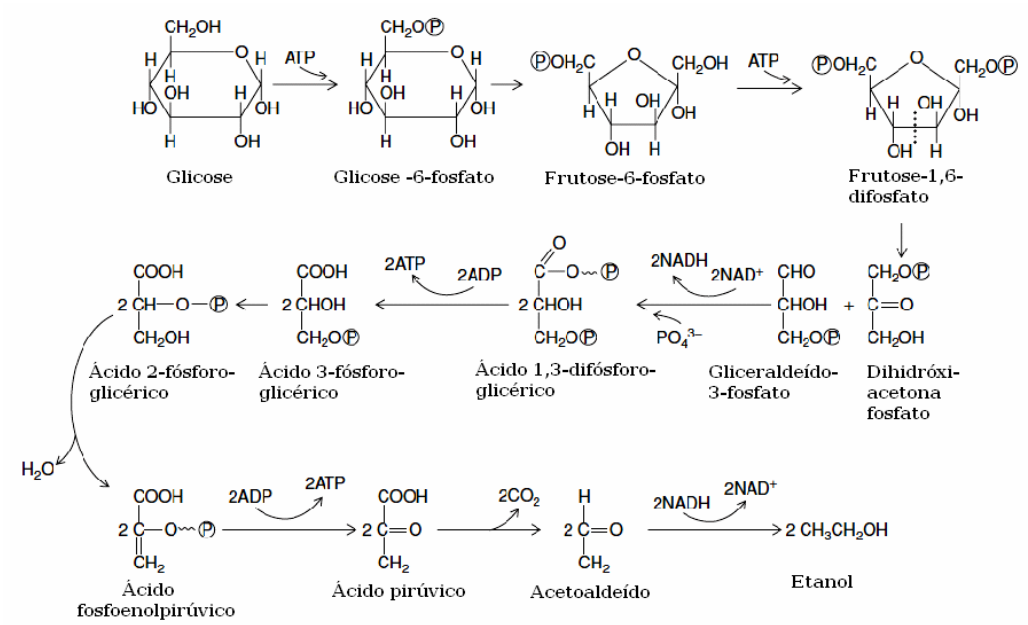


Figura 2.3 – Formação de etanol e CO_2 a partir de glicose pela rota metabólica de Embden-Meyerhoff-Parnass. Adaptado de Glazer e Nikaido (2007)

Não obstante, o maior obstáculo ao emprego das leveduras como agente fermentativo é a limitada gama de substratos que podem processar (ver Tabela 2.2). Leveduras não fermentam a maioria dos oligossacarídeos formados durante a hidrólise do amido, que incluem, por exemplo, maltodextrinas mais longas que a maltotriose e a isomaltose (ligações α-1,6 entre dímeros de glicose). Assim sendo, requerem a adição de glucoamilases para a completa utilização do amido. Associada à limitação supracitada, células de levedura também não degradam celulose, hemicelulose, celobiose e a maioria das pentoses. Essa limitação em fermentar uma diversidade de substratos baratos e disponíveis é o principal obstáculo enfrentado nas tentativas de reduzir o custo da produção de álcool. Isto posto, a busca de formas para ampliar o espectro de substratos transformados por leveduras é um importante foco de pesquisa para otimizar o processo produtivo de etanol (Glazer e Nikaido, 2007).

Nesse esforço de otimização e melhoria da produção de etanol, o gênero bacteriano *Zymomonas* surge como uma alternativa atraente à atual demanda mundial por combustível. Segundo Santos et al. (2009), quando comparada com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, revela alto grau de produtividade específica, elevada tolerância ao etanol e menor produção de biomassa. Assim, Daugulis et al. (1997) cita que nos últimos 15 anos *Zymomonas mobilis* tem se mostrado como um micro-organismo promissor para produção industrial de etanol, devido também às suas características cinéticas e de produtividade superiores quando comparadas com estas mesmas características em leveduras. Não obstante, Ernandes e Garcia-Cruz (2009) destacam que apesar das citadas vantagens apresentadas por *Zymomonas mobilis* perante as leveduras o rendimento fermentativo diminui quando se utiliza sacarose como carboidrato para a fermentação devido, segundo alguns autores, à formação de subprodutos como levana e sorbitol.

2.1.4.2 Bactérias *Zymomonas mobilis*

2.1.4.2.1 Aspectos gerais

A síntese de etanol é convencionalmente realizada por leveduras, porém o gênero bacteriano *Zymomonas* tem capacidade para esta produção, sendo uma alternativa atraente à atual demanda mundial por combustível.

Ernandes e Garcia-Cruz (2009) descrevem as bactérias *Zymomonas mobilis* sendo Gram-negativa, não formadora de esporos e móvel, anaeróbia facultativa, sendo que, algumas linhagens são obrigatoriamente anaeróbias. Morfologicamente, apresenta-se na forma de

bastonete curto e grosso medindo de 2-6 μm de comprimento e 1-1,4 μm de largura. Quando apresenta mobilidade, possui de um a quatro flagelos polares. São encontradas geralmente em pares, embora também apareçam isoladas. Possuem rotas catabólicas comparativamente simples e não tem a variedade de alternativas metabólicas encontradas em outros micro-organismos. De forma a gerar energia suficiente para o crescimento, as bactérias *Zymomonas mobilis* devem promover o catabolismo dos substratos com alta taxa específica, resultando em baixos rendimentos de biomassa, pois a maior parte deste substrato é incorporado no catabolismo do produto final, o etanol (Toma et al., 2003).

A cepa de *Zymomonas mobilis* consome glicose e produz etanol cerca de três a quatro vezes mais rapidamente do que levedura. Alcança rendimento de formação de etanol até 97% do valor teórico máximo (Ver Equação 2.1). Além disso, ao contrário do fermento de panificação, *Zymomonas* não requerem oxigênio para o crescimento. Outra característica é a capacidade de se reproduzir em meio mínimo, sem exigência de compostos não orgânicos, e muitas cepas podem crescer a 38-40ºC. Outro ponto considerado é a sua elevada tolerância osmótica ao substrato - a maioria das cepas cresce em soluções contendo 40% em peso de glicose, e ao etanol - podem chegar ao rendimento em fermentações de até 13% de álcool por volume a 30ºC, condição na qual poucas bactérias têm capacidade de sobreviver (Glazer e Nikaido, 2007; Sprenger, 1996; Ernandes e Gracia-Cruz, 2009).

Zymomonas mobilis tem despertado grande interesse nos últimos anos para a produção de etanol, porque atinge rendimento próximo ao teórico a partir da glicose e frutose. Comparado com leveduras industriais, *Zymomonas mobilis* pode produzir etanol com taxas específicas de consumo de glicose e de produção de etanol mais elevadas (Tao et al., 2005). Nessa mesma linha comparativa, Kannan et al. (1998 *apud* Santos et al., 2009) corroboraram a constatação de maior eficiência na produção de etanol nos processos catalisados por *Zymomonas mobilis*.

Rogers et al. (1982 *apud* Daugulis et al., 1997), mais especificamente, atribuíram às bactérias *Zymomonas mobilis* maior destaque por exibir uma superior taxa específica de consumo de substrato, associada à maior produção e ao maior rendimento de etanol.

As bactérias *Zymomonas mobilis* utilizam sacarose, glicose e frutose como fonte de carbono e energia, produzindo quantidades equimolares de etanol e CO_2 (Swings e Deley, 1977 *apud* Santos et al., 2009; Glazer e Nikaido, 2007). Estas bactérias fermentam os açúcares pela via de Entner-Doudoroff sob condições anaeróbicas, onde a glicose produz 2 moles de etanol e 1 mol de ATP, ao contrário da via de Embden-Meyerhoff-Parnass, na qual

são geradas 2 moléculas de ATP para cada mol de glicose consumida (Wen-Chien et al., 2000; Santos et al., 2009; Ernandes e Garcia-Cruz, 2009).

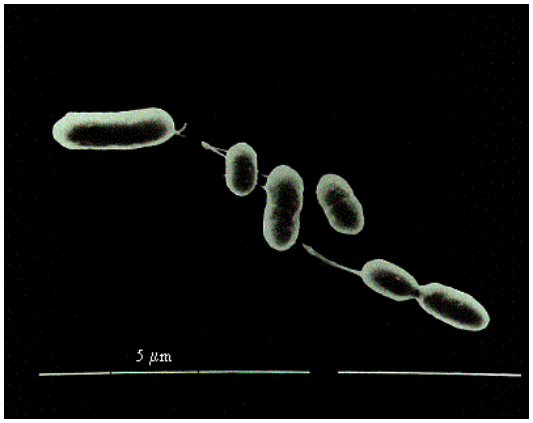
Na rota de Entner-Doudoroff a produção de energia a partir do catabolismo da glicose é um caminho ineficiente por gerar uma molécula de ATP por molécula de glicose consumida. Esta incapacidade é compensada pela habilidade das bactérias em metabolizarem a glicose em alta taxa (Parker et al., 1997 *apud* Pinheiro et al., 2005; Glazer e Nikaido, 2007).

Camêlo (2009) investigou o perfil protéico das bactérias *Zymomonas mobilis* nas diferentes condições dinâmicas em processo contínuo de fermentação alcoólica empregando eletroforese em gel SDS-PAGE. Desta forma, a autora verificou, a correlação das bandas das enzimas participantes da rota bioquímica proposta por Entner-Doudoroff.

No contexto da produção de etanol combustível de segunda geração, Santos et al. (2009) avaliaram preliminarmente a produção a partir do bagaço de cana-de-açúcar pelas bactérias *Zymomonas mobilis* linhagem CP4, empregando a tecnologia de Sacarificação e Fermentação Alcoólica Simultâneas (SSF - *Simultaneous Saccharification and Fermentation*). Assim, levaram a termo as fermentações em frascos cônicos e em biorreatores, alcançando 42 g L^{-1} de etanol.

Foto de *Zymomonas mobilis* CP4 em processo produtivo de etanol - agitado com borbulhas de CO_2, e microscopia da cepa Ag11 das bactérias são apresentadas na Figura 2.4.

(a) Fonte: http://www.jgi.doe.gov/sequencing/why/100311.html
Acessado em 15 Ago 2009 as 23h30min



(b) Palha et al. (2002 *apud* Camêlo, 2009)

Figura 2.4 – *Zymomonas mobilis*. (a) Foto da cepa industrial CP4 em fermentação de etanol, tendo glicose como substrato e agitação realizada borbulhando CO_2. (b) Microscopia das bactérias *Z. mobilis* Ag11

Frente à necessidade de otimização do processo de produção de etanol, Tao et al. (2005) relataram que a produção de etanol sob condição não esterilizada ganhou a atenção de muitos pesquisadores. Isto porque pode diminuir em 30-40% o consumo da energia gasta nas etapas de cozimento do amido e de esterilização. Focados nessa necessidade, a partir da *Zymomonas*

mobilis ATCC 31821, os autores obtiveram a cepa mutante ácido-tolerante *Zymomonas mobilis* NS-7, a qual pode iniciar a fermentação em pH abaixo de 4,5, tendo glicose como substrato. Nessas condições de pH há a predominância da cepa ácido-tolerante de *Z. mobilis*. Assim, a fermentação alcoólica pode ser conduzida sob condições não esterilizadas sem a contaminação potencial e sem a diminuição do rendimento causado pelo baixo pH, conforme observado na comparação da Tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Comparação da variação das concentrações dos processos autoclavados e não autoclavados. Dados obtidos de Tao et al. (2005)

Descrição	**Processo**		**Obs**
	Autoclavado	**Não autoclavado**	**Do autoclavado para o não autoclavado**
Concentração de etanol (g L^{-1})	70,3	73,2	Aumenta 4,12%
Concentração de açúcar residual (g L^{-1})	5,3	1,3	Diminui 75,47%
Rendimento teórico do processo (g_{etanol} $g_{glicose}^{-1}$)	0,468	0,488	Aumenta 4,27%

Lee e Huang (1995) observaram que a produção de etanol por *Zymomonas mobilis* é substancialmente reduzida quando a glicose é substituída por sacarose como substrato, pois nesta condição há a formação de levana e de sorbiol, devido ao acúmulo de monossacarídeos produzidos pela enzima levanasacarase sintetizada pela célula. Para contornar esta restrição operacional, os autores trabalharam com *Zymomonas mobilis* ATCC10988 em processos em batelada e contínuo para produção de etanol, adicionando invertase imobilizada ao meio para promover a rápida hidrólise da sacarose em glicose e frutose conseguindo, desta forma, reduzir a excreção da biomolécula levanasacarase pela célula no meio de cultivo. Assim, a capacidade da *Zymomonas mobilis* em hidrolisar sacarose foi retardada, com a consequente redução da formação de levana e de sorbitol.

Daugulis et al. (1997) relataram ter sido demonstrado por Li et al. (1995) que o efeito inibitório histórico da concentração de etanol (etanol produzido no processo fermentativo) era insignificante, enquanto o efeito de inibição provocado por uma taxa ascendente de variação na concentração de etanol (etanol exógeno adicionado ao processo) era bastante intenso. Os autores observaram ainda que as células são incapazes de responder instantaneamente às mudanças no seu ambiente.

2.1.4.2.2 Metabolismo: rota de Entner-Doudoroff

Como já discutido anteriormente, as bactérias *Zymomonas* podem utilizar apenas três carboidratos: glicose, frutose e sacarose. O metabolismo de cada um destes açúcares tem

características distintas, sendo as vias do metabolismo desses carboidratos mostradas na Figura 2.5.

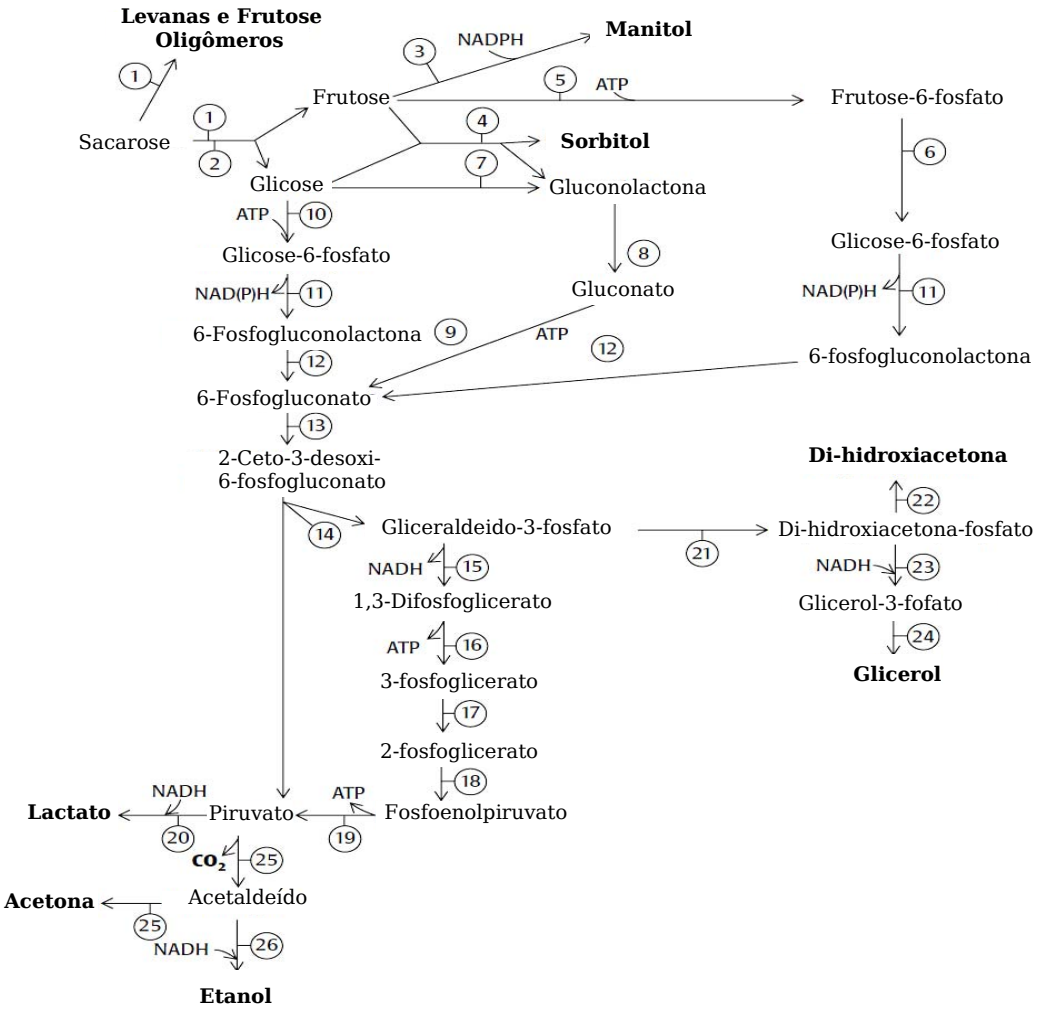


Figura 2.5 – Metabolismo de sacarose, glicose e frutose por *Zymomonas mobilis*. Enzimas (indicadas pelos números circulados): 1. levanasacrase; 2. invertase; 3. manitol desidrogenase; 4. glicose-frutose oxidorredutase; 5. frutoquinase; 6. glicose-6-fosfato isomerase; 7. glicose desidrogenase; 8. gliconolactonase; 9. gliconato quinase; 10. glicoquinase; 11. glicose-6-fosfato desidrogenase; 12. 6-fosfogliconolactonase; 13. 6-fosfogliconato desidratase; 14. ceto-dioxi-fosfogliconato aldolase; 15. gliceraldeido 3- fosfato desidrogenase; 16. fosfoglicerato quinase; 17. fosfoglicerato mutase; 18. enolase; 19. piruvato quinase; 20. lactato desidrogenase; 21. triose-fosfato isomerase; 22. fosfatase; 23. glicerol 3-fosfato desidrogenase; 24. fosfatase; 25. piruvato descarboxilase; 26. álcool desidrogenase. Adaptado de Glazer e Nikaido (2007)

A Figura 2.6 ilustra o catabolismo de glicose a etanol por *Zymomonas mobilis* via rota metabólica de Entner-Doudoroff.

Na Figura 2.6 pode ser visualizada cada etapa da rota da fermentação alcoólica de Entner-Doudoroff, incluindo o desvio de via do 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato para a etapa direcionada a oxidação pela rota de Embden-Meyerhoff.

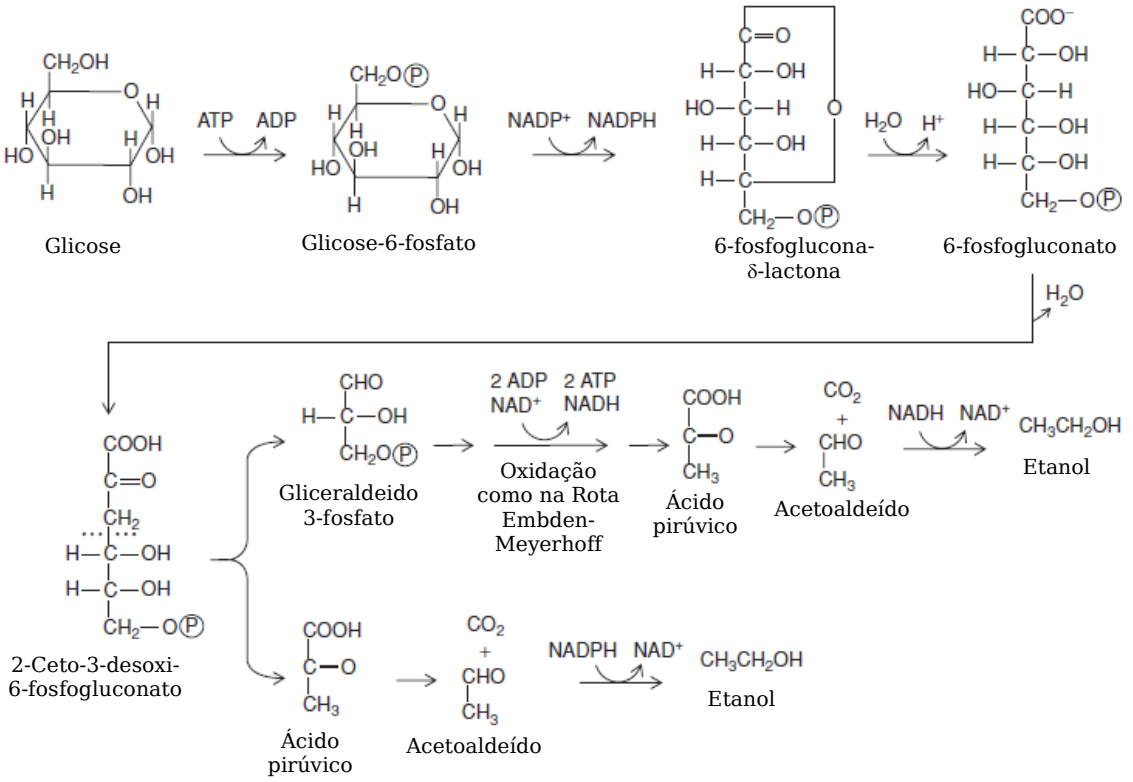


Figura 2.6 – Formação de etanol a partir de glicose por *Zymomonas mobilis* em fermentação via Entner-Doudoroff. Adaptado de Glazer e Nikaido (2007)

2.1.4.2.3 Comportamento oscilatório em *Zymomonas mobilis*

Apesar de sua promissora adequação ao processo, uma desvantagem associada à fermentação contínua empregando *Zymomonas mobilis* é a ocorrência de oscilações peculiares na concentração de substrato, na concentração celular e na concentração de produto sob certas condições de processo (Bruce et al., 1991; Gommidh et al., 1989; Jöbses et al., 1986; Lee et al., 1980; Daugulis et al., 1997). Jones e Kompala (1999) também identificaram oscilações nas variáveis de processo na fermentação alcoólica quando se empregou *Saccharomyces cerevisae*.

Daugulis et al. (1997) constataram que o comportamento oscilatório significava a existência de períodos de tempo durante os quais ocorria decréscimo na produtividade de etanol e, por conseguinte, um alto nível de resíduo de substrato. Isto implicava em uma alta perda de substrato, o que é circunstância inaceitável para as condições de processo.

Segundo Pinheiro et al. (2005) muitos relatos de comportamentos oscilatórios em fermentação contínua podem ser encontrados na literatura. Destacam que a maior parte do fenômeno oscilatório está associada com *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis*.

Ainda segundo os autores, o modelo matemático mais aceito foi o proposto por Li et al. (1995 *apud* Pinheiro et al., 2005). Usando o modelo desenvolvido por Li et al. (1995), os autores elaboraram diagramas de bifurcação para definir as condições de operação nas quais ocorriam comportamentos oscilatórios no processo de produção de etanol por *Zymomonas mobilis* fermentando glicose. O grupo de trabalho utilizou o programa computacional AUTO97 (Doedel et al., 1997) para obter os diagramas de bifurcações, sendo a taxa de diluição o parâmetro de bifurcação selecionado. Assim, concluíram que a fermentação em meio contendo 200 g L^{-1} de glicose apresentou oscilações quando a taxa de diluição variou entre 0,0357 - 0,115 h^{-1}.

Em 2008, Patnaik também reportou que muitos sistemas microbianos exibem comportamento oscilatório em condições realistas, no entanto, essas culturas com oscilações recebem menor atenção face aos sistemas monotônicos. Neste contexto, cita o perfil oscilatório de bactérias e leveduras em culturas operadas em modo contínuo.

Em seu trabalho Camêlo (2009) evidenciou comportamentos dinâmicos complexos em fermentações contínuas com *Zymomonas mobilis*, estudando o efeito do aumento da concentração de glicose e etanol no aparecimento de oscilações.

2.2 MODELAGEM MATEMÁTICA DE BIOPROCESSOS

Frente ao quadro da existência de comportamento oscilatório em processos, o desenvolvimento de modelos matemáticos apropriados que possibilitem a simulação, otimização e implementação de malhas de controle é altamente desejável.

Além disso, sistemas de fermentação são altamente sensíveis às mudanças anormais em condições operacionais. Para assegurar que o máximo rendimento possível de produto seja obtido é necessário garantir que as condições dentro do fermentador permaneçam essencialmente programadas ao redor de uma trajetória pré-especificada. Em muitos sistemas de fermentação industrial, operadores de processo usam sua experiência e conhecimento do processo fermentativo para detectar potenciais problemas e fazer modificações quando necessário. No entanto, a importância do controle eficaz não pode ser subestimada porque o desempenho de uma fermentação é muito dependente da capacidade de manter o sistema operando suavemente. Uma fermentação livre de maiores transtornos é seguramente mais produtiva que uma sujeita a perturbações significativas. Então, quanto mais cedo um potencial problema para o sistema puder ser detectado, menos severa será sua influência no processo e a

ação corretiva resultante será mais comedida (Lennox et al., 2000; Montague e Lennox, 2000; Venkatasubramanian et al., 2003). Assim sendo, o contínuo aumento da complexidade, eficiência e confiabilidade dos modernos sistemas industriais necessita de um constante desenvolvimento no monitoramento e controle do processo.

Por conseguinte, na visão de Freire et al. (1999), modelos matemáticos são importantes ferramentas para a otimização e controle de processos biotecnológicos. Nesse viés, pode-se afirmar ser irrefutável a necessidade de desenvolvimento e de estudo de modelos matemáticos apropriados que possibilitem maior compreensão e melhorias do processo por simulação, de otimização e implementação de malhas de controle em bioprocessos. Adicionalmente, tais modelos podem ser usados em esquemas de monitoramento e diagnósticos de processos, podendo ser executados enquanto os processos são conduzidos, permitindo a detecção precoce de comportamentos anormais.

2.2.1 Fundamentos básicos e classificação

2.2.1.1 Fundamentos básicos

Na etapa de modelagem matemática de processos, independente da área de concentração - química, biologia, físico-química, bioquímica, engenharia, psicologia e economia, busca-se a proposição de um conjunto de relações entre as variáveis capazes de representar de forma adequada, dentro da precisão requerida para cada caso em particular. Este conjunto de relações é chamado de modelo e, no caso específico da modelagem matemática, são constituídos por equações algébrico-diferenciais.

Schwaab e Pinto (2007) descreveram o modelo como sendo uma estrutura que tenta descrever de forma aproximada a realidade. Esta descrição aproximada é função da necessidade do modelo basear-se em um conjunto de observações experimentais, as quais são corrompidas por erros de medidas. Os erros de medidas também são designados como incertezas experimentais. Logo, na oportunidade da concepção do modelo, nem todas as variáveis podem ser controladas e/ou medidas precisamente durante os experimentos.

Um modelo matemático é um conjunto de relações entre as variáveis em um sistema em estudo e geralmente pode predizer as variáveis de saída e o estado do sistema a partir das variáveis de entrada. Estas relações são normalmente expressas na forma de equações matemáticas, mas também podem ser especificadas como expressões lógicas (ou relações de causa/efeito), as quais são usadas na operação de um processo. Assim, as equações de balanço

especificam como os materiais fluem dentro e fora do volume de controle e como são convertidos no interior deste volume. Essa conversão interna no volume de controle é representada pela equação de taxa (também chamada de expressões cinéticas) e, juntamente com o balanço de massa, especificam o modelo completo (Nielsen et al., 2003).

Segundo Gordillo (1996), a elaboração do modelo, juntamente com sua aplicação na simulação, reúne uma série de vantagens na hora de conhecer e melhorar o processo, tais como: (a) entender o comportamento do sistema, já que abrange as evoluções que seguem as diferentes variáveis, de modo a formular um modelo; (b) a exploração do modelo mediante simulação ajuda a planejar o experimento, já que em pouco tempo se pode obter uma visão de quais variáveis afetam o processo e, portanto, estabelecer o tempo de duração para atingir os objetivos propostos; (c) nesse sentido, a predição da evolução do processo permite detectar em que momento a operação vai mudar sua trajetória, de modo que se possa tomar decisões a tempo de corrigir e dirigir o processo para a produção ótima. O modelo, portanto, permite projetar estratégias de operação e controle; (d) finalmente, uma aplicação menos direta, contudo também útil, é a sua utilização didática, já que permite traçar diferentes situações do processo e, portanto, facilitar sua compreensão e estudo, o que de forma experimental seria muito mais difícil e demorado de se levar a termo.

Além disso, pode se acrescentar às considerações de Gordillo (1996) que a forma experimental para fins didáticos seria também mais dispendiosa quando comparada à aplicação de modelos.

Neste contexto, encontram-se na literatura diversos conceitos e classificações desta ferramenta imprescindível para o estudo desses processos.

A combinação do balanço de massa, incluindo as equações cinéticas de taxa e o modelo do reator, perfazem uma descrição matemática completa do processo fermentativo e esse modelo pode ser usado para simular como as variáveis de saída dependem do conjunto de variáveis de entrada. No entanto, projetar um modelo matemático envolve diversas etapas, dentre as quais a primeira e mais importante é a definição da complexidade do modelo. Para essa tarefa deve se definir o número de reações a serem consideradas no modelo e a estequiometria para essas reações (Nielsen et al., 2003).

A Figura 2.7 ilustra as etapas envolvidas na elaboração do modelo matemático.

A Figura 2.7 mostra que se as simulações empregando o modelo são consideradas estatisticamente representativas dos dados experimentais o modelo é aceitável. Caso contrário, se o ajuste não é significativo dentro do nível de significância estatística selecionado, mesmo para o conjunto de parâmetros estimado que propicia o melhor ajuste,

torna-se necessário revisar o modelo cinético e passar através do ciclo de modelagem novamente (Nielsen et al., 2003).

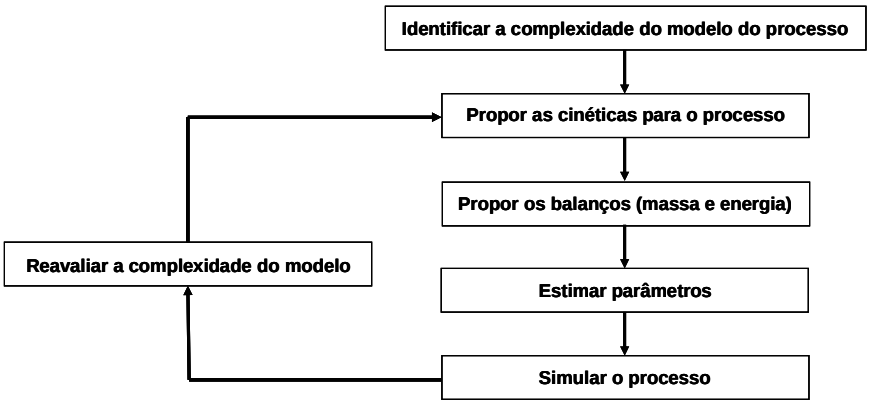


Figura 2.7 – Etapas para modelagem matemática de processos fermentativos. Adaptado de Nielsen et al. (2003)

Oportuno destacar que o balanço de energia também deve ser considerado na etapa de modelagem, muito embora não sejam tratados recorrentemente no estudo de processos fermentativos. Como exemplo, Nascimento (1983) verificou que o calor em fermentação alcoólica é removido pelo emprego de espargimento de água na superfície da dorna, utilização de serpentinas internas com circulação de água ou jaquetas externas e etc. Contudo a autora relatou não ter encontrado à época nenhum trabalho que abordasse as equações envolvidas nas taxas de calor liberado durante a fermentação e o calor trocado com os meios externos de aquecimento e resfriamento. Para este mesmo tipo de processo, Rivera et al. (2006) comentaram que mudanças nas condições operacionais são muito comuns devido a oscilações nas características da matéria-prima, à variação do micro-organismo dominante e de pequenos desvios de temperatura em função da característica exotérmica da fermentação alcoólica. Estas flutuações afetam a cinética e, por conseguinte, provocam perda de produtividade e de conversão, podendo deslocar o processo das condições ótimas de operação. Todavia, apesar de constatada a influência da temperatura nas condições reacionais, Rivera et al. (2006) verificaram a existência de poucos trabalhos na literatura científica abordando o efeito dessa variável nos parâmetros cinéticos e, dentre estes estudos, não havia a determinação da relação para descrever estes parâmetros em função da temperatura.

2.2.1.2 Classificação de modelos

Segundo Schwaab e Pinto (2007), o modelo pode ser apresentado de várias formas, a depender do propósito do pesquisador, das limitações das observações experimentais e da

complexidade do fenômeno a ser investigado. Algumas dessas formas são: **(a) Modelo Matemático** - propõe que as relações entre as diversas variáveis de um problema podem ser descritas de forma matemática precisa. Permitem fazer previsões quantitativas sobre o comportamento futuro do sistema em estudo; **(b) Modelo Conceitual** - estabelece vínculos qualitativos entre as várias variáveis do problema, sem necessariamente estabelecer vínculos matemáticos quantitativos precisos, dada a complexidade e/ou impossibilidade de mensuração das variáveis envolvidas no processo. Como exemplo podem ser citados: (b1) Ciências humanas: "Complexo de Édipo"; (b2) Engenharia: Princípio de Lavoisier – conservação da massa; Primeira Lei da Termodinâmica – conservação da energia; e Leis Fundamentais de Newton para o Movimento – conservação da quantidade de movimento; **(c) Modelo Físico: A Planta Piloto** – constitui-se em modelos físicos reais, quase sempre em escala muito inferior à escala dos sistemas estudados, utilizadas para fazer experimentação e estudos que podem ser vinculados ao comportamento dos sistemas reais de interesse. É empregada quando é inconveniente ou impossível realizar experimentos diretamente no sistema estudado, tendo em vista a possibilidade de testes experimentais mal-sucedidos resultarem em acidentes ou em desvios de metas de produção, como ocorre, por exemplo, em ambientes fabris e em ambientes naturais onde possam comprometer a saúde do ecossistema e resultar em catástrofes ambientais.

Dentre as formas descritas no parágrafo anterior, muitas vezes é conveniente a classificação dos modelos em grupos distintos conforme os conjuntos de ferramentas e técnicas matemáticas disponíveis para análise. Nesta acepção de classificação, a Figura 2.8 apresenta a proposta de esquema dos grupos recorrentes na literatura.

Em consonância com a classificação proposta na Figura 2.8, a seguir são apresentadas as diversas abordagens encontradas na literatura científica.

Para Himmelblau (1970), modelos são empregados em todos os campos, considerando ser provavelmente impossível incluir sob uma única definição as diversas conotações dos modelos existentes no mundo. No entanto, para o trabalho de descrição de processos, este autor se ateve aos modelos determinísticos, também chamados de modelos de elementos, e aos modelos estocásticos ou randômicos. Nos modelos determinísticos cada variável e cada parâmetro podem ser atribuídos a um número fixo definido ou a uma série de números fixos, para qualquer conjunto de condições dadas. Já nos modelos estocátiscos a incerteza é introduzida. Assim, neste último modelo, as variáveis ou parâmetros usados para descrever as relações entrada-saída do processo e a estrutura dos elementos não são precisamente conhecidos.

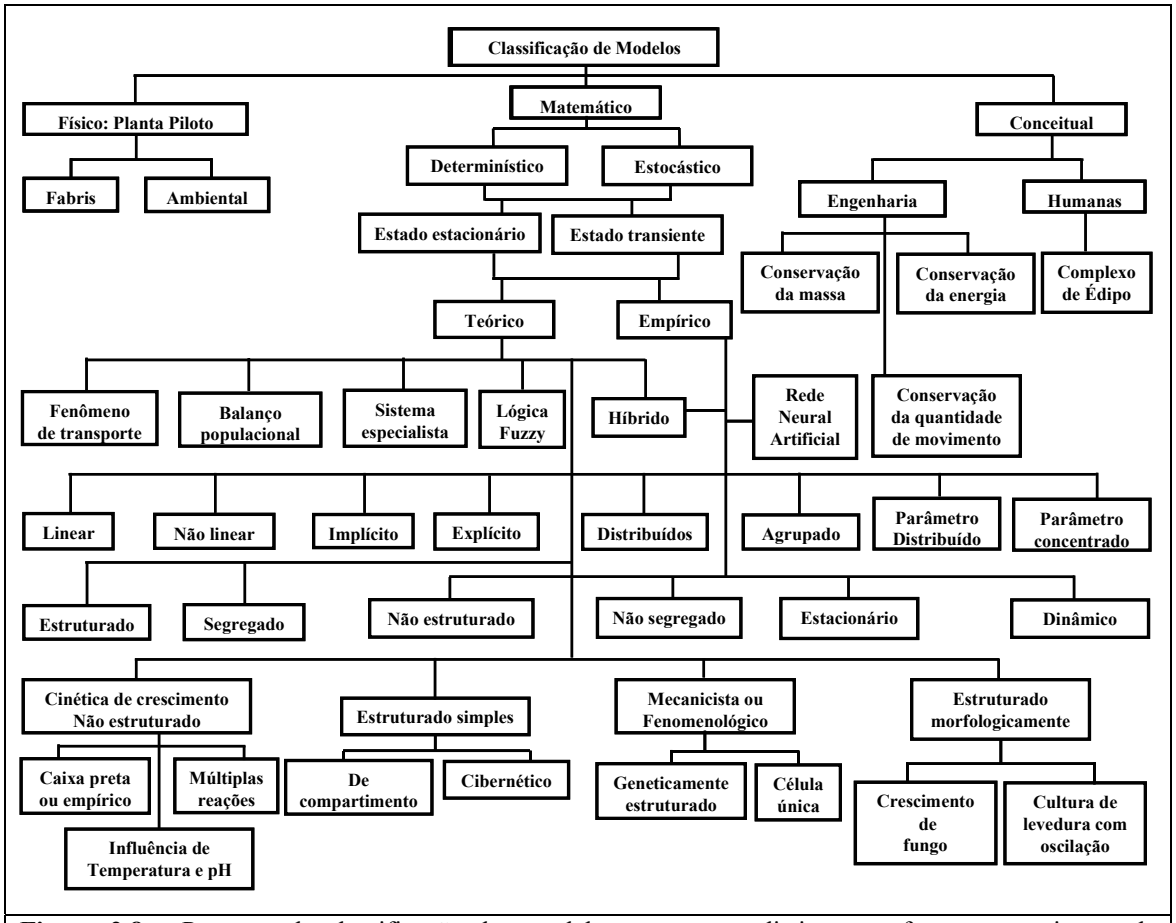


Figura 2.8 – Proposta de classificação dos modelos em grupos distintos conforme os conjuntos de ferramentas e técnicas matemáticas disponíveis na literatura (Boareto et al., 2011a)

Na abrangência dos modelos determinísticos e estocásticos, Himmelblau (1970) propôs que três tipos muito gerais de modelos podem ser escritos para um processo, sendo: **(a) Modelos de fenômeno de transporte** - usam princípios físico-químicos. Como exemplo citou as equações fenomenológicas de conversão, as quais são equações de continuidade descrevendo as conversões de massa, de momento e de energia; **(b) Modelos de balanço populacional** - usam balanços populacionais. Distribuição de tempo de residência e outras distribuições de idade são exemplos para este tipo de modelo; **(c) Modelos empíricos** - usam dados empíricos para o ajuste. São polinômios usados para ajustar os dados experimentais.

Numa outra visão, Schwaab e Pinto (2007) propuseram os modelos distinguidos como: **(a) Modelos Teóricos e Empíricos** - nos modelos teóricos as equações que relacionam as diversas variáveis do problema derivam de pressupostos teóricos fundamentais como as leis de conservação de massa, de energia e de quantidade de movimento. Já nos modelos empíricos, as equações utilizadas para descrever as relações observadas entre as variáveis do problema são postuladas, não havendo a princípio qualquer pressuposto teórico que justifique

a relação concebida; **(b) Modelos Lineares e Não Lineares (implícitos e explícitos)** - os modelos são ditos lineares quando apresentam relações lineares entre as variáveis consideradas no problema e quando satisfazem as propriedades de linearidade, caso contrário são classificados como não lineares. Estes modelos ainda podem ser considerados explícitos ou implícitos, conforme a possibilidade de resolução direta ou à necessidade de aplicação de métodos numéricos, respectivamente; **(c) Modelos Determinísticos e Estocásticos** - os modelos determinísticos associam a cada experimento um resultado bem definido, enquanto os modelos estocásticos associam a cada condição experimental um conjunto possível de resultados, cada qual com certa probabilidade; **(d) Modelos a Parâmetros Concentrados e a Parâmetros Distribuídos** - quanto à forma da variação espacial das variáveis. Os modelos a parâmetros concentrados são assim designados se as variáveis espaciais são desprezíveis e as propriedades não mudam com a posição. Por outro lado, os modelos a parâmetros distribuídos têm lugar quando as variações espaciais são relevantes; **(e) Modelos Estacionários e Dinâmicos** - tomando por base a dependência temporal, os modelos são ditos dinâmicos quando uma ou mais variáveis variam no tempo e são chamados de estacionários quando as variáveis não mudam em função do tempo.

De acordo com Valdman et al. (2008), os modelos matemáticos representam o comportamento dinâmico do processo segundo as características das equações diferenciais e algébricas que o compõem, de forma a definir os métodos e técnicas usadas para determinar a sua solução. Nesta concepção, designaram-nos como:

(a) Modelos agrupados – são os constituídos por equações diferenciais totais, obtidas pela aplicação das leis fundamentais, sendo o tempo a variável independente. Neste caso, os processos são tratados como tendo todas as variáveis agrupadas e uniformes dentro do volume considerado para a aplicação das leis da continuidade de massa e de energia; **(b) Modelos distribuídos** - àqueles onde as equações diferenciais componentes são parciais e, geralmente, a variável tempo e outra variável dimensional (comprimento) são as variáveis independentes. Nestes casos as variáveis do processo são tratadas como variações distribuídas ao longo do volume total dos equipamentos considerados. As leis fundamentais são aplicadas, em geral, para volumes infinitesimais ao logo de uma das dimensões principais do equipamento; **(c) Modelos lineares** - àqueles nos quais as equações diferenciais e algébricas não contêm nenhum termo não linear. A não linearidade do termo é caracterizada, por exemplo, por produtos de variáveis dependentes, variáveis em expoentes ou radicais e etc. Neste caso, os coeficientes de todos os termos das equações diferenciais são constantes ou funções da variável independente; **(d) Modelos não lineares** - os que apresentam as equações

diferenciais e algébricas do modelo contendo pelo menos um termo não linear. Assim, este termo contém um coeficiente ou uma função de outra variável dependente do modelo.

Boareto et al. (2011a) fizeram uma revisão bibliográfica abarcando o extenso conteúdo relacionado aos fundamentos básicos e classificação de modelos, onde incluem inclusive o conteúdo deste item.

Em alguns processos, dado as suas características específicas, não se consegue pela aplicação de uma técnica de modelagem isoladamente a descrição do fenômeno com acurácia suficiente para permitir sua operação dentro das condições exigidas. Nesses casos é recorrente na literatura a combinação de técnicas de modelagem, aproveitando os pontos fortes de cada uma de forma a compensar as limitações individuais. A essa junção de duas ou mais técnicas para diferentes aspectos de um sistema microbiano dá-se o nome de modelagem híbrida (Patanaik, 2009a). Esta técnica de modelagem também é chamada de caixa-cinza (Zorzetto, et al., 2000; Komives e Parker, 2003; Boareto, 2005). Patanaik (2009a) avaliou que os modelos cognitivos são frequentemente superiores aos modelos mecanicistas para um reator não ideal. A modelagem híbrida tem sido reconhecida como uma alternativa quanto a custo e efetividade para análise de bioprocessos (Oliveira, 2004; Zorzetto, et al., 2000; Henriques et al., 1999; Psichogios e Ungar, 1992; Boareto, 2005).

2.2.2 Modelos mecanicistas e redes neuronais artificiais

O conteúdo desse subtítulo, de forma mais completa, foi publicado como uma revisão bibliográfica de modelagem matemática de bioprocessos (Boareto et al., 2011b).

O desenvolvimento de modelo avançado para monitoramento de biorreator, otimização e estratégia de controle é algumas vezes condicionado pela etapa de modelagem. Nesse contexto, os modelos para bioprocessos são frequentemente simplificados em demasia, particularmente no que concerne à descrição de subsistemas de populações celulares (Oliveira, 2004).

Essa tendência de utilização de modelos mais simples em detrimento aos mais complexos está em acordo com a filosofia permanente no campo da modelagem matemática, onde se busca sempre o modelo mais simplificado que possa representar convenientemente o processo, evitando a demanda de tempo em sua formulação e a exigência de esforço computacional excessivo (Boareto, 2005).

Não obstante, a busca da simplicidade ao modelar traz ambigüidade entre os conceitos do modelo eficiente e do modelo simples (Boareto, 2005). Deste modo, Oliveira (2004)

constata que para alguns processos estacionários, modelos simples podem produzir resultados com acurácia suficiente, contudo, para processos operados em batelada alimentada - altamente dinâmicos, negligenciar a estrutura intracelular e a heterogeneidade celular resultará invariavelmente em insuficiente estimação ou capacidade de predição do modelo. Coelho (2001) também verifica a possibilidade de discrepâncias entre a predição do modelo e os dados experimentais, devido à grande complexidade e incerteza características dos bioprocessos reais. Tal complexidade e incerteza são inerentes à descrição das taxas cinéticas, geralmente representadas por expressões semi-empíricas que procuram abarcar fenômenos de inibição por substrato e produtos, repressão catabólica e limitação por substrato.

Assim, o mais importante elemento na modelagem matemática de processos fermentativos é definir a estrutura do modelo, que implica em especificar sua complexidade e, deste modo, tem-se como regra que o modelo seja "tão simples quanto possível, mas não o mais simples" (Nielsen et al., 2003). Essa regra implica que os mecanismos básicos sejam sempre incluídos e que a estrutura do modelo seja determinada por seu objetivo.

2.2.2.1 Modelos mecanicistas

O termo designativo mecanicista – do inglês *mechanicist* – refere-se à doutrina do mecanicismo, a qual admite que determinado conjunto de fenômenos, ou mesmo toda a natureza, se reduz a um sistema de determinações mecânicas. Concebe, ainda, o movimento como determinado por lei causal rigorosa, negando todo o tipo de finalismo ou de qualidade oculta para a determinação dos fenômenos naturais (Ferreira, 1975). Esses modelos também são designados como fenomenológicos, por descreverem os fenômenos do sistema empregando equações matemáticas. Patnaik (2009a) trata o modelo mecanicista como modelo convencional.

Os modelos mecanicistas utilizam sistemas de equações diferenciais e algébricas, exigindo conhecimento amplo e geral sobre o sistema a ser modelado.

Oliveira (2004) verificou que frequentemente modelos celulares não estruturados e não segregados são as únicas opções de escolha para a modelagem matemática de processos biotecnológicos, seja pela falta de conhecimento básico ou pela complexidade excessiva desse tipo de processo. Nesta mesma linha, Coelho (2009) relata que o levantamento de modelos estruturados é dependente de um grande conhecimento sobre o metabolismo do micro-organismo e, por esta razão, os modelos não estruturados têm sido mais utilizados para propósitos práticos.

Jöbses et al. (1986) propuseram um modelo estruturado em dois compartimentos considerando a célula dividida em compartimentos contendo grupos específicos de macromoléculas (por exemplo, proteínas, DNA e lipídios).

Daugulis et al. (1997) relatam a proposição recente de diversos modelos para representar o comportamento oscilatório de *Zymomonas mobilis* em processos contínuos de produção de etanol. Neste contexto citam o modelo proposto por Ghommidh et al. (1989), que posteriormente foi expandido por Jarzebski (1992) pela inclusão de limitação de substrato e inibição pelo produto, conceituando a população celular em três estados: (1) células viáveis – com capacidade de reprodução e produção de etanol; (2) células não viáveis – capazes de produzir etanol, mas sem capacidade de reprodução; e (3) células mortas – incapazes de reproduzir e produzir etanol. Assim, com equações de balanço de massa apropriadas, o modelo foi hábil para representar o comportamento oscilatório dos dados experimentais obtidos. No entanto, os experimentos necessários para a determinação do estado das células consumiam muito tempo.

Ranzan et al. (2009) fizeram uma revisão sobre modelos matemáticos propostos na literatura para fermentações contínuas empregando *Zymomonas mobilis* e glicose como substrato, referindo-se aos modelos propostos por Jöbses et al. (1986), Ghommidh et al. (1989), Jarzebski (1992) e Daugulis et al., (1997). Por fim, analisaram detalhadamente os modelos estudados por Jöbses et al. (1986) e Daugulis et al. (1997) utilizando análise de bifurcação.

Daugulis et al. (1997) sugeriram um modelo mecanicista não estruturado, baseado nas variáveis macroscópicas de processo, tais como concentração celular, consumo de substrato e formação de etanol. Para tanto, analisaram prévios trabalhos de Li et al. (1995) com *Zymomonas mobilis*. Então, para proceder à modelagem, basearam-se na constatação de que o efeito inibitório histórico da concentração de etanol (etanol produzido no processo) era insignificante, enquanto o efeito de inibição provocado por uma taxa ascendente de variação na concentração de etanol (etanol exógeno adicionado) era bastante intenso. Desta forma, ao reconhecerem que as células são incapazes de responder instantaneamente às mudanças no seu ambiente, os autores postularam a existência de um "atraso" a ser considerado entre o momento no qual as células sofrem uma mudança em seu ambiente reacional e o momento no qual há sua resposta metabólica efetiva. A descrição completa do modelo encontra-se no Apêndice A.

No esforço de modelagem em seu trabalho, Camêlo (2009) implementou o modelo fenomenológico de Daugulis et al. (1997) para representar o comportamento oscilatório

exibido no processo de produção de etanol quando do emprego de *Zymomonas mobilis*. A autora relatou dificuldade em estimar parâmetros, mesmo pelo emprego de diferentes técnicas. Nesta condição, sugeriu uma determinação mais precisa dos fatores que desencadeiam as oscilações, levando em conta as rotas bioquímica das bactérias *Zymomonas mobilis* e, assim, redefinir os parâmetros mais importantes. Estudou também o comportamento dinâmico das principais variáveis de estado (concentração celular, decaimento de glicose e formação de etanol) em fermentação alcoólica catalisada por *Zymomonas mobilis*, tendo glicose como substrato. Para seu estudo, a autora emprega análise de bifurcação.

Ao estudar o modelo de Daugulis et al. (1997), Camêlo (2009) considerou que a taxa específica de produção (Q_p) retirada da literatura (Lee e Rogers, 1983; Luong, 1985 *apud* Daugulis et al., 1997), vincula totalmente o consumo de glicose à produção de etanol, não considerando parte do consumo para o crescimento celular, estando em desacordo com a rota de Entner-Doudoroff, o que segundo a autora, não permitiu o ajuste do modelo implementado em sua pesquisa.

No prosseguimento de seu estudo e face ao não ajuste do modelo mecanicista empregado, Camêlo (2009) formulou também modelos lineares (MLST – Modelo de Séries Temporais Lineares) para aplicações de monitoramento e controle, empregando os dados *on line* de concentração celular obtida, considerando a ferramenta útil para predição do comportamento oscilatório.

Essa série de fatores complicadores para a modelagem matemática de bioprocesso, descrita nos parágrafos anteriores, comumente acarretam a inserção de grande quantidade de parâmetros de ajuste – na maioria das vezes difíceis de estimar, além do acoplamento do sistema de equações, tornando sua solução difícil e por muitas vezes impossível para a precisão requerida (Boareto, 2005). Esta dificuldade de estimação pode estar relacionada aos efeitos correlacionados advindos do grande número de parâmetros, o que tornam alguns desses parâmetros não significativos estatisticamente.

Embora o desenvolvimento de modelos matemáticos apropriados que possibilitem a simulação, otimização e implementação de malhas de controle do processo seja altamente desejável, a literatura científica reporta que o desenvolvimento de modelos matemáticos fenomenológicos simples com acurácia suficiente para a descrição de bioprocessos é uma tarefa difícil, dada a alta não linearidade - advindas das características intrínsecas dos micro-organismos, e a complexidade do meio reacional – normalmente composto por várias fases

(Glassey et al., 1994; Hussain, 1999; Henriques et al., 1999; Zorzetto et al., 2000; Vlassides et al., 2001; Patnaik, 2003; Oliveira, 2004).

Modelos mecanicistas (convencional) de sistemas microbianos são derivados da analogia com reações químicas. No entanto, falham ao retratar algumas características da dinâmica microbiana, as quais diferem das observadas nas reações químicas. Além disso, a interação entre a fluidodinâmica e o metabolismo cria novo modelo de comportamento celular, os quais são dificilmente descritos por modelos fenomenológicos. Essas dificuldades são mais pronunciadas para fermentações complexas em biorreatores grandes, onde mais de um substrato é usado e apresenta homogeneização não uniforme (Patnaik, 2009a).

Assim, dada a limitação da aplicação de modelos fenomenológicos aos bioprocessos que exijam maior complexidade em sua descrição, a literatura descreve outras ferramentas empregadas separadamente ou combinadas. Na sequência, são descritas as redes neuronais artificiais, os modelos cibernéticos e os modelos híbridos.

2.2.2.2 Redes neuronais artificiais: inteligência artificial

O paradigma das redes neuronais artificiais (ANN - *Artificial Neural Netwokrs*) é resultante de pesquisas em Inteligência Artificial (AI - *Artificial Intelligence*), a qual tenta aprender e modelar o comportamento do cérebro. Neste contexto, existem três principais ramos da AI, quais sejam: sistemas especialistas, redes neuronais e sistemas de lógica "*Fuzzy*" (Baughman e Liu, 1995).

Na literatura, como nomenclatura na língua portuguesa, *Artificial Neural Netwokrs* (ANN) são designadas comumente como "Redes Neurais artificiais", "Redes Neuronais Artificiais" ou "Redes Neuroniais Artificiais" (RNA). Sem entrar no mérito da discussão sobre a nomenclatura mais apropriada, cumpre relatar que o Dicionário Aurélio Buarque de Holanda Ferreira descreve o termo "NEURAL" como sendo relativa a ou próprio de nervo; o termo "NEURONIAL" - correspondente a neurônico, como relativo ou pertencente aos neurônios; e o termo "NERONAL", apesar de recorrente na internet, não é encontrado no dicionário consultado (Ferreira, 1975). Neste trabalho as ANN são referidas como Redes Neuronais Artificiais (RNA).

Os sistemas especialistas operam simbolicamente, numa escala macroscópica, processando símbolos não numéricos e nomes. Requerem o conhecimento das relações e não se atêm a como essas relações se desenvolvem (Haykin, 1999; Baughman e Liu, 1995). Ainda, segundo De Souza Jr. (2001), nesse processamento simbólico, o conhecimento -

conjunto de informações sobre um domínio particular - é extraído e representado simbolicamente por regras.

Redes neuronais artificiais, por outro lado, usam processamento subsimbólico, caracterizado por interações microscópicas que eventualmente se manifestam como comportamento macroscópico, simbólico, inteligente (Haykin, 1999; Baughman e Liu, 1995). De Souza Jr. (2001) complementa quando levanta a consideração de que nem todas as informações captadas pela mente humana são facilmente representadas por regras (processo simbólico). Assim, as redes neuronais surgem como o modo de reproduzir esse mecanismo cognitivo onde se consegue reconhecer padrões e características relevantes em um conjunto de dados.

A lógica *Fuzzy* surgiu do desejo de quantificar sistemas baseados em regra. O raciocínio baseado em regra é fundamentado em representação qualitativa do conhecimento e a lógica "*Fuzzy*" nos permite uma abordagem quantitativa com a representação qualitativa. Essa abordagem provê um modo para quantificar certos qualificadores tais como aproximadamente, frequentemente, raramente, vários, poucos e muitos (Baughman e Liu, 1995).

A Figura 2.9 correlaciona características dos sistemas especialistas, das redes neuronais artificiais e da lógica *Fuzzy*.

Estrutura de informação	Tipo de conhecimento: Não estruturado	Tipo de conhecimento: Estruturado
Numérica	Rede neuronal	Sistema lógica Fuzzy
Simbólica	———	Sistema especialista

Figura 2.9 – Correlação de características de sistemas de inteligência artificial. Adaptado de Kosko (1991) *apud* Baughman e Liu (1995)

Não obstante, a metodologia da modelagem de bioprocesso por redes neuronais artificiais está inserida dentro do campo da modelagem empírica. Essa técnica também é conhecida como modelagem "caixa-preta".

As vantagens das redes neuronais artificiais em relação a outras técnicas computacionais podem se descritas como: (a) a informação é distribuída sobre um campo de

neurônios, propiciando-lhe maior flexibilidade quando comparada ao processamento simbólico; (b) habilidade em aprender frente à situação que provoque imprecisão no sistema; (c) habilidade para armazenar uma quantia grande de informação e acessá-las facilmente (*knowledge indexing*); (d) melhor para processamento de sistemas com ruídos, incompletos ou inconsistentes; (e) imita o processo de aprendizado humano (tentativa e erro); (f) capacidade de determinar automaticamente as relações essenciais de um conjunto de dados de entrada - saída; (g) potencial para uso *on-line*, pois apesar de poder requer longo tempo para treinamento, uma vez treinada, pode calcular o resultado de uma dada entrada com muita rapidez (Baughman e Liu, 1995).

Baughman e Liu (1995) também apresentaram as principais limitações das RNA, dentre as quais tem-se: (a) pode necessitar de longo tempo de treinamento; (b) necessita de grande quantidade de dados para o treinamento (Henriques et al., 1999); (c) não garante resultados ótimos, pois o treinamento dos *biases* pode levar a precisão da rede para alguma região de operação, sendo imprecisas em outras regiões. Assim não garante 100% de confiabilidade, vez que está limitada aos dados de treinamento, o que, segundo Lennox et al. (2001), pode ser contornado com o procedimento de validação com conjunto de dados distinto dos de treinamento.

Conforme descrito por Linko e Zhu (1992) e Zorzetto et al. (2000), os modelos desenvolvidos aplicando técnicas de RNA, também chamados de caixa-preta, não exigem o conhecimento do fenômeno físico envolvido no processo, bastando-lhe apenas os dados experimentais.

Cruz et al. (1998) aplicaram separadamente modelos fenomenológicos e redes neuronais artificiais para a descrição do processo de produção de Cefalosporin C com *Cephalosporium acremonium*, discorrendo sobre a viabilidade de aplicação de técnicas de RNA para o monitoramento, detecção de falhas e simulação, haja vista o comportamento não linear do processo ter sido descrito de forma adequada por essa ferramenta computacional. Em suas conclusões verificaram que, apesar de ambos os modelos (neuronal e fenomenológico) terem descrito satisfatoriamente as características principais do processo, a rede neuronal se sobressaiu ao dispensar a difícil etapa de estimação de inúmeros parâmetros de ajuste.

Henrique et al. (2000) relataram que redes neuronais artificiais têm sido intensivamente utilizadas em aplicações de Engenharia Química. Assim, desenvolveram metodologia para identificar e eliminar parâmetros redundantes e insignificantes que aumentam a complexidade das redes e diminuem sua acurácia.

Segundo Lennox et al. (2001), uma vez que o desempenho dos algoritmos para monitoramento e controle de processos é dependente da precisão dos modelos utilizados em seu interior, as redes neuronais artificiais têm potencial para prover benefícios a esses algoritmos quando aplicados a sistemas não lineares. Estes autores obtiveram sucesso quando aplicaram as RNA em seu trabalho para a modelagem, monitoração e controle de processos.

Vlassides et al. (2001) empregaram uma rede neuronal artificial para a análise sensorial de vinhos. A rede treinada foi de topologia *feedforward* com uma camada escondida - empregando função de ativação sigmoidal, e funções de ativação linear para as demais camadas. Os autores observaram que a rede neuronal estudada foi capaz de predizer os atributos químicos e sensoriais do vinho.

Komives e Parker (2003) discutiram que modelos empíricos podem variar de muito simples - para a estimação de simples variável fundamental, a muito complexo - para a estimação e controle do estado total do processo. Observaram também que, dada à imprecisão na predição dos dados de saída, quando as RNA são empregadas fora do domínio dos dados históricos usados no treinamento (espaço amostral), não apresentam boa propriedade de extrapolação; há portanto dificuldade de validação deste método para processos farmacêuticos. No entanto, Linko e Zhu (1992) e Glassey et al. (1994) obtiveram anteriormente resultados satisfatórios com a utilização de modelos estruturados em técnicas de redes neuronais para estimação e predição no controle de fermentação de glucoamilases e supervisão de bioprocesso de *Escherichia coli* recombinante, respectivamente. Esses resultados significativos aplicando modelos baseados nos princípios de RNA, segundo os autores, são oriundos da habilidade das redes neuronais em aprenderem relações não lineares complexas sem requerer detalhado conhecimento do processo, o que as tornam viáveis para condições de comportamento pouco conhecido, que, aliás, são deveras recorrentes em processos biotecnológicos. Nessa mesma linha Hussain (1999) relatou que considerando o potencial das redes neuronais em aprender pelo exemplo, elas oferecem um método de custo aceitável para o desenvolvimento de modelos de processos úteis. Cita ainda que elas também têm a habilidade de aprender comportamento dinâmico frequentemente complexo de um sistema físico.

Boareto et al. (2006) desenvolveram uma rede do tipo *Percptron* Multicamadas (MLP) para a representação de processo produtivo de lipase em batelada alimentada. Concluíram ser a rede adequada para a descrição da produção de lípase. Além disso, discorreram sobre a possibilidade de sua aplicação como sensor virtual ao longo de uma fermentação, fornecendo - a partir de informações da taxa de formação de gás carbônico (CER), biomassa e vazão de

alimentação de substrato – predição da atividade das enzimas, sendo também apropriado para emprego no desenvolvimento de modelos híbridos-neuronal/fenomenológico.

Osorio et al (2008) desenvolveram um sensor virtual para estimar a concentração de etanol on-line no destilado de alambiques de vinhos – água ardente de vinho. Para o desenvolvimento do estimador utilizaram redes neurais artificiais, dada a sua capacidade de modelar relações altamente não-lineares e dinâmicas, para o que empregaram dados laboratoriais e industriais no treinamento e na validação. Concluíram que o *soft-sensor* proporcionou boa acurácia na predição da concentração de etanol.

Mangesh e Jana (2008) propuseram três conjuntos de algoritmos para processamento digital de sinal (DSP) - baseados no observador de Luenberger estendido (ELO), no filtro de Kalman estendido (EFK) e no estimador de estado adaptativo - destinados à estimação de parâmetros conhecidos de forma imprecisa (taxa específica de crescimento, taxa de formação de produto e taxa de consumo de substrato) e a própria concentração celular no processo de fermentação alcoólica utilizando levedura de padeiro (*Saccharomyces cerevisiae*) conduzido em biorreator operado em batelada alimentada. Para alimentar o estimador de estado foram utilizadas as concentrações de substrato, de produto e de células e o volume do bioreator. Entre estes quatro variáveis de estado, a concentração do substrato, concentração do produto e volume do reator foram medidas *on-line*, sendo a concentração de células considerada de difícil medição. Desta forma, empregaram uma RNA para estimar a concentração celular. A rede neuronal teve como variáveis de entrada o volume do reator, as concentrações de substrato e de produto e como variável de saída a concentração celular. Concluíram que o estimador ASE tem a forma mais simplificada em relação aos estimadores ELO e EFK. Além disso, observaram o desempenho superior do estimador ASE em relação aos estimadores ELO e EFK e do EFK em comparação ao ELO.

2.2.2.2.1 Fundamentos dos modelos neuronais

Existe um número variado de tipos de redes neuronais artificiais (RNA) que podem ser aplicadas para a modelagem de bioprocessos, sendo definidas por sua topologia e pela anatomia de seus neurônios. Conforme o tipo de RNA empregada, o método de aprendizado é definido (Lennox et al., 2001).

Redes neuronais artificiais multicamadas são compostas por seqüências de neurônios justapostos em camadas - entrada, escondida e saída - e interligados entre si por interconexões. Os neurônios constituem as unidades de processamento matemático da rede. A

forma como os neurônios estão interconectados define sua topologia ou arquitetura (Baughman e Liu, 1995; Haykin, 1999; De Souza Jr., 2003).

Como exemplo pode-se citar o emprego de RNA de topologia multicamada com conexões *feedforward*, contendo três camadas, quais sejam, uma camada de entrada, uma camada escondida e uma camada de saída. Nas redes intercamadas a saída de um neurônio alimenta a entrada do neurônio da outra camada e na conexão *feedforward* os sinais se propagam para frente (De Souza Jr., 2003; Lennox et al., 2001; Baughman e Liu, 1995). A Figura 2.10 apresenta esquematicamente a RNA em questão.

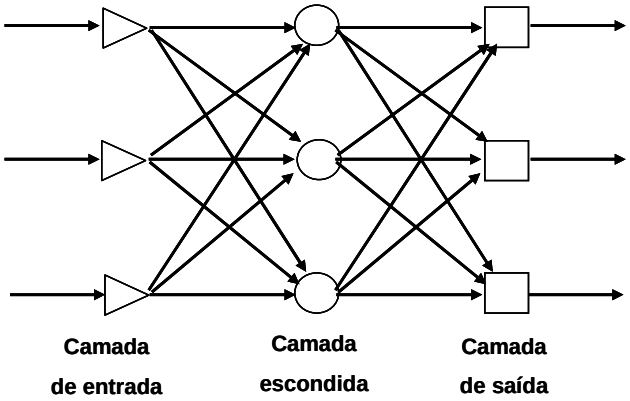


Figura 2.10 - RNA de topologia multicamada, com conexões *feedforward* contendo três camadas (Baughman e Liu, 1995)

Definida a topologia da rede, o funcionamento de um neurônio numa rede multicamada pode ser estudado.

Um neurônio "j" qualquer da camada "$k+1$" recebe um conjunto de informações "$S_{pi,k}$", onde $i = 1,...n_k$ - correspondentes às saídas ou ativações dos "n_k" neurônios da camada anterior - ponderadas, cada uma, pelo peso "w_{jik}" correspondente a sua conexão. O neurônio soma essas entradas ponderadas e o valor resultante é comparado a um limite interno de ativação, chamado de *bias* representado por "$\theta_{j,k+1}$". O resultado dessa comparação constitui o nível de ativação "$\lambda_{j,k+1}$" do j-ésimo neurônio, o qual, então, produz uma resposta "$s_{pj,k+1}$" de acordo com uma função de ativação "$f(\bullet)$" (De Souza Jr. 1993; Baughman e Liu, 1995; Haykin, 1999). A Figura 2.11 esquematiza o j-ésimo neurônio descrito.

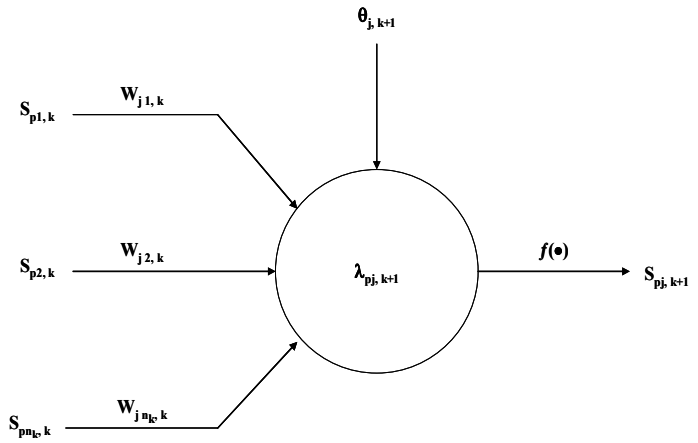


Figura 2.11 - j-ésimo neurônio da camada k+1

Os termos apresentados na Figura 2.11 são especificados a seguir.

As entradas do j-ésimo neurônio são ponderadas conforme descrito pela equação:

$$\sum_{i=1}^{n_k} w_{jik} \cdot s_{pi,k} \tag{2.2}$$

O nível de ativação do j-ésimo é definido por:

$$\lambda_{pj,k+1} = \left(\sum_{i=1}^{n_k} w_{jik} \cdot s_{pi,k} \right) + \theta_{j,k+1} \tag{2.3}$$

A equação que descreve como uma função de ativação $f(\bullet)$ aplicada ao nível de ativação do j-ésimo neurônio é dada a seguir:

$$f\left(\lambda_{pj,k+1}\right) = f\left[\left(\sum_{i=1}^{n_k} w_{jik} \cdot s_{pi,k} \right) + \theta_{j,k+1} \right] \tag{2.4}$$

Segundo Bakshi e Stephanopoulos (1993), dois tipos de funções de ativação são comumente usadas para a ativação dos neurônios: global e local. As funções de ativação globais produzem uma saída ativa para um amplo intervalo de valores de entrada, e fornecem uma aproximação global para os dados empíricos. As funções de ativação locais são aquelas que produzem uma saída ativa apenas na vizinhança imediata dos seus dados de entrada, ou seja, na vizinhança do seu centro de ativação.

A topologia definida para a RNA, bem como a função de transferência aplicada no nível de ativação dos neurônios, define o tipo de rede. As funções de ativação estão descritas abaixo (Baughamn e Liu, 1995; Haykin, 1999; De Souza Jr., 2001).

As funções de ativação globais podem ser:

Função linear:

$$f\left(\lambda_{pj,k+1}\right) = \lambda_{pj,k+1} \tag{2.5}$$

Função degrau limiar:

$$\text{para } \lambda_{pj,k+1} > 0\,, \quad f\left(\lambda_{pj,k+1}\right) = +\xi \tag{2.6}$$

$$\text{para } \lambda_{pj,k+1} \leq 0\,, \quad f\left(\lambda_{pj,k+1}\right) = -\xi \tag{2.7}$$

Função de ativação sigmoidal:

$$f(\lambda_{j,k+1}) = \frac{1}{1+e^{-(\lambda_{j,k+1})}} \tag{2.8}$$

Função de ativação tangente hiperbólica:

$$f(\lambda_{j,k+1}) = \tanh(\lambda_{j,k+1}) = \frac{e^{(\lambda_{j,k+1})} - e^{-(\lambda_{j,k+1})}}{e^{(\lambda_{j,k+1})} + e^{-(\lambda_{j,k+1})}} \tag{2.9}$$

A função de ativação local é:

Função de ativação gausiana:

$$f_{pj} = \prod_{i=1}^{n_k} exp\left[\frac{(s_{pi,k} - \mu_{ji})^2}{-2\sigma_j^2}\right] \tag{2.10}$$

Portanto, como será detalhado à frente, as funções de ativação globais do tipo sigmoidal e tangente hiperbólica são aplicáveis para as redes do tipo MLP (*Multilayer Perceptron*) chamadas de *Perceptron* multicamada. A função de ativação local do tipo gausiana é aplicável para redes do tipo RBF (R*adial of Bases Function*) chamada redes de função de bases radiais ou simplesmente redes de bases radiais.

2.2.2.2.2 Tipos de redes neuronais artificiais

Dentre as inúmeras arquiteturas de RNA existentes, Baughman e Liu (1995), Karim (1997) e De Souza Jr. (2003) apresentaram as mais comuns no universo da Engenharia Química: (a) Rede *Perceptron* Multicamadas: é a arquitetura de redes mais popular. Usa uma função PSP (potencial pós-sináptico) linear e, usualmente, uma função de ativação não-linear. Rede do tipo MLP pode ser usada em problemas de regressão e em problemas de

classificação. (b) Função de Bases Radiais: tem uma camada de entrada, uma camada escondida de unidades radiais e uma camada de saída de unidades lineares. Redes RBF são utilizadas tipicamente para problemas de diagnóstico de falhas e classificação. Treinam relativamente rápido, no entanto, tendem a serem maiores que as MLP e, portanto, executam mais devagar. (c) Redes lineares: têm apenas duas camadas. Uma camada de entrada e uma de saída, a última tendo funções PSP de ativações lineares. (d) Redes *Bayesianas*: há 2 tipos de redes *bayesianas*: Redes Neuronais Probabilísticas (PNN) e Redes Neuronais de Regressão Generalizada (GRNN). (d1) As PNN que são usadas apenas para tarefas de classificação têm três ou quatro camadas. Há uma camada de entrada, uma camada de unidades radiais, e uma camada de unidades de classificação linear. (d2) As GRNN, empregadas apenas para tarefas de regressão, têm exatamente quatro camadas: uma camada de entrada, uma camada de centros radiais, uma camada de unidades de regressão, e uma camada de saída. (e) Redes Mapeamento Auto Organizável de Características: têm uma camada de entrada e uma camada de saída de unidades radiais. São usadas principalmente para fins de classificação, como exemplo as redes treinadas pelos métodos de *Kohonen*.

Para os leitores que desejem aprofundar no estudo de métodos de treinamento de RNA, podem recorrer aos trabalhos De Souza Jr. (1993, 2001 e 2003) e Costa et al. (2005).

2.2.3 Modelos cibernéticos e modelos híbridos

O conteúdo desse subtítulo foi submetido como uma revisão bibliográfica de modelagem matemática de bioprocessos (Boareto et al., 2011 - submetido).

Como já descrito anteriormente com detalhes, quando se discutiu os modelos mecanicistas, em função da série de fatores adversos que dificultam a modelagem matemática de bioprocessos - inserção de grande quantidade de parâmetros de ajuste, correlacionamento de parâmetros, parâmetros não significativos estatisticamente, acoplamento do sistema de equações e etc - a abordagem de modelagem cibernética e híbrida apresentam-se como viáveis e com perspectivas promissoras para representação do processo produtivo, pois conduz a uma descrição sucinta do crescimento celular às custas de informações sobre os mecanismos regulatórios e permite associar as vantagens de mais de uma técnica, respectivamente.

Sob condições reais, muitos sistemas microbianos funcionam em caminhos que são difíceis de descrever utilizando métodos de modelagem convencionais. Dito isso, Patnaik (2009a e 2009b) descreve a possibilidade de aproximações do sistema empregando duas classes de modelos inteligentes ou cognitivos. A primeira classe emprega métodos de

inteligência artificial (AI), incluindo lógica fuzzy, redes neuronais artificiais, sistemas especialistas e algoritmos genéticos. A outra classe utiliza modelos cibernéticos, os quais focam o processo intracelular assumindo serem regulados pela inteligência inata atribuída às células. Assim, dentre as diversas técnicas de modelagem disponíveis, a mais adequada a ser aplicada será definida em função da complexidade inerente ao processo.

2.2.3.1 Modelos cibernéticos

Na visão de Giuseppin e van Riel (2000), a abordagem cibernética está inserida dentro do contexto da engenharia metabólica. Assim, antes de passar a consideração da técnica selecionada faz-se relevante situá-la dentro do contexto mais amplo no qual se insere.

Giuseppin e van Riel (2000) relataram que diversas técnicas têm sido aplicadas no estudo do crescimento e metabolismo microbiano, citando o trabalho de diversos autores. Apesar de não ser uma pesquisa completa, como mencionado pelos autores, apresenta uma boa contextualização para o tema. Dentre as muitas metodologias existentes no campo da engenharia metabólica, esses autores descrevem as técnicas de:

(a) Análise de controle metabólico (*Metabolic Control Analysis* - MCA) visualiza o metabolismo como um conjunto limitado de enzima com interações, as quais podem ser descritas em termos do nível de substrato, de enzimas e de produtos. Apesar da sólida base, a quantidade de aplicações dessa abordagem ainda é limitada. Essa restrição à aplicação se deve ao excessivo esforço gasto na elaboração dos modelos e na fundamentação teórica destinada à análise dos fluxos nas células para a identificação dos "gargalos" e das regulações do processo (Kell e Westerhoff, 1986 *apud* Giuseppin e van Riel, 2000 e Fell, 1998).

(b) Análise de fluxo metabólico (*Metabolic Flux Analysis* - MFA) emprega a abordagem de engenharia, usando modelos de entrada/saída de redes estequiométricas para analisar o fluxo intracelular. Em sua forma derivada para sistemas indeterminados, tem-se a análise de balanço de fluxo (*Flux Balance Analysis* - FBA) (Jorgensen et al., 1995 e Schulze, 1995 *apud* Giuseppin e van Riel, 2000). O metabolismo é descrito usando todas as componentes chaves ou nós e os fluxos através das rotas condensadas. Contudo, esses modelos descrevem o fluxo em uma dada condição, não permitindo a extrapolação para outra condição ou para operação em modo transiente.

(c) Teoria de controle metabólico ótimo (*Optimal Metabolic Control Theory* - OMCT) (Bellgard, 1988 e 1991 *apud* Giuseppin e van Riel, 2000) e outras abordagens cibernéticas (Kompala et al., 1984; Straight e Ramkrishna, 1994 *apud* Giuseppin e van Riel, 2000),

empregam o conhecimento das estratégias usadas pelos micro-organismos para o controle de fluxo. Para tanto, baseiam-se na hipótese que o micro-organismo reage ao seu ambiente usando uma resposta ótima para sobrevivência e competição. A combinação de ambas as técnicas também é considerada (Liao e Delgado, 1998 *apud* Giuseppin e van Riel, 2000).

(d) Em muitos casos a rede metabólica é um sistema indeterminado, isto é, o número de soluções é maior que o número de redes para um dado conjunto de dados de entrada ou condições externas. Assim, soluções realistas para uma rede indeterminada podem ser obtidas implementando relações adicionais ou otimizando globalmente a resposta da rede, tratando-a como um problema de programação linear.

O verbete cibernético é pertencente ou relativo à cibernética, que pode ser definida como a ciência que estuda as comunicações e o sistema de controle não só nos organismos vivos, mas também nas máquinas (Ferreira, 1975).

Giuseppin e van Riel (2000) atribuíram a Wiener a primeira descrição do princípio cibernético como a ciência de comunicação e controle (1948 *apud* Giuseppin e van Riel, 2000) e as primeiras aplicações em modelagem metabólica ao grupo de Ramkrishna, dando como exemplo o trabalho de Kompala et al. (1984). Definem o sistema cibernético como um sistema ideal de autocontrole com um mínimo de conhecimento determinístico.

Segundo Jones e Kompala (1999), a estrutura de modelagem cibernética baseia-se na hipótese de que os micro-organismos otimizam a utilização do substrato disponível para maximizar sua taxa de crescimento durante todo o tempo. Coelho (2009) expõe que a abordagem cibernética traduz a idéia que as células regulam sua atividade metabólica através do controle das atividades e taxas de síntese das enzimas organizando as mesmas de forma ótima para alcançar um objetivo em particular. Ainda, para manter as equações resultantes suficientemente simples, detalhes dos mecanismos de regulação são absorvidos pelas variáveis cibernéticas.

Jones e Kompala (1999) propuseram um modelo estruturado e não segregado para representar o crescimento dinâmico e comportamento diáuxico de levedura, desenvolvido a partir da estrutura de modelagem cibernética. No processo utilizaram *Saccharomyces cerevisiae* em meio contendo glicose em cultura aeróbica operada em contínuo, com uma etapa em batelada inicial. Para esses autores a estrutura de modelagem cibernética baseia-se na hipótese de que os micro-organismos otimizam a utilização do substrato disponível para maximizar sua taxa de crescimento durante todo o tempo. Desta forma, na tentativa de desenvolver um detalhado modelo metabólico sem usar a observação experimental que os micro-organismos crescem em sua maior taxa de crescimento possível,

tornaria necessário incorporar todas as informações sobre os percursos metabólicos individuais disponíveis para o organismo. Entretanto, seria árdua a tarefa de modelar muitas etapas enzimáticas individuais, juntamente com os processos celulares de regulação da repressão e da inibição da enzima. Invocando o ponto de vista cibernético, onde o resultado líquido de todos os processos celulares de regulação é destinado a otimizar a taxa de crescimento instantânea, Kompala et al. (1984) desenvolveram uma estrutura de modelagem geral. Essa estrutura de modelagem cibernética substitui a modelagem detalhada dos processos de regulação, onde as variáveis cibernéticas de controle - "$\mathbf{u_i}$" e "$\mathbf{v_i}$", representam as estratégias ideais para a síntese e para a atividade da enzima, respectivamente. Para os valores da taxa de crescimento instantânea "$\mathbf{r_i}$" ao longo das rotas metabólicas disponíveis, as estratégias ideais para "$\mathbf{u_i}$" e "$\mathbf{v_i}$" foram definidas (Kompala et al., 1986). A descrição completa do modelo encontra-se no Apêndice B.

O modelo cibernético, conforme citado por Jones e Kompala (1999), é uma expansão do modelo proposto por Kompala (1982) para as culturas de leveduras. Ele permite simular a dinâmica de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* - em batelada e em processos contínuos, também em condições limitantes de oxigênio. Os autores relataram que o modelo cibernético predisse com acurácia todos os principais aspectos observados experimentalmente:

(a) na cultura em batelada: a duração da fase lag; a produção sequencial e o consumo de etanol; a taxa dinâmica de troca de oxigênio e de gás carbônico;

(b) na cultura em contínuo: a geração espontânea de oscilações, bem como as variações nas amplitudes quando a taxa de diluição ou a taxa de agitação eram alteradas.

Varner e Ramkrishna (1999), postularam que o controle de redes metabólicas, especificamente para expressão genética, pode ser descrito por princípios cibernéticos, sendo a fisiologia ótima para satisfazer os objetivos nutricionais. Consideram-na com capacidade de prever modificações na expressão enzimática e perfis de atividade frente às perturbações genéticas e ambientais. Assim, citam o emprego dessa abordagem na predição da resposta do sistema no desvio da produção de lisina em direção à treonina cultivada em batelada de *Corynebacterium lactofermentum*, bem como para a produção de penicilina V em batelada alimentada de *Penicillium chrysogenum*. Relataram também o emprego mais recente para a predição da resposta do sistema na super expressão de fosfofrutoquinase e piruvato quinase em *Escherichia coli* sob diferentes condições experimentais e na previsão do metabolismo

central de nitrogênio a pulsos de amônia em culturas contínuas de *Saccharomyces cerevisiae* sob condições de limitação de glutamina.

Nielsen et al. (2003), classificaram os modelos cibernéticos como modelos estruturados simples, classificação na qual também incluem os modelos de compartimento. Para esses autores os modelos não estruturados são bastante adequados para condições de estado-estacionário, no entanto dão uma descrição ruim para experimentos dinâmicos onde a composição e a atividade celular variam. Os modelos estruturados simples representam um melhoramento dos modelos não estruturados, como visto detalhadamente na classificação dos modelos matemáticos (sessão 2.2.1.2), podendo descrever o processo de crescimento a diferentes condições de operação com o mesmo conjunto de parâmetros.

Nielsen et al. (2003), citando Ramkrishna et al. (1987), apresentaram algumas das características de crescimento microbiano em substratos metabolizados sequencialmente. Essas características capturam de forma simples a consequência geral da sequencial utilização de fontes de carbono e de energia como resultado do complexo mecanismo de regulação por trás da repressão catabólica de carbono: (a) dados múltiplos substratos, micro-organismos preferem utilizar o substrato no qual pode crescer mais rápido, comumente resultando na utilização sequencial de substratos na cultura em batelada; (b) utilização sequencial transforma-se em emprego simultâneo quando outro substrato torna-se limitante; (c) mesmo durante a utilização simultânea de múltiplos substratos, a taxa específica de crescimento nunca é mais alta que aquela possível de ser obtida em qualquer substrato individual; (d) se durante o crescimento em um "substrato mais lento" (com menor taxa de crescimento), um "substrato mais rápido" é adicionado ao meio, o crescimento no "substrato mais lento" para depressa; (e) em culturas contínuas, múltiplos substratos são consumidos simultaneamente à baixas taxas de diluição e o "substratos mais rápidos" é consumido preferencialmente à altas taxas de diluição.

A idéia básica do modelo cibernético é que uma <u>enzima chave</u> desempenha o papel de gargalo no crescimento em um substrato específico, devendo ser sintetizada anteriormente ao crescimento neste substrato. Essa enzima chave pode representar todo o conjunto de enzimas que promovem a catálise de uma rota metabólica específica (Kompala et al., 1986; Nielsen et al., 2003). Kompala et al. (1986) ainda discutiram estar implícito ser desnecessária a identificação da enzima chave para cada substrato e fazer medidas de seu nível durante o crescimento, posto que a simulação do modelo requer somente <u>o valor inicial do nível relativo da enzima</u>. Esse nível relativo corresponde ao seu <u>máximo na fase exponencial de crescimento</u>. Tal valor inicial pode ser usado para caracterizar o estado do inóculo, sendo

determinado pelo ajuste da curva de crescimento incluindo a aceleração inicial da fase exponencial.

A atividade biológica acontece em rotas metabólicas que são redes complexas de reações químicas. Cada reação em uma rota é catalisada por uma enzima muito específica, cujo controle é refletido na distribuição de taxas de reação, chamados fluxos metabólicos (Ramkrishna, 1982 e 2003, Ramkrishna et al., 1984). Assim, o fluxo em diferentes rotas muda ocasionando diferentes padrões de consumo de substrato, bem como diferenças no crescimento celular e na síntese de produtos secundários. Desta forma, a engenharia metabólica deve tratar um grande número de reações para predizer o comportamento celular e, assim, otimizar o processo baseado em células (Namjoshi e Ramkrishna, 2005).

Namjoshi e Ramkrishna (2005) descreveram sistemas biológicos como extremamente complexos não somente devido ao grande número de reações ocorridas em uma única célula, mas também devido às interações extremamente não lineares entre diferentes metabólitos e enzimas. Não obstante, perturbações no ambiente extracelular podem levar às variações no nível de RNA mensageiro da célula e consequentemente nas enzimas que atuam em diferentes metabólitos, alterando-lhes o nível.

Conforme Ramkrishna (2003), enquanto os fluxos são experimentalmente acessíveis, a teoria para sua predição não está disponível, principalmente pela falta de uma estrutura para a descrição de regulação metabólica. Obviamente, se fosse possível especificar os detalhes de todos os processos de regulação da rede metabólica na integra, um modelo cinético adequadamente expandido não seria inimaginável, mas tornar-se-ia de complexidade proibitiva sob vários pontos de vista. Mais especificamente, o nível de observação não seria suficiente para um modelo de tal sofisticação, tornando impossível identificar e estimar todos seus parâmetros. Além disso, não está claro se os recursos disponíveis atualmente permitem especificar todos os processos de regulação metabólica. Neste contexto está inserido o valor da aproximação cibernética, possibilitando prover uma aproximação racional para explicar um fenômeno real, sobre o qual pouco é conhecido, além de que existe e que não pode ser ignorado.

Desta forma, aproximações cibernéticas apresentadas na literatura têm sido extremamente apropriadas na descrição de comportamento de biorreatores, baseadas no postulado de que as células são micro-organismos que mudam seu nível interno de enzimas em resposta a alterações do ambiente (Kompala et al., 1986; Varner e Ramkrishna, 1999; Namjoshi et al., 2003; Namjoshi e Ramkrishna, 2005).

A estrutura de modelagem cibernética baseia-se na proposição de funções objetivos para as reações enzimáticas. Então, a leis matemáticas e proporcionais podem ser empregadas para gerar as variáveis cibernéticas de controle "$\mathbf{u_i}$" e "$\mathbf{v_i}$" que ajustam a síntese e a atividade enzimática, respectivamente (Jones e Kompala, 1999; Namjoshi e Ramkrishna, 2005).

Patnaik (2000) apresentou uma revisão do desenvolvimento de modelos cibernéticos desde 1982. Discutiu a dificuldade de representação do crescimento de micro-organismos em meios com multisubstratos por modelos baseados somente em leis físico-químicas, citando que a modelagem cibernética confere-lhe a habilidade de perceber o ambiente e fazer "inteligentes" quanto à utilização do substrato para maximizar um objetivo, o qual normalmente é a taxa de crescimento. Apresentou diferentes trabalhos que sugeriram perspectivas diversas de como os micro-organismos otimizam o uso de seus recursos e direções futuras para melhoria são indicadas.

Gombert e Nielsen (2000) citaram a aplicação dos princípios cibernéticos como uma outra forma de considerar os aspectos de regulação do metabolismo celular. Nessa forma consideraram a introdução de variáveis cibernéticas no modelo cinético com o objetivo de substituir os detalhes mecanicistas não conhecidos da arquitetura de regulação celular por uma função objetivo, supondo que o metabolismo celular opera com uma meta global específica de otimização do crescimento. Relataram também o uso de tal abordagem na predição do aumento do fluxo de formação de treonina em *Corynebacterium lactofermentun*, como conseqüência de modificações genéticas.

Quanto à estratégia usada, Giuseppin e van Riel (2000) discutiram que depende da capacidade do micro-organismo e da concentração dos substratos assimiláveis disponíveis, sendo que na prática apresentam combinação de várias estratégias a depender do ambiente e do estado fisiológico das células. Assim, desvio na homeóstase como limitações ou inanição, pode resultar em outra estratégia metabólica celular. Contudo, somente as estratégias dominantes são passíveis de serem observadas experimentalmente.

Para Namjoshi e Ramkrishna (2005), como o número de reações enzimáticas que precisam ser modeladas se expande, a rede determinada pode ser dividida em unidades de reação elementares seguindo diversas rotas metabólicas. As estratégias existentes para guiar isto incluem o uso de fluxos de rede calculados a partir da análise de fluxo metabólico (MFA). A MFA está ancorada na medida de substrato extracelular ou metabólitos intracelulares e podem ajudar a decidir quais as unidades elementares devem ser modeladas. No entanto, como a medida detalhada de metabólitos intracelulares, enzimas e RNAs mensageiros

tornam-se disponíveis, a estratégia precisa ser modificada para aproveitar as vantagens destas medidas e, assim, reduzir a complicada rede dentro de um pequeno conjunto de modelos propostos. A estrutura e estratégia de modelagem estão evoluindo continuamente para acomodar medidas novas, bem como avanços teóricos ou computacionais.

Patnaik (2008) discorreu sobre a proposição de muitos mecanismos e modelos para explicar o comportamento oscilatório - em certas faixas de taxa de diluição e de concentração de oxigênio dissolvido, que ocorre em cultura contínua de *Saccharomyces cerevisiae* na conversão de glicose ou frutose a etanol, selecionando o modelo cibernético proposto por Jones e Kompala (1999) para seu estudo. No modelo escolhido são consideradas três rotas metabólicas mutuamente excludentes (fermentação de glicose – destinada à formação de etanol; oxidação da glicose e oxidação do etanol – promovem o crescimento e a manutenção celular), sendo o fluxo total distribuído dinamicamente entre elas. Dessa forma, Jones e Kompala (1999) postularam que essa competição dinâmica entre as três rotas provê a força motriz para as oscilações, propondo equações de taxa cibernéticas para cada uma das vias metabólicas em questão. Assim, Patnaik (2008) considerou que as características dessa abordagem cibernética criam uma fundamental distinção em relação aos muitos outros modelos mecanicistas propostos. Considera ainda que a aproximação cibernética estabelece uma estrutura matemática formal, com base no conceito evolucionário, no qual o organismo vivo responde ao seu ambiente de maneira a maximizar sua sobrevivência, estando em consonância ao manifestado por Kompala et al. (1984) quando discorreram sobre a capacidade dos micro-organismos em controlar seus processos regulatórios para otimizar seu padrão de crescimento, fato que entenderam como um corolário da teoria de seleção natural. Portanto, para Patnaik (2008) ficou implícita a proposição de que, para responder otimamente, as células vivas devem possuir alguma "inteligência" rudimentar que as tornem hábeis em lembrar de experiências passadas e reagir adequadamente às circunstâncias atuais. Por fim concluiu que os modelos cibernéticos incorporam controles de regulação internos das células, tornando-se capazes de retratar satisfatoriamente os comportamentos de partida e as perturbações dinâmicas em fermentações microbianas quando os modelos mecanicistas não podem fazê-lo.

Ochoa et al. (2008) propuseram e compararam um modelo não estruturado e um modelo cibernético para a simultânea sacarificação e fermentação do processo de conversão de amido em etanol, para obterem modelos bons, confiáveis a altamente preditivos destinados à otimização e controle do processo. Verificaram que o modelo não-estruturado foi adequado para aplicações *on-line*, tal como controle baseado em modelo, enquanto o modelo cibernético

foi a melhor escolha para aplicações onde a precisão do modelo é importante, tal como na determinação *off-line* da trajetória ideal a ser seguida ao longo do processo.

Paitnak (2009a) reportou-se ao modelo cibernético como uma das classes de modelos inteligentes, sendo a outra classe os métodos abrangidos pela inteligência artificial. Entende que a modelagem cibernética foca o processo intracelular, o qual são regulados pela inteligência inata atribuída às células. Em outro trabalho, Patnaik (2009b), referiu-se aos modelos cibernéticos e neuronais como modelos cognitivos ou inteligentes, considerando-os como superiores aos modelos mecanicistas para bioreatores não ideais.

Ko et al. (2010) ajustaram um modelo cinético para a hidrólise de palha de arroz empregando celulase e desenvolveram um modelo cibernético para um processo fermentativo com alto teor de glicose e de etanol operado em batelada e com *Saccharomyces cerevisiae* estudado anteriormente por Thatupamala et al. (1992), combinando-os para representar o processo de sacarificação e fermentação simultâneo. Concluíram serem os dois modelos adequados para descreverem o comportamento de inibição à alta concentração de substrato e produto.

Com o intuito de melhorar a produção de etanol, Chang et al. (2012) otimizaram a estratégia de alimentação do processo em batelada alimentada combinando operação aeróbica / anaeróbica, com base no conhecimento das características metabólicas das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Para tanto, usaram o modelo cibernético desenvolvido por Ko et al. (2012).

Um modelo cibernético - englobando 4 reações e 11 metabólitos, foi desenvolvido por Murthy et al. (2012) para a simulação do metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* em processo simultâneo de sacarificação e fermentação. Consideraram no modelo os efeitos de variáveis, tais como temperatura, pH, ácidos orgânicos e concentração de inoculo inicial, incluindo também a inibição de substrato e de produto. Verificaram que as simulações convergiram e exibiram continuidade nas previsões para todas as séries de variáveis simuladas, sendo o modelo estável nessas condições. Então concluíram sobre a possibilidade do uso do modelo cibernético desenvolvido na simulação do crescimento de leveduras em meios complexos de fermentação sob condições ambientais variadas.

2.2.3.2 Modelos híbridos

Patnaik (2009a) discorreu em sua revisão bibliográfica sobre a dificuldade da descrição quantitativa do comportamento complexo de sistemas microbianos empregando modelos

fenomenológicos. Apresentam como alternativa os modelos inteligentes, englobando métodos de inteligência artificial (redes neuronais, sistemas especialistas e algoritmos genéticos) e de modelagem cibernética. Discutiu que, apesar da inteligência artificial e do modelo cibernético estarem se mostrando mais efetivos em muitas aplicações onde os modelos fenomenológicos são inadequados, também apresentam seus pontos fortes e seus pontos fracos. Assim, destacam que este reconhecimento tem levado ao desenvolvimento de sistemas híbridos pela combinação de duas ou mais aproximações para diferentes aspectos de um sistema microbiológico. No entanto, reconheceu que o projeto ótimo de sistemas híbridos ainda permanece heurístico. Concluiu então que, embora os sistemas híbridos tenham sido mais efetivos que seus componentes isoladamente, ainda não há metodologia sistemática para delineamento do melhor sistema híbrido para uma dada aplicação, de forma a serem hábeis para manter a configuração ótima do processo ao longo de sua duração total.

Os modelos híbridos, também conhecidos como caixa-cinza, surgem da junção das equações mecanicistas com estratégias caixa-preta, visando um modelo dinâmico para o bioprocesso que seja eficiente, fácil e possível de ser desenvolvido (Zorzetto et al., 2000 e Komives e Parker, 2003).

A modelagem híbrida tem sido reconhecida como uma alternativa quanto a custo e efetividade para análise de bioprocessos (Psichogios e Ungar, 1992; Henriques et al., 1999; Zorzetto et al., 2000; Oliveira, 2004).

As limitações dos modelos neuronais como, por exemplo, a dificuldade de extrapolação, naturalmente levaram ao desenvolvimento de modelos híbridos, nos quais são integrados a outros conhecimentos representativos do processo (Fonseca et al., 2004).

O conhecimento fenomenológico não é a única fonte relevante de conhecimento, há também outras fontes, considerando heurísticas e informações ocultas na base de dados, que são consideradas valiosos recursos complementares para desenvolvimento de modelo. Este é particularmente um ponto importante para sistemas complexos para os quais o conhecimento mecanicista é ausente. Logo, como modelos híbridos integram mais conhecimentos que os modelos clássicos, mais alta acurácia com menos iterações e baixo custo de desenvolvimento podem ser alcançados (Oliveira, 2004).

A estrutura de modelo híbrido mais amplamente adotada é baseada nas equações de balanço de massa, como no tradicional modelo fenomenológico, mas a cinética de reação é modelada com rede neuronal artificial (Psichogios e Ungar, 1992; Oliveira, 2004).

Psichogios e Ungar (1992) propuseram um modelo matemático híbrido-neuronal/fenomenológico, pela inserção de rede neuronal dentro de modelo fenomenológico para representar parâmetros de difícil descrição.

Baughman e Liu (1995) abordaram os princípios básicos de redes especialistas, a qual é um modelo híbrido composto por sistema especialista e rede neuronal artificial. Para os autores as redes especialistas compensam as limitações individuais dos sistemas especialistas e das redes neuronais, propondo sua estrutura na Figura 2.12.

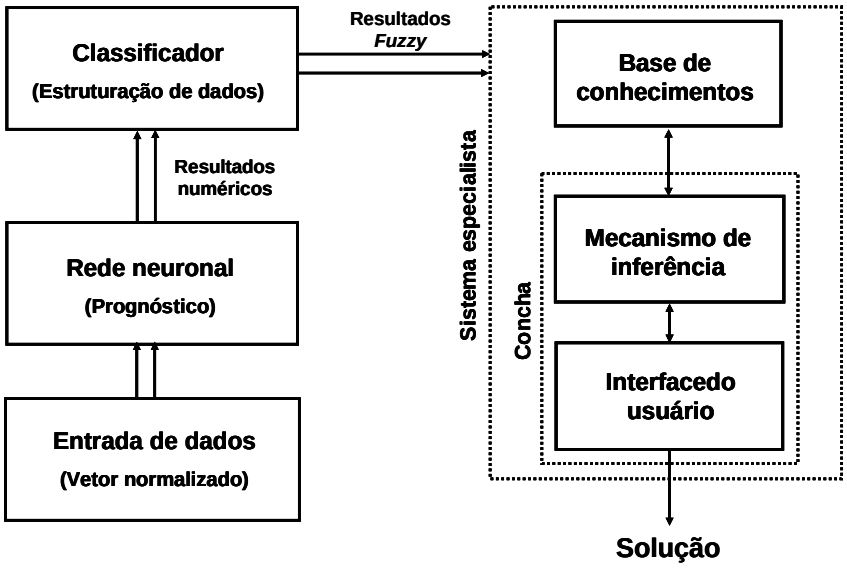


Figura 2.12 – Ilustração de uma rede especialista. Adaptado de Baughman e Liu (1995)

Descrevendo que os sistemas especialistas usualmente incorporam o conhecimento através de relações, Baughman e Liu (1995) fizeram uma analogia das redes especialistas com o cérebro humano. Nesta analogia consideram-na como um modelo para a arquitetura de processamento em inteligência artificial nos moldes seguintes: (a) o hemisfério esquerdo do cérebro é um processador sequencial baseado em funções lógicas (regras, conceitos e cálculos); (b) o hemisfério direito constitui-se em um processador paralelo baseado na percepção visual (*gestalt function* – imagens, figuras e controles). Então, por esta analogia, o sistema especialista simula as funções do raciocínio qualitativo do lado esquerdo do cérebro enquanto a rede neuronal simula a capacidade de modelagem quantitativa do lado direito do cérebro. Por fim descreveram a aplicação em um processo de separação multicomponentes de mistura de proteínas.

Henriques et al. (1999a e b) estudaram a produção alcoólica em batelada alimentada por *Zymomonas mobilis*, desenvolveram modelos híbridos neuronal combinado com balanço de massa fenomenológico e aplicaram-nos para resolver o problema de otimização do processo.

Komives e Parker (2003) relataram que para a incorporação de informações de processo ao modelo híbrido, uma equação diferencial de estimação foi inserida através de neurônios funcionais. O modelo de estimação incorporava medidas de pH, temperatura, densidade específica e turbidez, que formam medidas *on-line* durante a fermentação de cerveja. Esta aproximação demonstrou uma redução de 46% na necessidade de dados de treinamento e eliminou decisões incorretas de controle pelo modelo híbrido. Ainda, ao compararem o desempenho do modelo híbrido com o de redes FFN (*feedforward* - função de ativação sigmoidal) e RBF (função de ativação gaussiana), os autores verificaram que modelos híbridos foram superiores aos modelos "caixa-preta" em sua predição.

Patnaik (2003) relatou que, sob condições de produção, fermentações de β-galactosidase recombinante por *Escherichia coli* são susceptíveis às misturas imperfeitas do caldo de cultivo e aos ruídos presentes na linha de alimentação de substrato, tornando difícil a proposição de um modelo matemático que expressasse as variações nas concentrações de uma maneira simples e acurada. Desta maneira, combinou um modelo de rede neuronal híbrido com redes neuronais artificiais para filtragem dos ruídos e controle do biorreator. Os resultados mostraram que o HNN (*hybrid neural networks*) produz perfis mais suavizados para concentrações intracelular e extracelular.

Fonseca et al. (2004) relataram que desde a proposição de Psichogios e Ungar em 1992, modelos híbridos deste tipo vêm sendo adotados para diversas aplicações, tais como biorreatores, reatores químicos, reatores de polimerização, reatores metalúrgicos, secadores, vasos pressurizados, colunas de destilação, etc, sendo atualmente considerado uma técnica de padrão industrial.

Fonseca et al. (2004) empregaram um modelo híbrido-fenomenológico/neuronal para descrever os termos cinéticos do processo de produção de sorbitol e de ácido glucônico usando células de *Zymomonas mobilis* imobilizada, concluindo que o ajuste do modelo proposto foi hábil para generalizar a partir dos dados experimentais de treinamento.

Boareto (2005) e Boareto et al. (2007) trabalharam na modelagem matemática do processo de produção de lípase por *Candida rugosa*, operado em batelada alimentada, estudado por Gordillo (1996). A autora propôs um modelo matemático fenomenológico estruturado para a representação das variáveis de processo – concentrações celular, de substrato, de lípase extra e intracelulares. Para tanto, os autores testaram redes neuronais do

tipo linear, RBF, MLP e um modelo híbrido fenomenológico/neuronal. O modelo híbrido fenomenológico/neuronal foi desenvolvido integrando parte do modelo fenomenológico proposto por Gordillo (1996) à rede MLP. Os autores concluíram que as redes neuronais e o modelo híbrido descreveram com muita precisão o comportamento do bioprocesso, mostrando em todas as etapas maior eficiência em relação ao modelo fenomenológico estruturado desenvolvido por Gordillo (1996). Além disso, constataram que o modelo híbrido destacou-se por sua flexibilidade e possibilidade de emprego em estudos de otimização de processos fermentativos. Vislumbraram também a possibilidade deste servir como sensor virtual (*soft sensor*) ao longo de uma fermentação em batelada alimentada, fornecendo, a partir de uma condição inicial e das informações do CER experimental, predições do comportamento dos substratos (extra e intracelulares), da concentração celular e da concentração das enzimas (extra e intracelulares).

Patnaik (2009b) utilizou modelos cognitivos na otimização da produção microbiana de poli-β-hidroxibutirato (PHB) em um biorreator de dispersão ótima, empregando culturas simples de *Ralstonia eutropha* e co-cultura de *Ralstonia eutropha* e *Lactobacillus delbrueckii*. O biorreator foi operado em batelada alimentada. Para ambas as culturas o autor testou os modelos fenomenológicos, neuronal e cibernético. Verificou que a aproximação empregando redes neuronias foi superior ao modelo cibernético, que por sua vez apresentou melhor resultado em relação ao modelo fenomenológico. Também concluíram que a co-cultura superou a cultura simples. Finalizando, discutiu a possibilidade do modelo híbrido combinado oferecer uma melhor opção para a co-cultura, visto a existência de pontos fortes e pontos fracos para os três modelos estudados.

Wong et al. (2010) estudaram a aplicabilidade de estratégia de sucessivas linearizações com controle preditivo baseado em modelo para a produção de etanol. Para tanto propuseram uma versão especial de modelos híbridos cibernéticos / fenomenológico de forma a permite precisão nas simulações a serem realizadas. O estudo foi conduzido em processo contínuo com leveduras *Saccharomyces* 1400 (pLNH33), capazes de co-fermentar glicose e xilose, os principais açúcares fermentáveis resultante do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

Song e Ramkrishna (2010) empregaram o modelo híbrido cibernético desenvolvido por Song et al. (2009), de forma a explorarem a possibilidade de melhorar a conversão de açúcares provenientes de materiais lignocelulósicos (glicose e xilose) a bioetanol em biorreator com cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*. Relataram que o modelo utilizado provê uma descrição precisa do metabolismo desta levedura recombinante, devido a sua característica única de representação da regulação celular. Concluíram ser provável que o

aumento real da produtividade do etanol obtido pode ser menor do que o previsto no estudo teórico por eles realizado, uma vez que a inibição por efeito de alguns produtos químicos, tais como furfural o etanol podem se significativos, e não foram considerados.

Saraceno et al. (2010) realizaram simulações de dados experimentais obtidos a partir de fermentações alcoólicas conduzidas em fermentador de 2 L operado em batelada e em condições anaeróbias. O substrato utilizado foi soro de ricota convertido a etanol pela ação de leveduras *Kluyveromices marxianus*. Para tanto, desenvolveram um modelo híbrido neuronal acoplando redes neuronais artificiais e equações de balanço de massa para concentrações de lactose, de etanol e de células. Verificaram que o modelo híbrido proposto foi capaz de descrever de forma precisa o comportamento do sistema, prevendo os perfis de concentração de lactose, de células e de etanol com porcentagem média de erro inferior a 10%.

Verificando a literatura científica não foi encontrado até o presente momento nenhum estudo de aplicação de técnica de modelagem híbrida com abordagem cibernética / neuronal (MHCN) em processo de fermentação alcoólica tendo como agente biológico bactérias *Zymomonas mobilis*. Esta proposta de modelagem surge como uma forma alternativa de descrever corretamente o progresso da fermentação, com capacidade de predição das variáveis de estado de concentração de etanol, de células e de glicose. Além disso, permite estimar as variáveis não medidas experimentalmente como a concentração de lactato e a concentração das enzimas chaves das três rotas metabólicas preponderantes do processo de produção de etanol. Ademais, o MHCN pode ser empregado como sensor virtual (*softsensor*).

CAPÍTULO 3

DADOS EXPERIMENTAIS E METODOLOGIA

No presente capítulo são apresentados as metodologias e os dados experimentais empregados no desenvolvimento deste trabalho.

3.1 PROGRAMAS COMPUTACIONAIS

Para a implementação do modelo matemático e para as simulações, os programas computacionais descritos a seguir foram utilizados.

3.1.1 Programa para treinamento das redes neuronais artificiais

O treinamento das RNA foi realizado empregando o Pacote Statistica® da StatSoft, Inc, versão 8.0.

3.1.2 Programa para implementação do modelo híbrido cibernético/neuronal

O modelo foi implementado no programa Matlab® da MathWorks, Inc, versão 6.0.

3.2 DADOS EXPERIMENTAIS

Os dados experimentais provêm da tese de doutorado de Camêlo (2009). Para o desenvolvimento do presente estudo torna-se necessário compreender o processo continuo de produção de etanol empregando *Zymomonas* mobilis pesquisado por Camêlo (2009). Assim serão relatadas as características deste sistema fermentativo e apresentados os gráficos contendo os dados experimentais correspondentes.

3.2.1 Processo de produção de bioetanol

3.2.1.1 Características gerais

Camêlo (2009) utilizou como micro-organismo para produção de bioetanol as bactérias *Zymomonas mobilis* Ag11 DAUFPE 198, a qual foi escolhida por não flocular (Pallha, 1987 – *apud* Camêlo, 2009).

O meio de cultura empregado por Camêlo (2009) foi o mesmo meio aplicado por Li (1995 – *apud* Camêlo, 2009), cuja composição segue na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Composição do meio de crescimento de LI (1995)

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO (g L^{-1})
Glicose (VETEC)	165
Extrato de levedura (VETEC)	15
KH_2PO_4 (VETEC)	1,5
$(NH_4)_2SO_4$ (VETEC)	1,5
$MgSO_4 . 7H_2O$ (VETEC)	0,75

Fonte: Camêlo (2009)

Quando se formulou meios com diferentes concentrações de glicose, a concentração dos outros componentes foi determinada a partir da glicose (Camêlo, 2009). Tal alteração na concentração da fonte de carbono destinou-se ao estudo das possíveis dinâmicas das fermentações.

Em todos os experimentos partiu-se de um inóculo previamente crescido no próprio meio de fermentação. O volume foi correspondente a 10% do volume do fermentador, sendo transferido após 18 h para o fermentador contendo 90% de meio de crescimento. Para as fermentações com concentração de 200 g L^{-1} de glicose no meio reacional, o inóculo foi preparado em 10 mL contendo 100 g L^{-1} de glicose, sendo transferido sucessivamente para frascos contendo meio com 150 g L^{-1} e 200 g L^{-1} de glicose contendo 10% do volume final.

Camêlo (2009) verificou em alguns trabalhos (Camêlo, 2004; Daugulis et al., 1997) a ocorrência de oscilações em fermentações contínuas quando a concentração de glicose era 200 g L^{-1}. Assim, para verificar o comportamento dinâmico das fermentações com *Zymomonas mobilis*, Camêlo (2009) realizou 2 fermentações descontínuas nesta concentração de glicose. Verificou que nem sempre a adaptação da célula a esta concentração ocorria de forma favorável, necessitando de adaptação em concentrações gradativamente crescente de meio. As fermentações descontínuas foram conduzidas em *Shaker* Nova Ética Incubadora 430, a T = 30ºC, 150rpm, S_0 = 200 g L^{-1}, pH = 5,0, com duração de 27 h cada.

3.2.1.2 Operação do processo em modo contínuo

Camêlo (2009) realizou as fermentações contínuas para avaliar possíveis comportamentos dinâmicos diante de diferentes condições de concentração de glicose no meio de crescimento [G_0], concentração de glicose na linha de alimentação [G_F], adição de etanol exógeno [E_{ad}] para analisar os efeitos de tais condições nas proteínas das bactérias *Z. mobilis*. Foram realizadas 11 fermentações contínuas numeradas de FC01 a FC11.

Para tanto, utilizou-se o reator B. Braun Biotech Internacional, modelo BIOSTAT®B, com as características apresentadas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Características de operação do reator BIOSTAT

Características	Valores
Volume útil ($V_{Útil}$)	2 L
Volume de trabalho (V_{Trab})	1 L
Temperatura (T)	30ºC
Agitação	150 rpm
pH	5,0

Tendo em vista a tendência da diminuição do pH durante o crescimento das bactérias, foi controlado com adição de KOH (1M). O fermentador era provido de controle de agitação, temperatura e pH.

As fermentações contínuas (FC) foram realizadas com a taxa de diluição D = 0,06 h^{-1}. O valor da taxa de diluição foi escolhido a partir da análise de diagramas de bifurcação, por permitir atingir estados estacionários e oscilações. Com este valor de taxa de diluição a autora variou apenas a concentração de glicose no meio reacional (G_0) e na alimentação (G_F), sendo a vazão de alimentação (F) de 1 mL min^{-1} = 0,06L h^{-1}. Desta forma, o tempo de residência no biorreator foi de 16,7 h (τ). A vazão de alimentação foi controlada por uma bomba peristáltica, exceto na fermentação contínua FC09 onde a alimentação foi efetuada por pulso, conforme descrito na Tabela 3.3.

Todas as fermentações contínuas foram iniciadas após a fase estacionária da concentração celular ter sido atingida numa fermentação em batelada. Por isso as prévias fermentações descontínuas foram feitas a 200g L^{-1} de glicose no meio nutricional, para visualizar a adaptação das células nessa concentração.

A Tabela 3.3 apresenta as condições operacionais das fermentações contínuas realizadas por Camêlo (2009).

Na Tabela 3.3 a fermentação FC06_08 está compreendida no período de tempo t = [0,0; 130,0]h. A FC08 consiste na continuação da fermentação FC06 com adição de etanol 99,5% (v/v) a partir de t = 94h, sendo a bomba desligada após 9 h de adição, porque a concentração de etanol no biorreator atingiu valores bastante altos, sendo letal para as células (bomba desligada em t = 103 h). Como consequência da elevada concentração de etanol, o sistema atingiu a condição de *wash out* a partir de t = 97 h - *wash out*: t =[97, 130] h. O fenômeno de "lavagem" completa do reator ocorreu a partir de 112 h. Para facilitar a aplicação dos dados neste estudo, essa fermentação é apresentada na forma de FC06 e FC08. A FC06 está compreendida no intervalo [0,0; 94,0) h e a FC08 insere-se no intervalo [94; 130,0] h.

Pode observar-se na Tabela 3.3 há a adição de etanol exógeno empregando bomba peristáltica (D = 0,02 h^{-1}) na fermentação FC08 com concentração de 99,5% (v/v), e nas fermentações FC10 e FC11 com concentração de 75,0% (v/v). Já na FC09, diferentemente dos demais experimentos, a adição de etanol exógeno com concentração de 75,0% (v/v) é efetuada por pulso a cada 2 h no intervalo de tempo [40; 44] h.

Como discutido nos parágrafos anteriores deste subitem, a adição de etanol exógeno na FC08 ocorreu com alta concentração (99,5% v/v) – ocasionando o fenômeno de lavagem do reator a partir de 97 h – e na FC09 foi realizada por pulso a cada 2 h durante 4 h. Dada às condições diferenciadas de adição de etanol exógeno nas FC08 e FC09 em relação às demais fermentações contínuas, optou-se por não utilizá-las nesta pesquisa.

Tabela 3.3 - Condições operacionais das fermentações contínuas - FC01 a FC11 (Camêlo, 2009)

FC	Tempo (h)	D (h^{-1})	D_e (h^{-1})	G_O (g L^{-1})	G_F (g L^{-1})	Modo de Operação	Obs
FC01	0,00 – 18,00	0,00	0	100	0	Batelada	-
	18,00 – 81,00	0,06	0	-	100	Contínuo	Tende ao estado estacionário
FC02	0,00 – 22,00	0,00	0	100	0	Batelada	-
	22,00 – 99,00	0,06	0	-	200	Contínuo	Tende ao estado estacionário
FC03	0,00 – 16,00	0,00	0	150	0	Batelada	-
	16,00 – 71,00	0,06	0	-	150	Contínuo	Tende ao estado estacionário
FC04	0,00 – 24,00	0,00	0	150	0	Batelada	-
	24,00 –95,00	0,06	0	-	200	Contínuo	Tende ao estado estacionário
FC05	0,00 – 36,50	0,00	0	200	0	Batelada	-
	36,50 – 104,50	0,06	0	-	200	Contínuo	Tende ao comportamento oscilatório

Continuação da Tabela 3.3

FC	Tempo (h)	D (h^{-1})	D_e (h^{-1})	G_O ($g\ L^{-1}$)	G_F ($g\ L^{-1}$)	Modo de Operação	Obs
FC06	0,00 – 37,00	0,00	0	200	0	Batelada	-
	37,00 –94,00	0,06	0	-	200	Contínuo	Tende ao comportamento oscilatório
FC08	94,00 - 103,00	0,06	0,02	-	200	Contínuo	Adição de etanol exógeno com bomba peristáltica (99,5% v/v)
	103,00 – 130,00	0,06	0	-	200	Contínuo	Sistema atingiu o "Wash out"; sem adição de etanol exógeno
FC07	0,00 – 63,00	0,00	0	200	0	Batelada	-
	63,00 – 124,00	0,06	0	-	200	Contínuo	Tende ao comportamento oscilatório
	124,00 – 147,00	0,06	0	-	300	Contínuo	Tende estado estacionário
FC09	0,00 – 22,00	0,00	0	100	0	Batelada	-
	22,00 – 40,00	0,06	0	-	200	Contínuo	-
	40,00 - 44,00	0,06	0	-	200	Contínuo	Adição de etanol exógeno a cada 2h, sem bomba peristáltica, por 4h (75,0% v/v)
	44,00 – 60,00	0,06	0	-	200	Contínuo	Sem a adição de etanol exógeno
	44,00 – 125,00	0,06	0	-	200	Contínuo	Estado estacionário
FC10	0,00 – 23,00	0,00	0	100	0	Batelada	-
	23,00 – 48,00	0,06	0	-	100	Contínuo	-
	48,00 - 65,00	0,06	0,02	-	100	Contínuo	Adição de etanol exógeno com bomba peristáltica (75,0% v/v)
	65,00 - 80,00	0,06	0	-	100	Contínuo	Sem a adição de etanol exógeno
	80,00 – 133,00	0,06	0	-	100	Contínuo	Estado estacionário após t=80h
FC11	0,00 – 23,00	0,00	0	100	0	Batelada	-
	23,00 – 48,00	0,06	0	-	200	Contínuo	-
	48,00 - 65,00	0,06	0,02	-	200	Contínuo	Adição de etanol exógeno com bomba peristáltica (75,0% v/v)
	65,00 - 82,00	0,06	0	-	200	Contínuo	Sem a adição de etanol exógeno
	82,00 – 133,00	0,06	0	-	200	Contínuo	Estado estacionário após t=82h

3.2.1.3 Obtenção dos dados experimentais

Os dados experimentais foram obtidos analiticamente por Camêlo (2009). A autora relata que em função da dificuldade da condução dos processos contínuos, não foram realizadas réplicas de cada experimento, logo os erros experimentais não foram obtidos.

Para entender a condução experimental, os experimentos de Camêlo (2009) podem ser divididos em 3 grupos, conforme o objetivo da investigação:

- **FC01 a FC07**: observar possíveis comportamentos dinâmicos, diante de condições diversas de concentração de glicose no meio de crescimento e na linha de alimentação;
- **FC06_08, FC10 e FC11**: como se observou a influência dinâmica do etanol nos comportamentos das fermentações anteriores (FC01 a FC07), estes novos experimentos foram levados a termo para analisar se os comportamentos dinâmicos de oscilações seriam causado pelo fator de tempo de exposição ao alto teor de etanol gerado nas fermentações com meio de glicose a 200 g L^{-1} ou somente pelo alto teor de etanol gerado nessas condições de concentração de glicose;
- **FC09**: verificar especificamente a influência do tempo CURTO de exposição a alto teor de etanol exógeno, contudo não sendo superior a 100 g L^{-1} para evitar o aparecimento do forte fator de inibição, conforme relatado na literatura.

As FC01 a FC07 pode ainda ser subdividido em 2 subgrupos:

- **FC01 a FC04**: com G_0 = 100 e 150 g L^{-1} e tendo G_F = 100, 150 e 200 g L^{-1}. Não sendo observado comportamento oscilatório, a autora empregou a concentração de 200 g L^{-1} de glicose no meio de crescimento para a etapa de batelada e contínua, conforme observara em alguns trabalhos da literatura (Ghommidh et al., 1989; Bruce et al., 1991; Daugulis et al., 1997; Camêlo, 2004). Assim realizou as FC05 a FC07.
- **FC05 a FC07**: com G_0 = 200 g L^{-1} e tendo G_F = 200 e 300 g L^{-1}. Nestas fermentações foram observados comportamentos oscilatórios como planejado.

Na Tabela 3.4 são apresentadas as quantidades de dados experimentais para cada fermentação realizada, distinguindo as etapas (fases da operação) onde estas quantidades foram contabilizadas.

Tabela 3.4 – Quantidade de dados experimentais obtidos por Camêlo (2009) para cada fermentação alcoólica operada em processo contínuo empregando *Zymomonas mobilis*

	Quantidade de dados experimentais	
Fermentações	**Etapa de operação em batelada e contínuo com adição de etanol exógeno**	**Etapa de operação em contínuo sem adição de etanol exógeno**
FC01	25	19
FC02	17	11
FC03	21	16
FC04	28	20
FC05	37	25
FC06	27	16
FC08	12	0
FC07	41	17
FC09	33	6
FC10	28	5
FC11	28	5
TOTAL	**291**	**140**

Como pode ser verificado na Tabela 3.3, os dados experimentais correspondentes às fermentações contínuas realizadas por Camêlo (2009) apresentam dois comportamentos dinâmicos característicos na fase contínua de operação, quais sejam, tendência ao estado estacionário ou ao comportamento oscilatório. Desta forma, para exemplificar as dinâmicas, serão apresentadas a seguir as figuras referentes a FC01 – tendência ao estado estacionário (correlata dinâmica das FC02, 03, 04, 08, 10 e 11) – e a FC05 – tendência ao comportamento oscilatório (análoga dinâmica das FC06 e 07), exibindo os pontos experimentais referentes à concentração de células, concentração de glicose e concentração de etanol. As demais figuras extraídas da tese de Camêlo (2009) relativas as FC02, 03, 04, 06, 07, 10 e 11 estão dispostas no Anexo C.

Com relação ao comportamento oscilatório constado nas curvas referentes às variáveis de estado das FC05, 06 e 07, poderia ser assumida a hipótese da competição dinâmica entre as três rotas metabólicas prover a força motriz para as oscilações, conforme postulado por Jones e Kompala (1999) no estudo da produção de etanol utilizando processo em batelada e contínuo por *Saccharomyces cerevisiae*. Tal proposta indica uma alternativa para investigação da origem das oscilações verificadas no processo conduzido com *Zymomonas mobilis*.

A Figura 3.1 apresenta dos dados experimentais relativos à FC01.

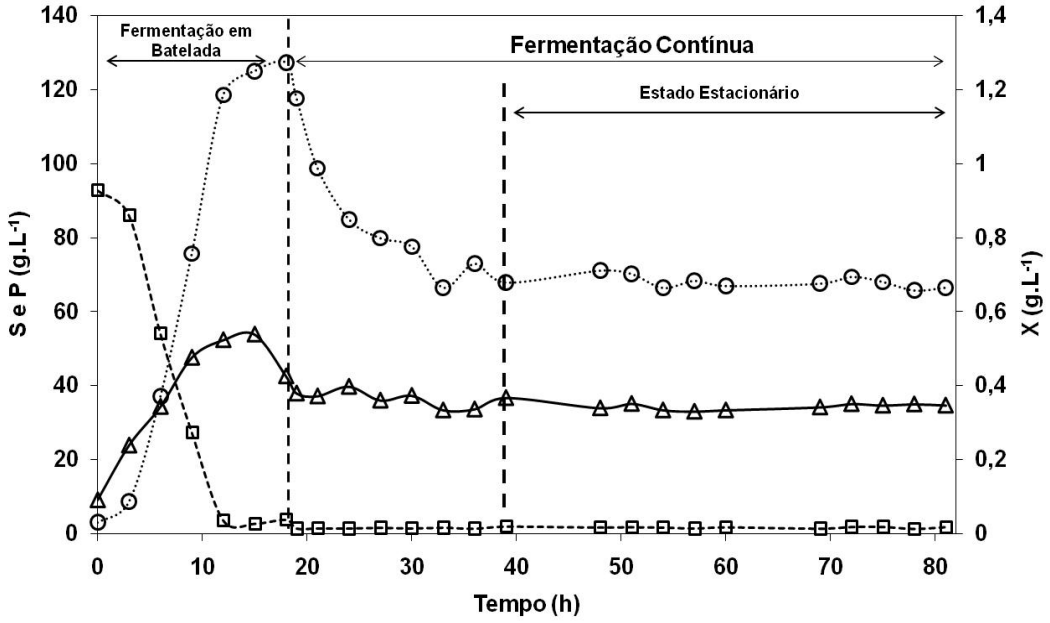


Figura 3.1– Fermentação Contínua (FC01) – (⊙) Células (X), (-⊡-) Glicose (S), (△) Etanol (P) (Camêlo, 2009)

A Figura 3.2 apresenta dos dados experimentais referentes à FC05.

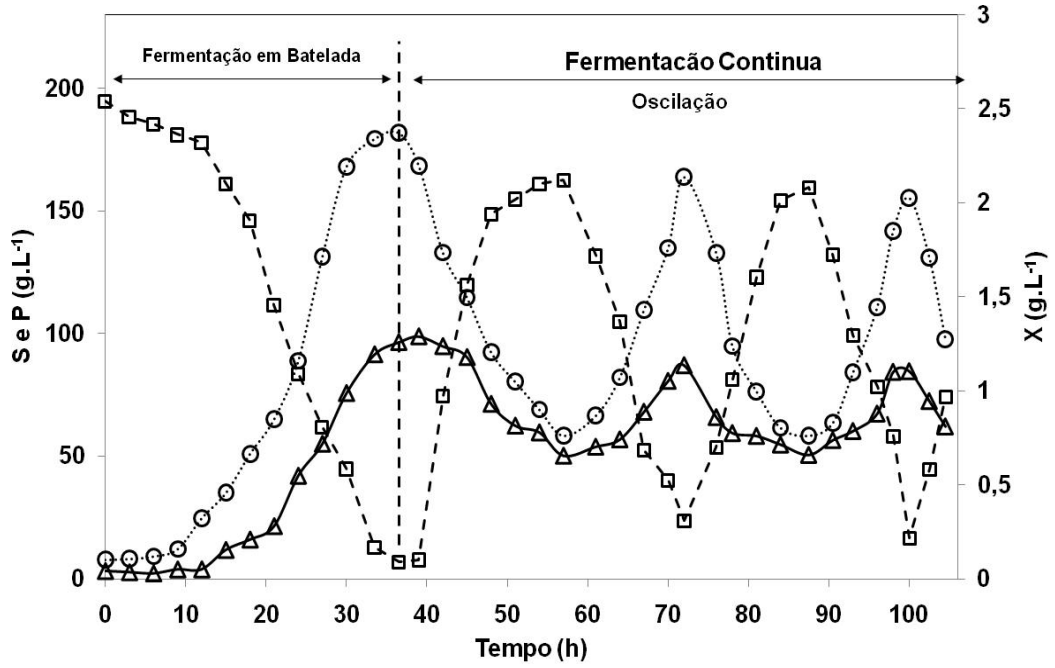


Figura 3.2– Fermentação Contínua (FC05) – (⊙) Células (X), (-⊡-) Glicose (S), (△) Etanol (P) (Camêlo, 2009)

A Tabela 3.5 sintetiza os principais parâmetros relativos a cada corrida experimental.

Tabela 3.5 - Valores de μ, $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ das fermentações FC01 a FC11

Fermentação	μ_{Bat} (h^{-1})	Batelada		Contínua	
		$Y_{X/S\ Bat}$ ($g.g^{-1}$)	$Y_{P/S\ Bat}$ ($g.g^{-1}$)	$Y_{X/S}$ ($g.g^{-1}$)	$Y_{P/S}$ ($g.g^{-1}$)
FC01	0,299	0,014	0,497	6,907 (± 0,175)*10^{-3}	3,500 (± 0,110)*10^{-1}
FC02	0,288	0,014	0,384	4,437 (± 0,198)*10^{-3}	2,219 (± 0,165)*10^{-1}
FC03	0,281	0,011	0,336	5,852 (± 0,115)*10^{-3}	3,464 (± 0,051)*10^{-1}
FC04	0,263	0,013	0,235	8,612 (± 0,192)*10^{-3}	3,045 (± 0,113)*10^{-1}
FC05	0,102	0,014	0,486	Ver Fig 3.3	Ver Fig 3.3
FC06	0,093	0,012	0,534	Ver Fig 3.4	Ver Fig 3.4
FC07	0,145	0,014	0,477	Ver Fig 3.5	Ver Fig 3.5
FC08	0,093	0,012	0,495	-	-
FC09	0,247	0,014	0,463	-	-
FC10	0,247	0,018	0,447	-	-
FC11	0,223	0,015	0,467	-	-

Os fatores $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ para a etapa operada no modo contínuo foram calculados considerando estado estacionário, assumindo μ = D.

Para as fermentações FC05, FC06 e FC07 que tendem ao comportamento oscilatório, os valores dos fatores de conversão $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ do modo contínuo são apresentados nas Figura 3.3, 3.4 e 3.5. Já para as fermentações com adição de etanol exógeno FC08, FC09, FC10 e FC11 os valores não foram apresentados pela autora.

A Figura 3.3 apresenta os fatores de conversão da FC05.

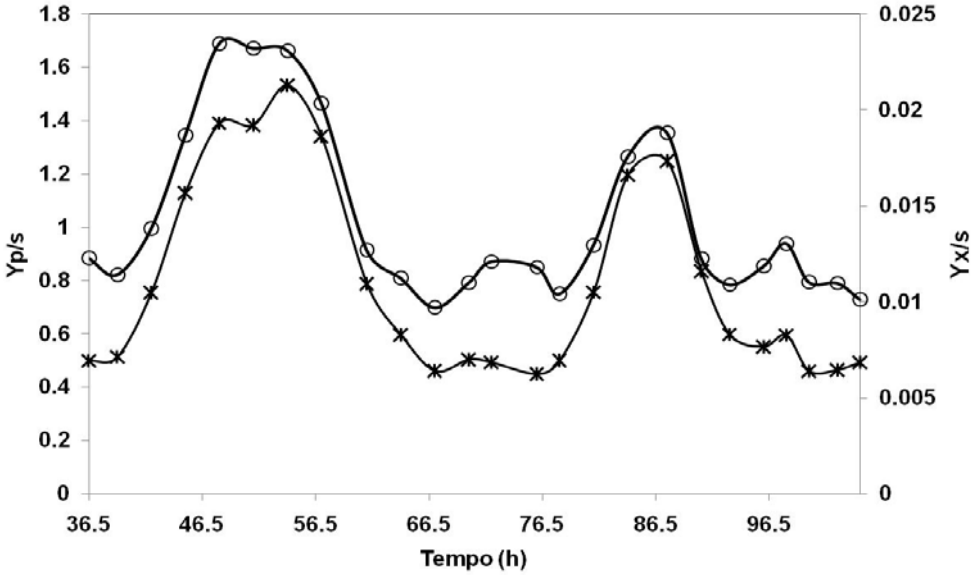


Figura 3.3 – Rendimentos (—o—) $Y_{X/S}$ e (—*—)$Y_{P/S}$ na etapa contínua da Fermentação FC05 em função do tempo na etapa contínua do processo (Camêlo, 2009)

A Figura 3.4 exibe as curvas correspondentes aos fatores de conversão da FC06.

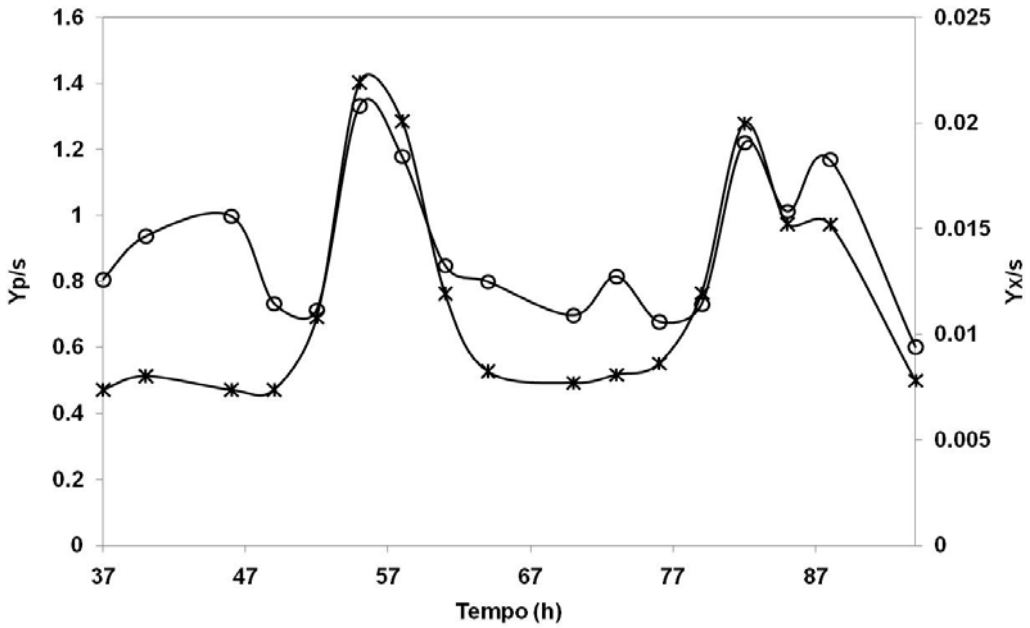


Figura 3.4 – Rendimentos (—o—) $Y_{X/S}$ e (—*—)$Y_{P/S}$ na etapa contínua da Fermentação FC06 em função do tempo na etapa contínua do processo (Camêlo, 2009)

Na Figura 3.5 são apresentados os fatores de conversão da FC07.

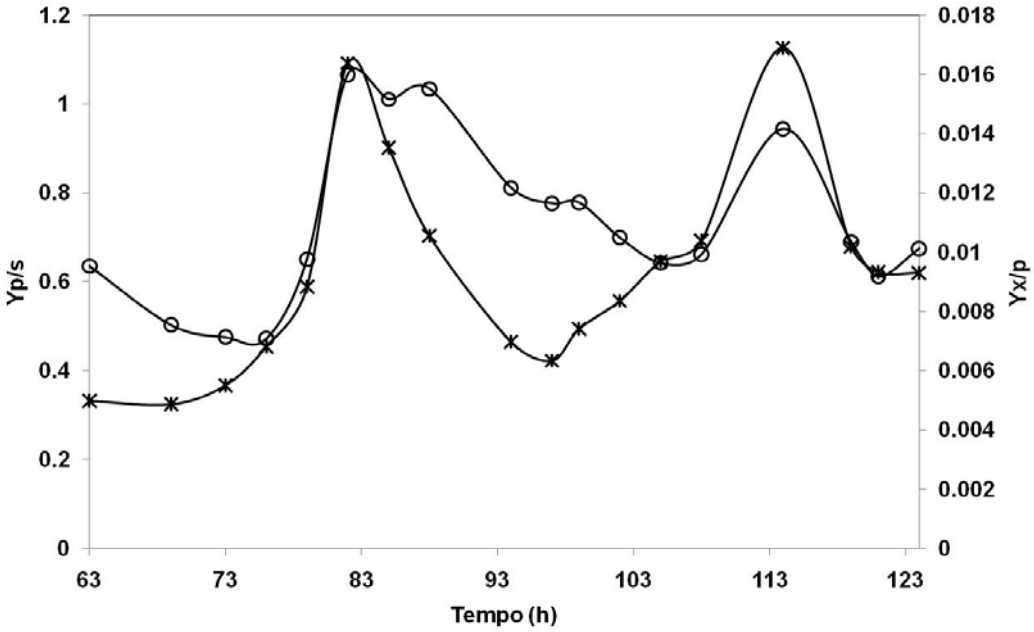


Figura 3.5– : Rendimentos (—o—) $Y_{X/S}$ e (—*—)$Y_{P/S}$ na etapa contínua da Fermentação FC07 em função do tempo na etapa contínua do processo (Camêlo, 2009)

Depois de estudos preliminares, tomando em conta as características de cada fermentação realizada por Camêlo (2009) e com o objetivo de verificar a dinâmica do processo fermentativo contínuo, decidiu-se por selecionar somente os dados correspondentes

à etapa de operação em contínuo sem adição de etanol exógeno (Tabela 3.4). Além disso, a etapa de adição de etanol exógeno teve a finalidade específica de investigar a influência de altas concentrações de etanol em meios com 200 g L^{-1} de glicose, constituindo em condição muito particular, portanto pouco usual nos processos reais.

3.3 METODOLOGIA PARA INTERPOLAÇÃO DE DADOS

A interpolação dos dados experimentais foi procedida empregando a função *spline* cúbica. Esta metodologia já fora apresentada e aplicada por Boareto (2005).

A aproximação por função *spline* cúbica é a mais comum utilizando polinômios de partes criteriosas, empregando polinômios cúbicos entre cada par sucessivo de nós. A construção do *spline* cúbico não garante, entretanto, que as derivadas do interpolador concordem com as da função que está sendo aproximada, mesmo em seus nós (Burden e Faires, 2003 e Hanna e Sandall, 1995).

Não obstante, segundo Dieguez (1992), o método de interpolação por *spline* cúbico emprega partes de polinômios de grau baixo e fixo (grau 1, 2 e 3), passando por uma quantidade de pontos igual a este grau mais uma unidade. Para isso, o intervalo total de dados experimentais é dividido em subintervalos contendo a quantidade de pontos necessários. Para evitar pontos angulosos nas extremidades dos subintervalos que causam não concordâncias, os polinômios utilizados se sobrepõem iniciando um em cada ponto.

Por definição de *spline* cúbico, tem-se, dada uma função f definida em [a, b] e um conjunto de nós $a = x_o < x_1 < \cdots < x_n = b$, um *spline* cúbico interpolador S para f é uma função que satisfaça as seguintes condições (Burden e Faires, 2003):

a) $S(x)$ é um polinômio cúbico, indicado por $S_j(x)$, no subintervalo $[x_j, x_{j+1}]$ para cada $j = 0, 1, \cdots, n-1$;

b) $S(x_j) = f(x_j)$ para cada $j = 0, 1, \cdots, n$;

c) $S_{j+1}(x_{j+1}) = S_j(x_{j+1})$ para cada $j = 0, 1, \cdots, n-2$;

d) $S'_{j+1}(x_{j+1}) = S'_j(x_{j+1})$ para cada $j = 0, 1, \cdots, n-2$;

e) $S''_{j+1}(x_{j+1}) = S''_j(x_{j+1})$ para cada $j = 0, 1, \cdots, n-2$;

f) um dos seguintes conjuntos de condições de contorno é satisfeito:

(i) $S''(x_o) = S''(x_n) = 0$ (contorno livre ou natural);

(i) $S'(x_o) = f'(x_o)$ e $S'(x_n) = f'(x_n)$ (contorno restrito).

Para a implementação da função de interpolação empregou-se o comando "*SPLINE*" do programa MATLAB®, sendo assim definida:

$$YY_S = SPLINE(X_S, Y_S, XX_S) \tag{3.1}$$

onde: YY_s - variável dependente interpolada; X_s - variável independente experimental; Y_s - variável dependente experimental e XX_s - variável independente interpolada.

A interpolação das variáveis experimentais – concentrações de células, glicose e etanol, foi feita em função do tempo amostral em intervalos de tempo fixos de 0,5 h.

3.4 PROPOSTA DO MODELO CIBERNÉTICO

A proposta do modelo cibernético deste trabalho baseou-se no modelo utilizado por Jones e Kompala (1999), o qual fora aplicado ao processo contínuo de produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Para tanto, o modelo da literatura foi adaptado às características das bactérias *Zymomonas mobilis* e às condições do processo definidas por Camêlo (2009). A descrição do modelo de Jones e Kompala (1999) encontra-se no Apêndice B. O modelo cibernético proposto nesta tese está descrito no Capítulo 4.

3.5 TREINAMENTO DAS REDES NEURONAIS

Para o treinamento das redes os dados experimentais de Camêlo (2009) foram interpolados de modo a gerar quantidade suficiente de dados históricos. Dado ao comportamento oscilatório das variáveis de estado verificadas em certas condições de processo foram também inseridos elementos de atraso unitário (1 e 2 atrasos dinâmicos) para conferir comportamento dinâmico não linear as redes neuronais, como discutido por Haykim (2001), tornando-as capazes de responder a esse padrão comportamental do sistema. Neste trabalho, para estudo do comportamento dinâmico da etapa operada de forma contínua, foram utilizados somente os dados da fase contínua de processo sem a adição de etanol exógeno no treinamento das RNA.

Também, dado as condições de condução de processo das FC08 e FC09, discutidas ao final da sessão 3.2.1.2, estas não foram empregadas para o treinamento das RNA. Assim, foram utilizados no treinamento os dados interpolados das FC01, FC02, FC03, FC04, FC05, FC06, FC07, FC10 e FC11.

Nos itens seguintes encontra-se a descrição da metodologia e da arquitetura das redes neuronais artificiais treinadas para uso no presente trabalho.

3.5.1 Estrutura das RNA

A Figura 3.6 sintetiza a estrutura geral para as redes neuronais artificiais (RNA) propostas para compor o modelo destinado a representar o processo contínuo de produção de etanol por *Zymomonas mobilis* desenvolvido por Camêlo (2009).

A Figura 3.6 representa esquematicamente a topologia de rede *feedfoward* com três camadas - 1 de entrada, 1 escondida e 1 de saída - conforme fundamentos apresentados na seção 2.2.2.2.1 do Capítulo 2. As variáveis de entrada estão designadas de E1 a E10 e as variáveis de saída são S1, S2 e S3.

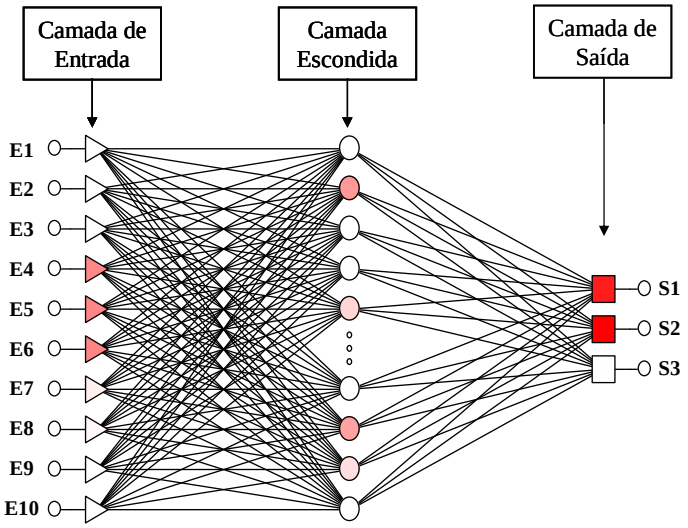


Figura 3.6 - Esquema da estrutura das RNA pesquisadas

A partir do esquema esboçado na Figura 3.6, as possibilidades a seguir foram consideradas para cada finalidade, em conformidade com a etapa em estudo, gerando basicamente 2 estruturas de redes neuronais:

a) RNA autônoma: as saídas são compostas pelas variáveis de estado de concentrações de etanol, de glicose e de células. Tem a finalidade de comparação com as respostas dos modelos MHCN e fenomenológico.

b) RNA cibernético / neuronal: contem na saída da rede as 3 variáveis cibernéticas de saída ($Z_{(i)}$) definidas pelas Equações (4.39), (4.40) e (4.41) do Capítulo 4. Destina-

se a gerar os dados para alimentar as equações de taxa do balanço material do modelo híbrido cibernético / neuronal (MHCN) concebido no Capítulo 4. Onde i = 1, 2, 3;

A Tabela 3.6 esboça a sequência de entrada das variáveis de alimentação e as condições de treinamento para a RNA autônoma e para a RNA do MHCN em função do uso dos elementos de atraso dinâmico nas variáveis de concentração e do emprego da variável G_F.

Na Tabela 3.6 estão presentes os termos: ats = atraso dinâmico; $\mathbf{X}$ = concentração celular [g L^{-1}]; $\mathbf{G}$ = concentração de glicose no meio reacional [g L^{-1}]; $\mathbf{E}$ = concentração de etanol no meio reacional [g L^{-1}]; $\mathbf{G_F}$ = concentração de glicose na linha de alimentação [g L^{-1}]. Os índices $\mathbf{k-1}$ e $\mathbf{k-2}$ representam, respectivamente, a inserção de um e dois atrasos dinâmicos nas variáveis de estado.

Tabela 3.6 – Sequência de entrada das variáveis de alimentação e condições de treinamento para a RNA do MHCN e para a RNA autônoma

Condições de Treinamento	**Variáveis de entrada**									
	E1	**E2**	**E3**	**E4**	**E5**	**E6**	**E7**	**E8**	**E9**	**E10**
	$\mathbf{E}$	$\mathbf{E_{k-1}}$	$\mathbf{E_{k-2}}$	$\mathbf{G}$	$\mathbf{G_{k-1}}$	$\mathbf{G_{k-2}}$	$\mathbf{X}$	$\mathbf{X_{k-1}}$	$\mathbf{X_{k-2}}$	$\mathbf{G_F}$
Sem ats com G_F	*			*			*			*
Sem ats sem G_F	*			*			*			
Com 1 ats com G_F	*	*		*	*		*	*		*
Com 1 ats sem G_F	*	*		*	*		*	*		
Com 2 ats com G_F	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Com 2 ats sem G_F	*	*	*	*	*	*	*	*	*	

Na Tabela 3.7 tem-se a disposição sequencial das variáveis de saída e as condições de treinamento para a RNA autônoma e para a RNA do MHCN, reportando as peculiaridades de cada rede.

Tabela 3.7 – Sequência de saída das variáveis e condições de treinamento para: RNA do MHCN e RNA autônoma

Redes	**Variáveis de saída**					
	S1		**S2**		**S3**	
	$\mathbf{Z_1}$	$\mathbf{E_{k+1}}$	$\mathbf{Z_2}$	$\mathbf{G_{k+1}}$	$\mathbf{Z_3}$	$\mathbf{X_{k+1}}$
RNA autônoma		*		*		*
RNA do MHCN	*		*		*	

Conforme consta na Tabela 3.7, a saídas da RNA autônoma tem as variáveis E_{k+1}, G_{k+1} e X_{k+1} e a da RNA MHCN é composta pelas variáveis Z1, Z2 e Z3. Os termos são: $Z_1 \equiv$ variável cibernética de saída relativa à formação de etanol; $Z_2 \equiv$ variável cibernética de saída relativa ao crescimento celular; $Z_3 \equiv$ variável cibernética de saída relativa à formação de lactato; o índice $\mathbf{k+1}$ refere-se à concentração das variáveis de estado um passo a diante em relação ao tempo de fermentação.

3.5.2 Programa de treinamento das redes

O treinamento das redes neuronais artificiais foram efetivadas empregando o Pacote Statistica® versão 8.0 da StatSoft, Inc.

No treinamento as variáveis de entrada e saída, bem como a quantidade de dados históricos utilizados, foram designadas dentro das estruturas de redes descritos nas Tabelas 3.6, 3.7 e 5.1, respectivamente. Para efetuar a regressão foi selecionado o módulo "*Intelligent Problem Solver*". Foram testadas 1000, 700, 500 e 100 redes para cada condição delineada anteriormente, no entanto as melhores condições de treinamento foram obtidas quando se utilizaram 500 ou 100 redes. Destas redes treinadas (500 ou 100) foram retidas as dez melhores para análise. Para o treinamento das redes do MHCN e RNA autônomas foram testadas a influência da inserção de elementos de atraso dinâmico e da variável concentração de glicose na linha de alimentação (G_F) como variáveis de entrada; já na saída das redes para as RNA do MHCN foram inseridas as variáveis cibernéticas de saídas $Z_{(i)}$ e para as RNA autônomas foram utilizadas as variáveis de estado na condição um passo a frente, conforme definido na Tabela 3.7.

Estudando a fase do processo operado no modo contínuo e sem adição de etanol exógeno, foi definida a busca pelo programa das dez RNA de melhor performance, sendo as diversidades de RNA retidas para comparação. As arquiteturas empregadas para os testes foram: Linear, "*Perceptron*" Multicamadas (MLP), neste caso com três camadas, e Função de Bases Radiais (RBF). A quantidade máxima de unidades nas camadas internas foi ajustada automaticamente pelo próprio programa, em função do tamanho do conjunto de dados. Selecionaram-se funções linear, logística e tangente hiperbólica como funções de ativação na camada escondida. Os conjuntos de dados foram historicamente divididos em subconjuntos de dados de treinamento e dados de teste, sendo a proporção de 80%:20%. Essa proporção para delinear os subconjunto de dados constitui-se a condição padrão apresentada pela versão do

programa Statistica empregada neste trabalho. Devido à quantidade relativamente pequena de dados históricos disponíveis para o treinamento, não foi selecionado o subconjunto de dados para validação. De Souza Jr., 2003 e Baughman e Liu, 1995, propuseram também a alternativa de divisão dos subconjuntos de treinamento e teste na proporção de 3:1. Analogamente, para a seleção dos subconjuntos de dados de treinamento/teste/validação, poder-se-ia utilizar as proporções 50%:25%:25% ou 2:1:1.

Segundo De Souza Jr. (2003), no programa STATISTICA, os dados históricos inicialmente são re-escalados pela camada de pré-processamento, de forma que possam ser utilizados pelo programa de treinamento. Na seqüência são alimentados na camada de entrada, passam pela camada interna, chegando à camada de saída e finalmente são convertidos para comparação com os valores nominais na camada de pós-processamento.

Os neurônios das camadas de entrada e saída foram neste trabalho definidos como lineares. A quantidade de neurônios na camada escondida foi definida automaticamente pelo programa em função das características dos dados de treinamento e determinada pelo acompanhamento realizado pelos dados de teste.

O subconjunto de dados de treinamento foi empregado para ajuste dos pesos e "*biases*", sendo reapresentados iteradas vezes até que a função erro global fosse suficientemente minimizada. Cada apresentação à rede é chamada de época (De Souza Jr., 2003).

O erro global da rede também foi computado para o subconjunto de dados de teste, sendo que estes dados não tomam parte do ajuste dos pesos e "*biases*" durante o treinamento da rede. Contudo, monitoraram continuamente o desempenho da rede durante o treinamento. Se o erro associado aos dados de teste parasse de diminuir ou começasse a aumentar, o treinamento era interrompido. Este subconjunto, desta forma, é importante para evitar o sobretreinamento, quando as RNA tornam-se hábeis para representar os dados de treinamento, no entanto perdem a capacidade de generalização para novos dados (De Souza Jr., 2003). A Figura 3.7 ilustra esquematicamente esta sistemática.

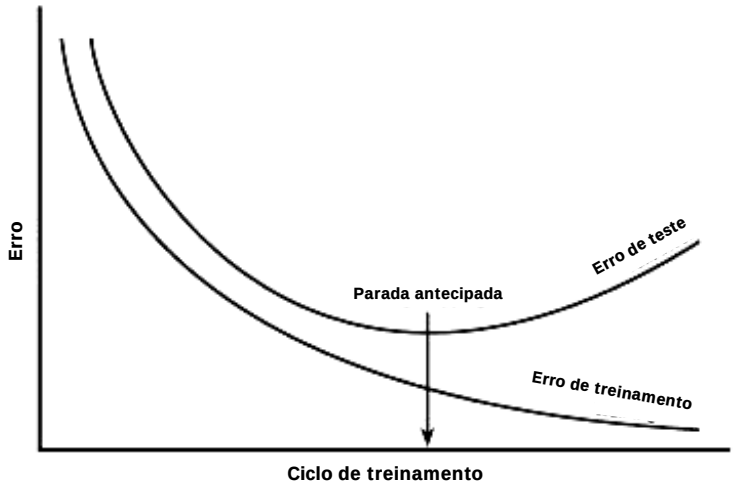


Figura 3.7 - Esquema de funcionamento do treinamento com os subconjuntos de dados para treinamento e para teste

Ainda segundo De Souza Jr. (2003), o programa de treinamento fornece critérios característicos do treinamento das RNA para a análise do usuário, conforme descrito a seguir.

Os desempenhos dos treinamentos são calculados por razões "SD", conforme a Equação 3.2:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{1=1}^{n}\left(X_{pi} - X_i\right)^2}{\sum_{1=1}^{n}\left(X_i - \overline{X}\right)^2}} \tag{3.2}$$

onde SD - desempenho da RNA; X_{pi} - valor predito para cada variável alvo individual; X_i - valor-alvo individual; $\overline{X}$ - média aritmética dos valores-alvo; n - número de valores-alvo e i = {1, ..., n}.

O pacote Statistica® versão 8.0 calcula as razões de sensibilidade, quando produz uma planilha comparativa com as contribuições de cada variável usada pelo modelo. Para tanto, a variável de entrada é substituída por sua média. A média é calculada com os dados anteriores, cuja quantidade é definida aleatoriamente. A Equação 3.3 apresenta o aludido cálculo:

$$RATIO = \frac{E_{RNA}\overline{x}}{E_{RNA}x} \tag{3.3}$$

onde, RATIO é a razão de sensibilidade, $E_{RNA}\overline{x}$ é o erro global da rede calculado para o valor médio dos dados antecessores e $E_{RNA}x$ é o erro global da rede calculado para o valor real do dado.

O programa Statistica® ainda disponibiliza recursos para outras análises estatísticas, tais como probabilidade normal dos resíduos, histograma dos resíduos, constância na variação

dos erros, dados preditos versus dados observados, média dos dados, desvio padrão dos dados, média do erro, desvio padrão do erro, erro médio absoluto, coeficiente de determinação e a comparação dos dados preditos pelas RNA versus dados observados, cuja metodologia é descrita por Montgomery e Runger (2003).

Foram plotados também gráficos com os dados preditos pelas RNA versus dados experimentais para complementar as verificações da capacidade de representação.

Depois de treinadas as RNA, gerou-se o código fonte da rede selecionada para implementação no modelo híbrido.

3.6 PROPOSTA DO MODELO HÍBRIDO CIBERNÉTICO / NEURONAL (MHCN)

Dada as características do processo em estudo e a não disponibilidade dos dados de concentração do lactato – uma das vias metabólicas definidas por Lehninger et al. (2007), Equação 4.11 – no trabalho experimental de Camêlo (2009), propôs o modelo híbrido cibernético / neuronal (MHCN) integrando a equações de balanço de massa do modelo cibernético e a rede neuronal artificial especificamente treinada para tal, conforme descrito na sessão 3.5.1. O modelo foi implementado no programa Matlab® versão 6.0. A proposta do MHCN encontra-se descrita no Capítulo 4.

3.7 MODELO FENOMENOLÓGICO

Com a finalidade de comparação dos resultados obtidos nas simulações do modelo híbrido cibernético / neuronal, empregou-se o modelo fenomenológico proposto por Daugulis et al. (1997), nas condições implementadas por Camêlo (2009). O modelo foi implementado no programa Matlab®. A descrição do modelo fenomenológico de Daugulis et al. (1997) / Camêlo (2009) encontra-se no Apêndice A.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS RESPOSTAS DO MHCN

As simulações do modelo híbrido cibernético / neuronal serão avaliadas tendo-se em conta 4 critérios estatísticos, quais sejam: coeficiente de determinação ou regressão (R^2),

soma quadrática dos erros (MSE), coeficiente angular e coeficiente linear da equação de regressão linear. Gandelman (2012) empregou análise semelhante em seu trabalho.

Nestes termos, a resposta do modelo apresentará melhor capacidade de predição quanto mais:

1) o coeficiente de determinação (R^2) se aproximar da unidade;
2) o erro quadrático médio tender a zero (MSE);
3) o coeficiente angular se aproximar da unidade; e
4) o coeficiente linear tender a zero.

O coeficiente de determinação é um parâmetro adequado para mensurar a capacidade preditiva do modelo. Contudo, quando mesmo no gráfico dos dados reais versus preditos obtenha-se uma reta de regressão perfeita, implicando em $\boldsymbol{R^2 = 1}$, mas as previsões do modelo poderão ter deslocamentos significativos em relação aos dados reais. Nessa condição, o erro quadrático médio auxilia minimizando a possível distorção da análise. Uma simulação com $\boldsymbol{R^2}$ valor próximo a unidade e um baixo valor de MSE mostra uma performance boa.

As Equações (3.4) a (3.9) apresentam os cálculos do erro quadrático médio e do coeficiente de correlação, respectivamente (Montgomery e Runger, 2003).

Soma quadrática dos erros:

$$SQ_E = \sum_{i=1}^{n} \left(y_i - \hat{y}_i \right)^2 \tag{3.4}$$

Soma quadrática da regressão:

$$SQ_R = \sum_{i=1}^{n} \left(\hat{y}_i - \overline{y}_i \right)^2 \tag{3.5}$$

Soma quadrática total:

$$SQ_T = \sum_{i=1}^{n} \left(y_i - \overline{y}_i \right)^2 = \sum_{i=1}^{n} \left(y_i - \hat{y}_i \right)^2 + \sum_{i=1}^{n} \left(\hat{y}_i - \overline{y}_i \right)^2 \tag{3.6}$$

Coeficiente de determinação ou coeficiente de regressão:

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n} \left(\hat{y}_i - \overline{y}_i \right)^2}{\sum_{i=1}^{n} \left(y_i - \overline{y}_i \right)^2} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n} \left(y_i - \hat{y}_i \right)^2}{\sum_{i=1}^{n} \left(y_i - \overline{y}_i \right)^2} \tag{3.7}$$

Relação entre os coeficientes de correlação e de regressão:

$$\boldsymbol{r = \sqrt{R^2}} \tag{3.8}$$

Erro quadrático médio (MSE):

$$\boldsymbol{MSE = \frac{\sum_{i=1}^{n}\left(y_i - \hat{y}_i\right)^2}{n-1}} \tag{3.9}$$

onde: $\boldsymbol{y_i}$ ≡ valor da variável de estado interpolada (E, X, G ≡ real ou observada); $\boldsymbol{\hat{y}_i}$ ≡ valor da variável de estado simulada pelo MHCN (E, X, G ≡ preditas) ; $\boldsymbol{\overline{y}_i}$ ≡ valor médio da variável de estado interpolada (E, X, G ≡ real ou observada); $\boldsymbol{\overline{\hat{y}}_i}$ ≡ valor médio da variável de estado simulada pelo MHCN (E, X , G G ≡ preditas); $\boldsymbol{n}$ ≡ número de dados disponível para cada variável de estado; i ≡ 1,...,n; $\boldsymbol{r}$ ≡ coeficiente de correlação.

CAPÍTULO 4

MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO

Neste Capítulo são apresentados os modelos propostos para a representação do processo contínuo de produção de bioetanol por *Zymomonas mobilis* pesquisado por Camêlo (2009). Dada as características oscilatórias imprimidas pelas condições operacionais às variáveis de concentração de etanol, de glicose e de células, pensou-se dentre as diversas técnicas de modelagem mais adequadas para aplicação neste estudo, garantindo a confiança estatística adequada.

Nestas condições, visto a discussão na literatura sobre a não adequação de modelos não estruturados para processos altamente dinâmicos (Nielsen et al., 2003; Oliveira, 2004), propôs-se o modelo cibernético assumindo a hipótese difundida na literatura que micro-organismo reage ao seu ambiente usando uma resposta ótima para sobrevivência e competição. Além disso, dada a ausência de dados experimentais referentes a uma das vias metabólicas (concentração de lactato), de certas condições iniciais e também a quantidade de parâmetros a estimar, foi proposto o modelo híbrido cibernético / neuronal para contornar tais óbices. A metodologia adotada para o desenvolvimento de ambos os modelos está descrita a seguir.

4.1 CONCEPÇÃO DO MODELO CIBERNÉTICO

A literatura científica descreve que a atividade biológica acontece em rotas metabólicas que são redes complexas de reações químicas. Cada reação em uma rota é catalisada por uma enzima muito específica, cujo controle é refletido na distribuição de taxas de reação, chamados fluxos metabólicos (Ramkrishna, 1982 e 2003, Ramkrishna et al., 1984). Assim, o fluxo em diferentes rotas muda ocasionando diferentes padrões de consumo de substrato, bem como diferenças no crescimento celular e na síntese de produtos secundários. Desta forma, a engenharia metabólica deve tratar um grande número de reações para predizer o

comportamento celular e, assim, otimizar o processo baseado em células (Namjoshi e Ramkrishna, 2005).

Segundo Coelho (2009), a abordagem cibernética traduz a idéia que as células regulam sua atividade metabólica através do controle das taxas de atividade e de síntese das enzimas organizando-as de forma ótima para alcançar um objetivo em particular. Ainda, para manter as equações resultantes suficientemente simples, detalhes dos mecanismos de regulação são absorvidos pelas variáveis cibernéticas.

Como já citado no Capítulo 2 deste trabalho, a estrutura de modelagem cibernética substitui a modelagem detalhada dos processos de regulação, onde as variáveis cibernéticas de controle - " $\mathbf{u_i}$ " e " $\mathbf{v_i}$ ", representam as taxas de síntese e de atividade enzimática, respectivamente. Essas variáveis constituem-se na estratégia ideal para determinar os valores da taxa de crescimento instantânea " $\mathbf{r_i}$ " ao longo das rotas metabólicas disponíveis (Kompala et al., 1984 e 1986). Importante salientar a idéia básica do modelo cibernético onde uma <u>enzima chave</u> desempenha o papel de gargalo no crescimento em um substrato específico, devendo ser sintetizada anteriormente ao crescimento neste substrato. Essa enzima chave pode representar todo o conjunto de enzimas que promovem a catálise em uma rota metabólica específica (Kompala et al., 1986; Nielsen et al., 2003), não sendo, no entanto, necessária a sua identificação e nem a obtenção de seu nível durante o desenvolvimento do processo, bastando sua condição inicial para simulação do modelo. Tal afirmação pode ser constatada nas equações das taxas de formação das enzimas intracelulares descritas na Tabela 4.5.

Neste contexto, para a proposição do modelo cibernético destinado ao processo produtivo em estudo, serão detalhadas a rota de Entner-Doudorff para *Zymomons mobilis*, os conjuntos das enzimas envolvidas nessa rota metabólica, a estequiometria do catabolismo da glicose a etanol, o cálculo dos fatores de rendimento e por fim a concepção do modelo cibernético com a discussão dos parâmetros disponíveis e necessários.

4.1.1 Estudo das enzimas e rotas bioquímicas

Camêlo (2009), utilizando técnica de eletroforese em SDS-PAGE, identificou 12 enzimas envolvidas na via bioquímica de Entner-Doudoroff de *Zymomonas mobilis* para as FC01 a FC11 e as comparou com as informações obtidas por AN et al., (1991). A Tabela 4.1 apresenta esquematicamente as massas moleculares de cada enzima, bem como as etapas da rota metabólica na qual estão envolvidas. Contudo, torna-se importante destacar que a técnica

de eletroforese não permite identificar por si só as enzimas celulares, fazendo-se necessário para tanto o fracionamento da matriz celular ou empregar técnicas de proteoma.

Tabela 4.1 - Massas moleculares das enzimas da rota bioquímica de Entner-Doudoroff das bactérias *Zymomonas mobilis* (AN et al., 1991)

ENZIMAS	Massa molecular (D)	Etapas da Rota
Glicoquinase	33,000	(1-ED): Glicose → Glicose–6-fosfato
Glicose-6-fosfatodesidrogenase	52,000	(2-ED): Glicose–6–fosfato → 6-fosfogluconalactona
Lactonase = 6-fosfogliconolactonase	26,600	(3-ED): 6-fosfogliconolactona → 6-fosfogliconato
6-fosfogliconato desidratase	63,000	(4-ED): 6-fosfogluconato → 2-ceto-3-dioxi-6-fosfogliconato
2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato aldolase	22,000	(5-ED): 2-ceto-3-dioxi-6-fosfogliconato → piruvato + gliceraldeído-3-fosfato
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	41,000	(1-EM): gliceraldeído-3-fosfato → 1,3-Difosforoglicerato
Fosfogliceratoquinase	44,000	(2-EM): 1,3-Difosforoglicerato → 3-fosforoglicerato
Fosfogliceratomutase	26,000	(4-EM): 3-fosforoglicerato → 2-fosforglicerato
Enolase	45,000	(5-EM): 2-fosforglicerato → fosfoenolpiruvato
Piruvato quinase	57,000	(6-EM): fosfoenolpiruvato → piruvato
Piruvato descaboxilase	59,998	(6-ED+7-EM): piruvato → acetaldeído
Álcool desidrogenase	38,000	(7-ED+8-EM): acetladeído → etanol

Obs: - (ED) ≡ Rota de Entner-Doudoroff; (EM) ≡ Rota de Embden-Meyerhoff; D ≡ Dalton.

As Figuras 4.1, 4.2 e 4.3 mostram esquematicamente - com detalhamento sucessivo, o desvio sofrido na etapa intermediária da rota de Entner-Doudoroff para uma etapa intermediária da rota de Embden-Meyerhoff.

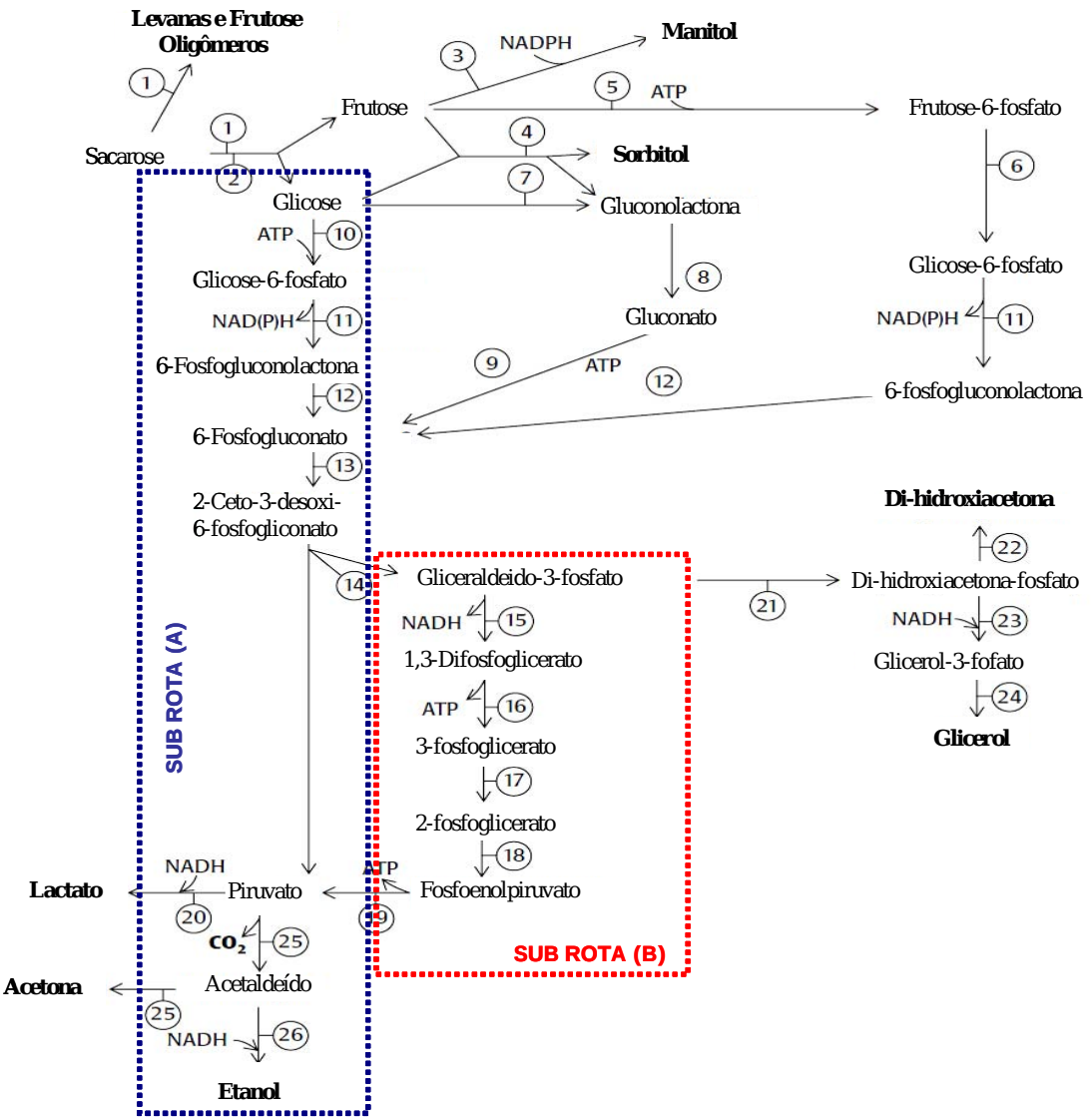


Figura 4.1 – Metabolismo de sacarose, glicose e frutose em *Zymomonas mobilis*. Enzimas (indicadas pelos números circunscritos no esquema): **1.** levanasacrase; **2.** invertase; **3.** manitol desidrogenase; **4.** glicose-frutose oxidorredutase; **5.** frutoquinase; **6.** glicose-6-fosfato isomerase; **7.** glicose desidrogenase; **8.** gluconolactonase; **9.** gluconato quinase; **10.** glicoquinase; **11.** glicose-6-fosfato desidrogenase; **12.** 6-fosfogluconolactonase; **13.** 6-fosfogluconato desidratase; **14.** ceto-dioxi-fosfogluconato aldolase; **15.** gliceraldeido 3- fosfato desidrogenase; **16.** fosfoglicerato quinase; **17.** fosfoglicerato mutase; **18.** enolase; **19.** piruvato quinase; **20.** lactato desidrogenase; **21.** triose-fosfato isomerase; **22.** fosfatase; **23.** glicerol 3-fosfato desidrogenase; **24.** fosfatase; **25.** piruvato descarboxilase; **26.** álcool desidrogenase. **Sub rota (A):** rota de Entner-Doudoroff a partir da glicose; **Sub rota (B):** relacionada ao desvio da etapa intermediária da Rota de Entner-Doudoroff para a etapa intermediária da Rota de Embden-Meyerhoff. Adaptado de Glazer e Nikaido (2007)

Na Figura 4.1 encontram-se destacadas as rotas de Entner-Doudoroff (Sub rota A – retângulo maior) e o desvio sofrido nesta rota para uma etapa intermediária da rota de Embden-Meyerhoff (Sub rota B – retângulo menor). Nota-se que o desvio para a rota de Embden-Meyerhoff retorna para a formação do piruvato, como ocorre na rota de Entner-Doudoroff.

Na Figura 4.2 encontra-se destacada a etapa intermediária da rota de Embden-Meyerhoff (Sub rota B), para a qual ocorre o desvio na etapa da conversão do 2-ceto-3 desoxi-6 fosfogluconato da rota de Entner-Doudoroff. Nota-se que esta etapa intermediária da rota de Embden-Meyerhoff converge para a formação do piruvato (ácido pirúvico), como ocorre na rota de Entner-Doudoroff.

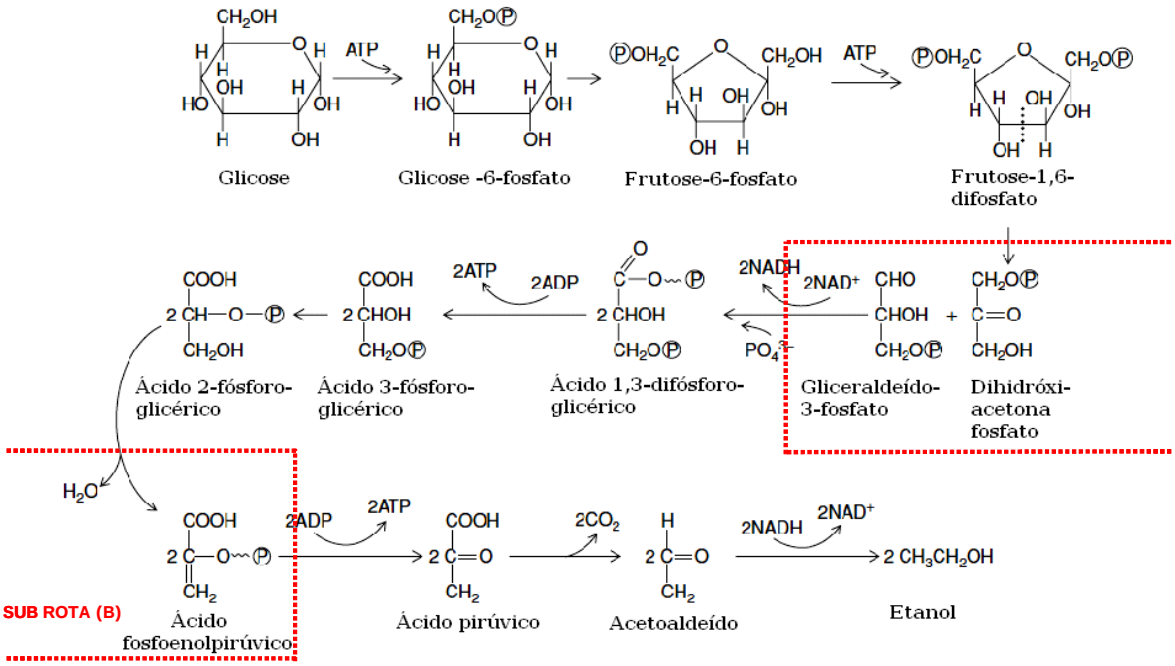


Figura 4.2 – Formação de etanol e CO_2 por *Saccharomyces cerevisae* a partir de glicose pela rota metabólica de Embden-Meyerhoff-Parnass. Sub rota (B): etapa intermediária da rota *de* Embden-Meyerhoff relacionada ao desvio ocorrido na etapa intermediária da rota *de* Entner-Doudoroff na Figura 4.1. Adaptado de Glazer e Nikaido (2007).

Na Figura 4.3 encontra a rota Entner-Doudoroff integral, onde se destaca (Sub rota B) o desvio para a etapa intermediária da rota de Embden-Meyerhoff, ocorrida na fase da conversão do 2-ceto-3 desoxi-6 fosfogluconato da rota de Entner-Doudoroff. Observa-se que tanto a rota de Entner-Doudoroff como o desvio relativo à rota de Embden-Meyerhoff convergem para rota idêntica de formação de etanol a partir da formação do piruvato (ácido pirúvico).

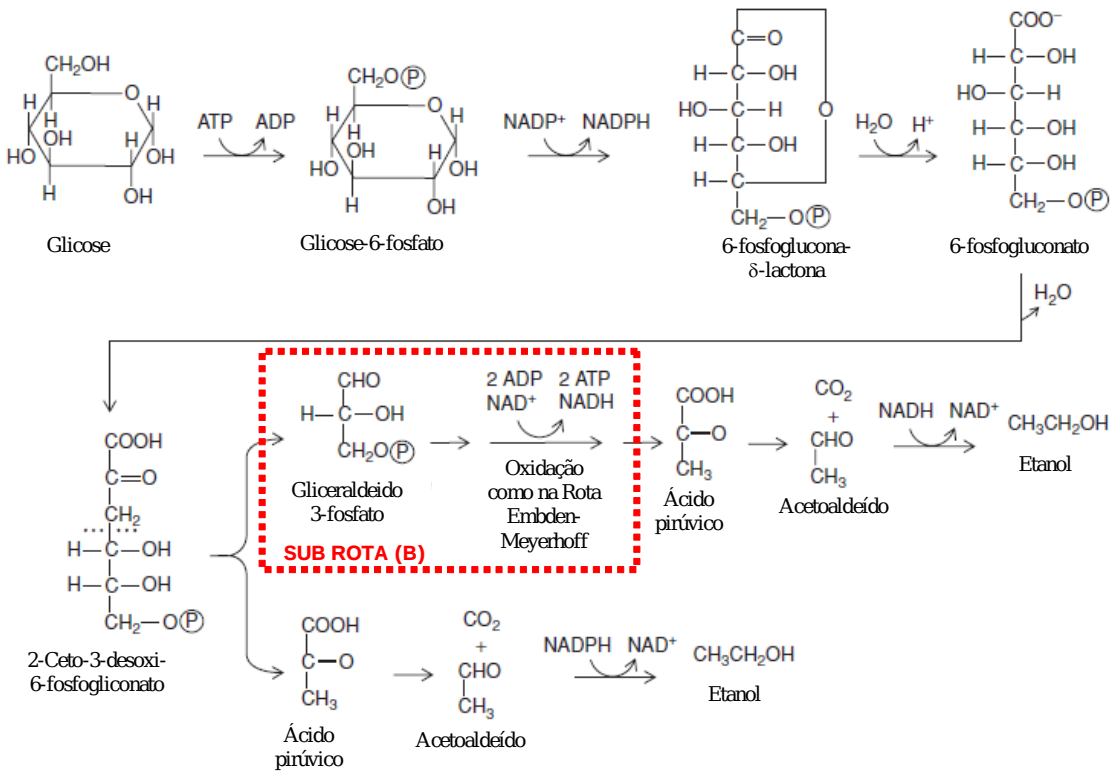


Figura 4.3 – Formação de etanol a partir de glicose por *Zymomonas mobilis* em fermentação via Entner-Doudoroff. Sub rota (B): desvio na etapa intermediária da rota de Entner-Doudoroff para a etapa intermediária da rota de Embden-Meyerhoff. Adaptado de Glazer e Nikaido (2007)

Analisando cada etapa da rota das Figuras 4.1, 4.2 e 4.3, obtêm-se as equações bioquímicas das rotas envolvidas no metabolismo de *Zymomonas mobilis* para a conversão de glicose a etanol. Neste conjunto de equações, a Eq (4.5) explicita o desvio de rota ocorrido a partir de 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato (Glazer e Nikaido, 2007; Camêlo, 2009):

a. Glicose entra na célula de *Zymomonas mobilis* por meio de um sistema de transporte por difusão facilitada estereoespecífico, de baixa afinidade e de alta velocidade. Então, uma glicoquinase constitutiva converte a glicose em glicose-6-fosfato.

$$\text{glicose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Mg++, } \textit{glicoquinase}} \text{glicose} - 6 - \text{fosfato} + \text{ADP} \qquad (4.1)$$

A partir da Glicose-6-fosfato, *Zymomonas mobilis* passa a utilizar a via Entner-Doudoroff. Essa via glicolítica é distinta da rota enveredada por outros micro-organismos fermentadores. Por exemplo, leveduras utilizam a rota de *Embden-Meyerhoff*, como já apresentado na Figura 4.2.

b. Glicose-6-fosfato desidrogenase catalisa a conversão de glicose-6-fosfato para 6-fosfogliconolactona, com a concomitante redução do NAD a NADH.

$$\text{glicose} - 6 - \text{fosfato} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\textit{glicose-6-fosfato desidrogenase}} 6 - \text{fosfatogliconolactona} + \text{NADH} + \text{H}_2\text{O} \quad (4.2)$$

c. 6-fosfogliconolactonase, com atividade catalítica muito alta, hidrolisa a 6-fosfogliconolactona a 6-fosfogliconato.

$$6 - \text{fosfogliconolactona} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{6-\text{fosfogliconolactonase}} 6 - \text{fosfogliconato} \quad (4.3)$$

d. 6-fosfogliconato desidratase converte o 6-fosfogluconato a 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato.

$$6 - \text{fosfogliconato} \xrightarrow{6-\textit{fosfogliconato desidratase}} 2 - \text{ceto} - 3 - \text{desoxi} - \text{fosfogliconato} + \text{H}_2\text{O} \quad (4.4)$$

e. 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato é clivada pela enzima 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato aldolase específica em piruvato e em gliceraldeído-3-fosfato.

O gliceraldeído-3-fosfato será convertido em uma segunda molécula de piruvato por uma série de reações que fazem parte de via glicolítica da rota de Embden-Myerhoff.

$$2 - \text{ceto} - 3 - \text{desoxi} - 6 - \text{fosfogliconato} \xrightarrow{2-\textit{ceto}-3-\textit{desoxi}-6-\textit{fosfogluconato aldolase}} \text{piruvato} + \text{Gliceraldeído} - 3 - \text{fosfato} \quad (4.5)$$

f. Piruvato é então convertido a acetaldeído e dióxido de carbono por uma piruvato descarboxilase incomum, a qual, ao contrário desta enzima na levedura, não exige o cofator pirofosfato de tiamina (TPP) para a sua atividade catalítica.

$$\text{piruvato} \xrightarrow{\text{Mg++},\ \textit{piruvato descarboxilase}} \text{acetaldeído} + \text{CO}_2 \quad (4.6)$$

e. Duas enzimas álcool desidrogenases (ADH I e ADH II) reduzem o acetaldeído a etanol, com oxidação estequiométrica concomitantes de NADH.

$$\text{Acetaldeído} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\textit{álcool desidrogenase}} \text{etanol} \quad (4.7)$$

Glazer e Nikaido (2007) relataram que ADH I é uma enzima tetramérica com zinco no sítio ativo, como a maioria das desidrogenases de álcool comumente encontradas. ADH II é incomum, pois contém ferro em seu centro ativo. Em concentrações de baixo teor alcoólico, a V_{max} da ADH I é aproximadamente o dobro em comparação a ADH II para a redução de acetaldeído em relação à oxidação do álcool, enquanto a ADH II mostra uma taxa muito mais elevada da oxidação do álcool. Na ausência de etanol, ambos contribuem igualmente para a catálise enzimática da redução de acetaldeído. Em concentrações elevadas de etanol, ADHI é

fortemente inibida, mas a produção do etanol continua, porque a taxa de redução de acetaldeído por ADH II é significativamente aumentada sob essas condições.

Empregando a técnica de eletroforese SDS-PAGE, Camêlo (2009) verificou que houve aumento da banda de 2-ceto-3-desoxi-6-fosfoglioconato aldolase quando as fermentações apresentaram oscilações. Assim, analisando a rota metabólica seguida pelas bactérias *Zymomonas mobilis*, observou que a enzima 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato aldolase atua na rota onde a molécula é convertida em piruvato, antes de ir a etanol ou na síntese de componentes celulares. Desta forma, Camêlo (2009) levantou a possibilidade de tal enzima ser um limitante no processo (enzima chave). Contudo, como já discutido no início desta sessão, a técnica de eletroforese não permite identificar por si só uma enzima celular específica. Somente o aumento de banda eletroforética não é conclusiva na identificação de uma dada proteína, posto que outras proteínas com massa molecular e com ponto isoelétrico semelhantes podem estar juntas na mesma banda em função da resolução do método. Ainda nesses sentido, a autora não relatou a realização de medidas de atividade enzimática, o que poderia auxiliar na identificação mais precisa. Camêlo (2009) também reportou não ter encontrado REFERÊNCIA correlata na literatura e, assim, ressaltou a necessidade de uma investigação mais detalhada empregando outras técnicas, dentre as quais cita eletroforese 2D e isolamento de enzimas.

Não obstante, Swings e De Ley (1977) já haviam citado a detecção por cromatografia em papel do intermediário chave 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato, para a linhagem NCIB 8777 e NCIB 8938, não tendo, no entanto, nem isolado nem identificado mais atentamente.

Desta forma, face às observações de Camêlo (2009) e de Swings e De Ley (1977), pode-se adotar como hipótese que a etapa de conversão do 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato a piruvato pela enzima **2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato aldolase** constitui-se na etapa limitante da rota de Entner-Doudoroff. Assumindo esta hipótese, essa enzima desempenha o papel de gargalo do processo, constituindo-se na enzima chave da rota de produção de etanol, determinando a cinética do modelo cibernético nessa rota específica, em consonância com o proposto por Kompala et al. (1986) e Nielsen et al. (2003). Dessa forma, observa-se também que é nessa etapa de conversão ocorre o desvio da rota de Entner-Doudoroff para uma etapa intermediária da rota de Embden-Meyerhoff, sendo que posteriormente ambas convergem para a formação de piruvato e a partir daí seguem as mesmas etapas até chegar à formação do etanol. Isto posto, torna-se viável a hipótese de não se considerar um modelo cinético específico para o desvio intermediário de Embden-Meyerhoff, pois este está após o gargalo bioquímico do processo e converge igualmente para o etanol. Assim, na etapa de concepção

do modelo cibernético considerar-se-á somente um modelo cinético para a rota de Entner-Doudoroff.

4.1.2 Estequiometria

De acordo com Swing e De Ley (1977), *Zymomonas mobilis* assimila apenas uma pequena parte de seu substrato de glicose como material celular, sendo 98% fermentado e cerca de 2% da fonte de carbono usado como material constitutivo para célula, sendo citado por Sprenger (1996) e Ernandes e Garcia-Cruz (2009). No entanto, a correlação observada por estes autores não foi verificada nos dados experimentais obtidos por Camêlo (2009) e nem na estequiometria proposta na Equação 4.9 e cálculos constantes da Tabela 4.2.

A estequiometria para o catabolismo da glicose a etanol é representada pela equação (Lehninger et al., 2007; Ernandes e Garcia-Cruz, 2009):

$$C_6H_{12}O_6 + 2ADP + 2P_i \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 2ATP + 2H_2O \qquad (4.8)$$

Mais especificamente para *Zymomonas mobilis*, Gibbs e DeMoss (1954 *apud* Ernandes e Garcia-Cruz, 2009) demonstraram que essas bactérias utilizam para o catabolismo anaeróbico de glicose uma modificação da via de Entner-Doudoroff, sendo a estequiometria para formação de etanol descrita por:

$$\begin{array}{lllll} C_6H_{12}O_6 \rightarrow 1,93C_2H_5OH & +1,8CO_2 & +0,053CH_3CHOHCOOH & & \\ 180g & 46g & 44g & 90g & [mol] \\ & 88,79g & 79,20g & 4,77g & (Coeficiente\, estequiométrico\, vezes\, mol) \\ & (P_1) & (P_2) & (P_3) & \end{array} \qquad (4.9)$$

onde (P_1) ≡ Etanol; (P_2) ≡ CO_2; (P_3) ≡ Ácido lático. é

4.1.3 Rendimento (η%) e fator de conversão ($Y_{P/S}$)

Com base na estequiometria proposta para a rota de Entner-Doudoroff (Equação 4.9), a Tabela 4.2 apresenta o cálculo dos rendimentos e dos fatores de conversão do substrato em produto correspondentes à produção de etanol, CO_2 e ácido lático.

Tabela 4.2 – Rendimento (η) e fatores de conversão (Y) para produção de etanol por *Zymomonas mobilis* a partir de glicose

(a) Etanol (P_1) **Rota de Entner-Doudoroff** **(Fermentação alcoólica)**	**(b) CO_2 (P_2)**	**(c) Ácido lático (P_3)** **(Fermentação lática)**
180g ---- 100% 88,79g ---- η_{P1}	180g ---- 100% 79,20g ---- η_{P2}	180g ---- 100% 4,77g ---- η_{P3}
$\eta_{P1} \approx 49{,}33\%$	$\eta_{P2} \approx 44{,}00\%$	$\eta_{P3} \approx 2{,}65\%$
$Y_{P1/S} = 0{,}493$	$Y_{P2/S} = 0{,}440$	$Y_{P3/S} = 0{,}027$

Somando os rendimentos (Y) da Tabela 4.2, tem-se:

$$X_{P1} + X_{P2} + X_{P3} = 95{,}98\% \tag{4.10}$$

Como observado na estequiometria proposta acima e na Equação (4.10), faltam 4,02% para completar a relação estequiométrica. Então, pela análise do catabolismo da glicose nas Figuras 4.1, 4.2 e 4.3 e, também, na relação estequiométrica proposta na Equação (4.8) (Lehninger et al., 2007; Ernandes e Garcia-Cruz, 2009), verifica-se que os 4,02% faltantes para fechar o balanço estequiométrico estão associados à água produzida no ciclo de Krebs.

Assim, para visualização global da estequiometria proposta, a Figura 4.4 apresenta as principais vias catabólicas de carboidratos em *Zymomonas mobilis*. Nesta figura encontram-se destacados no catabolismo da glicose a via de Entner-Doudoroff, o desvio da rota de Entner-Doudoroff para o gliceraldeído-3-fosfato (via de Embden-Meyrhoff) e o ciclo de Krebs.

A Figura 4.4 apresenta as principais vias de carboidratos em *Zymomonas mobilis*. A sacarose é dividida extracelularmente pela ação de duas enzimas invertase B (aderida à parede celular) e levansacarase (InvB e Lev U) em glicose e frutose (ou Levana). As duas hexoses podem entrar na célula através do sistema "porta única" (*Uniport*) comum (GLF - facilitador de glicose) ou são convertidos pelo GFOR (glicose-frutose oxidoredutase) periplásmica em sorbitol e gliconolactona. O sorbitol é transportado para a célula através de um sistema acumulativo (transportador de sorbitol - LOOS et al., 1994 *apud* Sprenger, 1996). A absorção de gluconato não é conhecida em detalhe, mas a hipótese de um transportador tem de ser considerada (transportadora gluconato). As enzimas da via KDPG (2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato) são escritas em código de três letras ao lado das setas que simbolizam as etapas da reação. Duas setas indicam as reações que são, em princípio, reversíveis. Observa-se ainda que no desvio da rota para o gliceraldeído-3-fosfato, a partir do intermediário chave 2-ceto-3-desoxi-6-fosfoglucanato, o metabolismo prossegue até a formação do piruvato quando há duas possibilidades: (1) desviar para o ciclo de Krebs propiciando o crescimento celular,

onde há a formação do CO_2; (2) voltar para a rota de Entner-Doudoroff com a consequente formação do etanol.

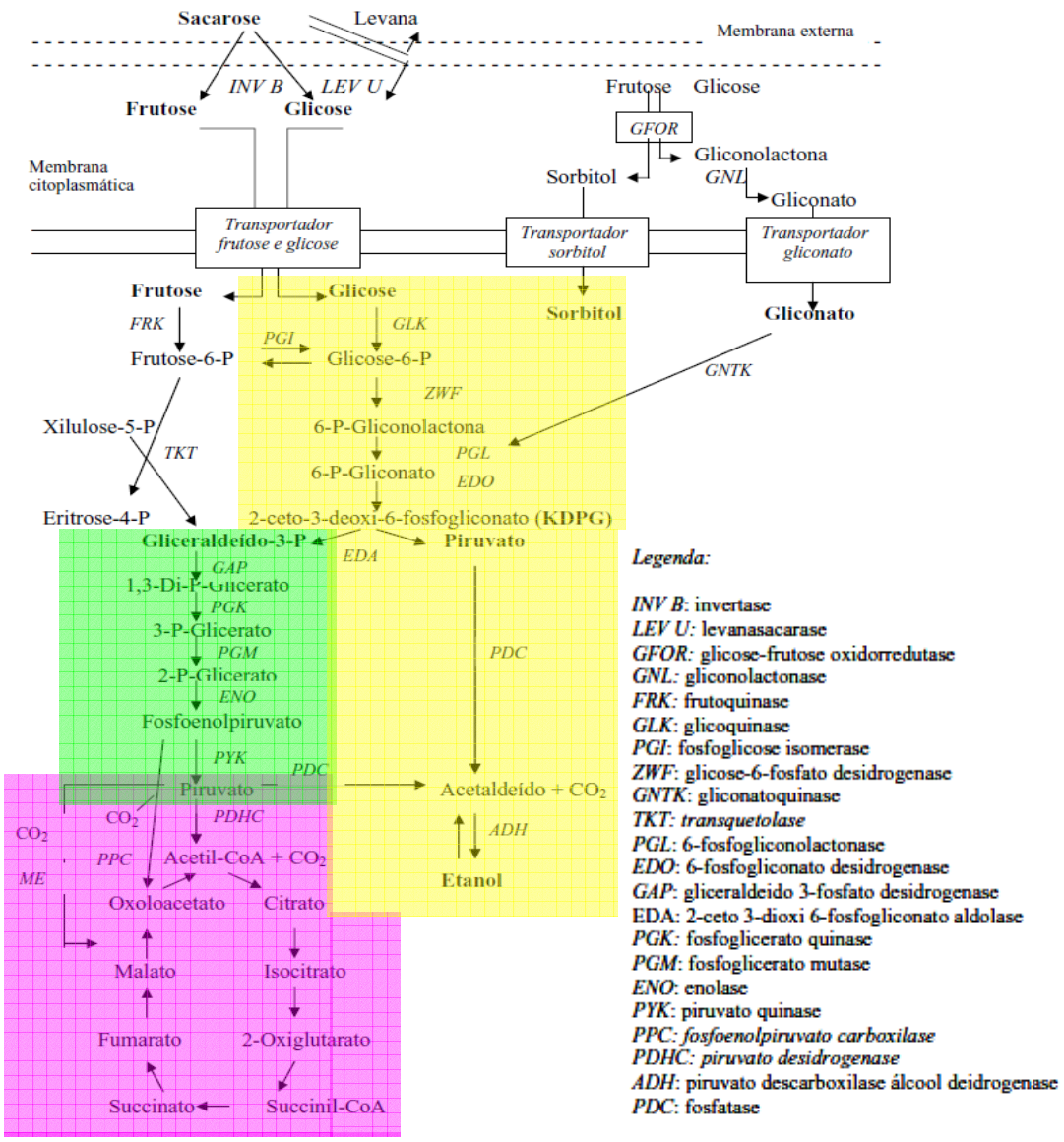


Figura 4.4 – Principais rotas de carboidrato em *Zimomonas mobilis*. Destacada no metabolismo da glicose: O rota de Entner-Doudoroff; O desvio para Gliceraldeído-3-fosfato até Piruvato; O ciclo de Krebs. Adaptado de Sprenger (1996)

A Figura 4.5 apresenta esquematicamente as principais rotas metabólicas possíveis para o catabolismo da glicose, quais sejam: fermentação alcoólica, fermentação lática e cadeia respiratória (ciclo de Krebs).

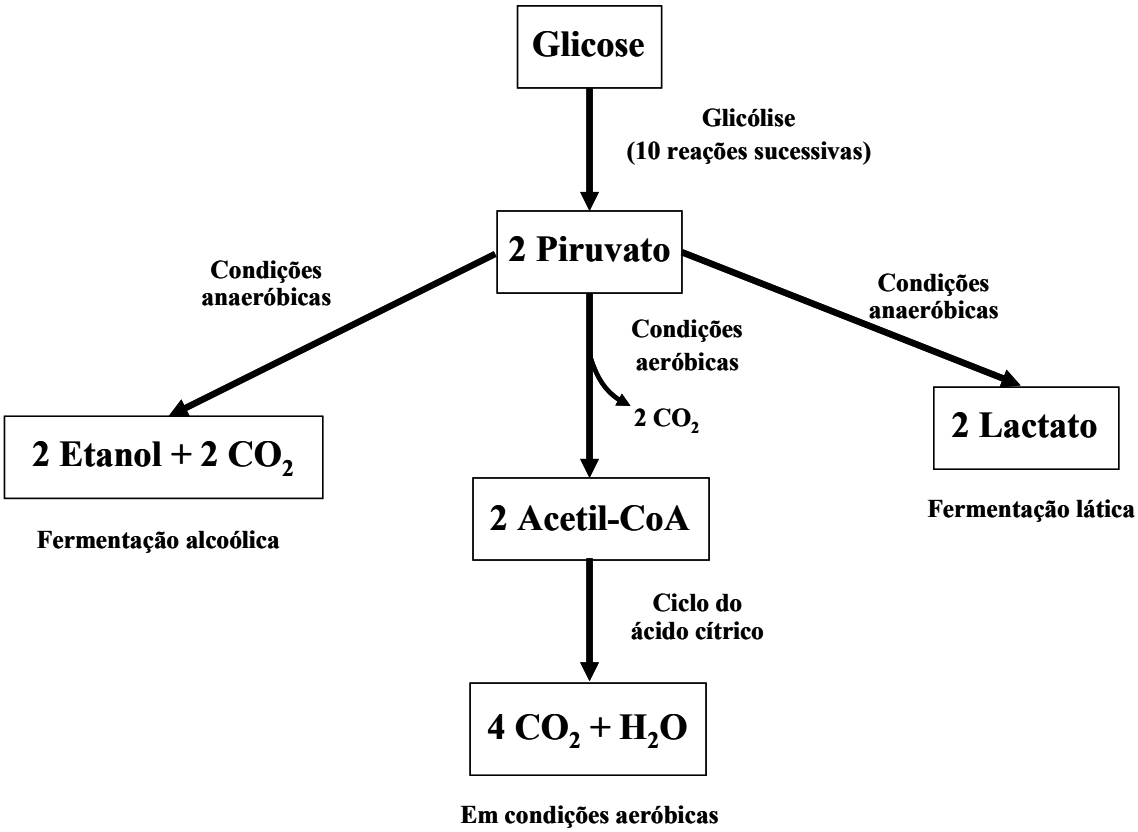


Figura 4.5 – Esquema do catabolismo da glicose. Adaptado de Lehninger et al. (2007)

Em função do exposto e analisado anteriormente, torna-se adequada à proposição da relação estequiométrica da Equação (4.11) como complemento à relação proposta na literatura por Lehninger et al. (2007) e Ernandes e Garcia-Cruz (2009) na Equação 4.9:

$$\begin{array}{lllllll} C_6H_{12}O_6 + 2ADP + 2P_i \rightarrow & 1,93C_2H_5OH & +1,8CO_2 & +0,053CH_3CHOHCOOH & +0,402H_2O & & \\ 180g & 46g & 44g & 90g & 18g & [mol] & \\ & 88,79g & 79,20g & 4,77g & 7,24g & & \\ & (P_1) & (P_2) & (P_3) & (P_4) & & \end{array} \quad (4.11)$$

onde $P_1 \equiv$ etanol; $P_2 \equiv$ gás carbônico (correspondendo ao ciclo de Krebs e à fermentação alcoólica); $P_3 \equiv$ ácido lático; $P_4 \equiv$ ciclo de Krebs.

Partindo desta proposta, tem-se o cálculo do rendimento e fator de conversão para a água apresentados na Tabela 4.3, complementando o já calculado para os demais componentes na Tabela 4.2.

Tabela 4.3 – Rendimento (η) e fatores de conversão (Y) para produção de etanol por *Zymomonas mobilis* a partir de glicose considerando a água

(a) Etanol (P_1) Rota de Entner-Doudoroff (Fermentação alcoólica)	**(b) CO_2 (P_2)**	**(c) Ácido lático (P_3)** (Fermentação lática)	**(d) H_2O (P_4)**
180g ---- 100%	180g ---- 100%	180g ---- 100%	180g ---- 100%
88,79g ---- η_{P1}	79,20g ---- η_{P2}	4,77g ---- η_{P3}	7,240g ---- η_{P4}
$\eta_{P1} \approx 49{,}33\%$	$\eta_{P2} \approx 44{,}00\%$	$\eta_{P3} \approx 2{,}65\%$	$\eta_4 \approx 4{,}02\%$
$Y_{P1/S} = 0{,}493$	$Y_{P2/S} = 0{,}440$	$Y_{P3/S} = 0{,}027$	$Y_{P4/S} = 0{,}040$

Incluindo o rendimento da água aos demais rendimentos calculados na Tabela 4.2, na Equação (4.10) tem-se:

$$\left(X_{P1} + X_{P2} + X_{P3}\right) + X_{P4} = \left(95{,}98\%\right) + 4{,}02\% = 100{,}00\% \qquad (4.12)$$

Na Tabela 4.3 são mostrados os rendimentos e fatores de rendimento envolvidos na etapa de produção de etanol por *Zymomonas mobilis*, englobando as 3 rotas metabólicas competitivas envolvidas, quais sejam: (a) Fermentação alcoólica – rota de Entner-Doudoroff; (b) Crescimento celular – ciclo de Krebs; (c) Fermentação lática.

Observando a Figura 4.5, para cada mol de piruvato tem-se a formação de 8 mols de CO_2, sendo 2 mols de CO_2 para fermentação alcoólica e 6 mols de CO_2 para o ciclo de Krebs. Assim, da Eq 4.11 e da Tab 4.3, do valor de $Y_{P2/S} = 0{,}440$ para CO_2 pode-se considerar ¼ para fermentação alcoólica e ¾ o ciclo de Krebs, ou seja:

¼ $\eta_{P2} \approx 11{,}00\%$ => $Y_{P2/S} = 0{,}110$ para fermentação alcoólica;

¾ $\eta_{P2} \approx 33{,}00\%$ => $Y_{P2/S} = 0{,}330$ para ciclo de Krebs.

A Tabela 4.4 encerra os valores de rendimentos, os fatores conversão e coeficientes estequiométricos considerando as três vias metabólicas preponderantes para *Zymomonas mobilis*.

Tabela 4.4 – Rendimento, fatores de conversão e coeficientes estequiométricos para produção de etanol por *Zymomonas mobilis* a partir de glicose incluindo as três rotas metabólicas competitivas

(a) Fermentação alcoólica	**(b) Crescimento celular**	**(c) Fermentação lática**
Etanol (P_1) + ¼ CO_2 (P_2)	¾ CO_2 (P_2) + H_2O (P_4)	Ácido lático (P_3)
$\eta_{P1(Entner\ Doudoroff)} + \frac{1}{4}\eta_{P2} =$ 49,33+11,00 ≈ 60,33%	$\frac{3}{4}\eta_{P2} + \eta_{P4} =$ $\eta_{(3/4P2+P4)(Z.\ mobilis)} =$ 33,00+4,02 ≈ 37,02%	$\eta_{P3} \approx 2{,}65\%$
$Y_{P1/S(Entner\ Doudoroff)} + \frac{1}{4} Y_{P2/S} =$ $Y_{(P1+1/4P2)(Z.\ mobilis)} = 0{,}603$	$\frac{3}{4}Y_{P2/S} + Y_{P4} =$ $Y_{(3/4P2+P4)(Z.\ mobilis)} = 0{,}370$	$Y_{P3/S} = 0{,}027$
$Coef._{Etanol} + \frac{1}{4} Coef._{CO2} =$ $Coef._{Ferm.alcoólica} = 2{,}380$	$\frac{3}{4} Coef._{CO2} + Coef._{H2O} =$ $Coef._{ciclo\ Krebs} = 1{,}752$	$Coef._{Ferm.\ latica} = 0{,}053$

Os valores dos coeficientes estequiométricos referentes à cada rota metabólica calculados na Tabela 4.4 serão utilizados como parâmetros estequiométricos no modelo cibernético proposto neste trabalho.

4.1.4 Comparação com o rendimento teórico para levedura

O rendimento teórico, conforme a Equação (2.1) do Capítulo 2, estabelecida em 1810 por Gay-Lussac, para conversão fermentativa de glicose a etanol por levedura:

$$\underset{180g}{C_6H_{12}O_6} \longrightarrow \underset{92g}{2C_2H_5OH} + \underset{88g}{2CO_2} \tag{2.1}$$

Assim, o rendimento teórico da levedura para a formação de etanol é $\eta_{Teórico\ (Levedura/Gay\text{-}Lussac,\ 1810)} = 51{,}1\%$, por peso (Glazer e Nikaio, 2007).

Na Tabela 4.2, o correlato rendimento da formação de etanol para *Zymomonas mobilis* pela rota de Entner-Doudoroff foi calculado, sendo $\eta_{P1(Z.\ mobilis/Entner\text{-}Doudoroff)} \approx 49{,}33\%$.

Correlacionando o rendimento calculado para *Zymomonas mobilis* com o rendimento teórico proposto por Gay-Lussac (1810) pode-se estabelecer o rendimento teórico similar para a rota de Entner-Doudoroff para *Z. mobilis* ($\eta_{P1Entner/Teórico}$). Então:

$$\begin{bmatrix} 51{,}11\% - 100\% \\ 49{,}33\% - \eta_{P1\mathbf{Entner/Teórico}} \end{bmatrix} \Rightarrow \eta_{P1\mathbf{Entner/Teórico}} = 97{,}0\%$$

Conforme visto no Capítulo 2, as bactérias *Zymomonas mobilis* alcançam rendimento de formação de etanol a partir de glicose até 97% do valor teórico máximo. Pelo cálculo acima,

partindo do valor de rendimento para formação de etanol obtido da estequiometria em uso neste trabalho ($\eta_{P1(Z.\ mobilis/\text{Entner-Doudoroff})} \approx 49{,}33\%$), obteve-se o mesmo rendimento citado na literatura por Sprenger (1996) e Glazer e Nikaio (2007).

4.1.5 Proposta do modelo cibernético

4.1.5.1 Definição das equações do modelo cibernético

A proposição do modelo cibernético para a fermentação alcoólica contínua catalisada por *Zymomonas mobilis*, desenvolvida por Camêlo (2009), foi inicialmente baseado no modelo já proposto na literatura para processo contínuo de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* (Jones e Kompala, 1999), contudo concebido especificamente tendo em conta as características do processo contínuo biotransformado por *Zymomonas mobilis*. O modelo de Jones e Kompala (1999) empregando *Saccharomyces cerevisiae* está detalhadamente descrito no Apêndice B.

Além da diferença dos micro-organismos utilizados nos processos (leveduras e bactérias) citados acima, não foi encontrada referência de comportamento diáuxico em *Zymomonas mobilis* na literatura, logo não há a multiplicidade de substratos como descrito por Jones e Kompala (1999) – glicose e etanol. Contudo, a literatura descreve que aproximações cibernéticas apresentadas têm sido extremamente apropriadas na descrição de comportamento de biorreatores, baseadas no postulado de que as células são micro-organismos que mudam seu nível interno de enzimas em resposta a alterações do ambiente (Kompala et al., 1986; Varner e Ramkrishna, 1999; Namjoshi et al., 2003; Namjoshi e Ramkrishna, 2005). A Tabela 4.5 reúne as equações componentes do modelo cibernético proposto para *Zymomonas mobilis*, bem como apresenta as unidades de medida e descrição dos termos e das variáveis.

A topologia da rede cibernética para a concepção do MHCN foi definida a partiu do metabólito piruvato, considerando as vias divergentes fermentação alcoólica, crescimento celular e fermentação lática, como pode ser visualizado no esquema da Figura 4.5. Para cada uma das três rotas divergentes foram definidas as variáveis cibernéticas de controle da síntese enzimática (Equações 4.23, 4.24 e 4.25) e da atividade enzimática (Equações 4.26, 4.27 e 4.28), as quais englobam os detalhes regulatórios do sistema biológico na modelagem.

Tabela 4.5 – Proposta do modelo cibernético para *Zymomonas mobilis* em operação em modo contínuo iniciado por operação em batelada

Nº	Equações	Descrição	Obs
4.13	$\mu_1 = \mu_{1,max}\dfrac{\mu_{1,max}+\beta}{\alpha+\alpha^*}$ $[h^{-1}]$	Velocidade específica para a rota metabólica de fermentação alcoólica (fermentação da glicose)	$\mu_i = \mu_{i,max}\dfrac{\mu_{i,max}+\beta}{\alpha+\alpha^*}$ Forma geral
4.14	$\mu_2 = \mu_{2,max}\dfrac{\mu_{2,max}+\beta}{\alpha+\alpha^*}$ $[h^{-1}]$	Velocidade específica para a rota metabólica de crescimento celular (oxidação da glicose)	-
4.15	$\mu_3 = \mu_{3,max}\dfrac{\mu_{3,max}+\beta}{\alpha+\alpha^*}$ $[h^{-1}]$	Velocidade específica para a rota metabólica de fermentação lática (fermentação da glicose)	-
4.16	$r_1 = \mu_1 e_1 \dfrac{G}{K_1+G}$ $[g_{enzima1}\ g^{-1}_{célula}\ h^{-1}] \equiv h^{-1}$	Velocidade instantânea de consumo de substrato para fermentação alcoólica	$r_i = \mu_i e_i \dfrac{G}{K_i+G}$ Fórmula geral
4.17	$r_2 = \mu_2 e_2 \dfrac{G}{K_2+G}$ $[g_{enzima2}\ g^{-1}_{célula}\ h^{-1}] \equiv h^{-1}$	Velocidade instantânea de consumo de substrato para o ciclo de Krebs	-
4.18	$r_3 = \mu_3 e_3 \dfrac{G}{K_3+G}$ $[g_{enzima3}\ g^{-1}_{célula}\ h^{-1}] \equiv h^{-1}$	Velocidade instantânea de consumo de substrato para fermentação lática	-
4.19	$Y_{(P/S)1Cont} = \dfrac{E}{(G_F - G)}$ $[g_{etanol}\ g^{-1}_{glicose}]$	Coeficiente de rendimento para a rota metabólica da fermentação da glicose (formação de etanol) – Operação contínua	Deduzidas a partir do balanço material $\dfrac{dE}{dt}, \dfrac{dX}{dt}$ e $\dfrac{dL}{dt}$
4.20	$Y_{(X/S)2Cont} = \dfrac{X}{(G_F - G)}$ $[g_{célula}\ g^{-1}_{glicose}]$	Coeficiente de rendimento para a rota metabólica da oxidação da glicose (ciclo de Krebs) – Operação contínua	
4.21	$Y_{(P/S)3Cont} = \dfrac{L}{(G_F - G)}$ $[g_{lactato}\ g^{-1}_{glicose}]$	Coeficiente de rendimento para a rota metabólica da fermentação da glicose (formação de lactato) – Operação contínua	
4.22	$Y_{(P/S)3Bat} = Y_{(X/S)2Bat} * \varnothing_3$ $[g_{lactato}\ g^{-1}_{glicose}]$	Coeficiente de rendimento para a rota metabólica da fermentação da glicose (formação de lactato) – Operação em batelada	Relação estequiométrica para o catabolismo de glicose (Lehninger et al., 2007)

Continuação da Tabela 4.5

Nº	Equações	Descrição	Obs
4.23	$u_1 = \frac{r_1}{\sum_j r_j}$ [adimensional]	Variável de controle cibernético da síntese enzimática para a rota metabólica da fermentação alcoólica	$u_i = \frac{r_i}{\sum_j r_j}$ Fórmula geral
4.24	$u_2 = \frac{r_2}{\sum_j r_j}$ [adimensional]	Variável de controle cibernético da síntese enzimática para a rota metabólica do ciclo de Krebs	-
4.25	$u_3 = \frac{r_3}{\sum_j r_j}$ [adimensional]	Variável de controle cibernético da síntese enzimática para a rota metabólica da fermentação lática	-
4.26	$v_1 = \frac{r_1}{\max_j r_j}$ [adimensional]	Variável de controle cibernético da atividade enzimática para a rota metabólica da fermentação alcoólica	$v_i = \frac{r_i}{\max_j r_j}$ Fórmula geral
4.27	$v_2 = \frac{r_2}{\max_j r_j}$ [adimensional]	Variável de controle cibernético da atividade enzimática para a rota metabólica do ciclo de Krebs	-
4.28	$v_3 = \frac{r_3}{\max_j r_j}$ [adimensional]	Variável de controle cibernético da atividade enzimática para a rota metabólica da fermentação lática	-
4.29	$\frac{dX}{dt} = \left(\varnothing_2 \frac{r_2 \upsilon_2}{Y_{(X/S)2}} - D \right) X$ [g L^{-1} h^{-1}]	Taxa de crescimento celular (ciclo de Krebs)	-
4.30	$\frac{dG}{dt} = (G_F - G) D - \left(\varnothing_1 \frac{r_1 \upsilon_1}{Y_{(P/S)1}} + \varnothing_2 \frac{r_2 \upsilon_2}{Y_{(X/S)2}} + \varnothing_3 \frac{r_3 \upsilon_3}{Y_{(P/S)3}} \right) X$ [g L^{-1} h^{-1}]	Taxa de consumo de glicose para rotas metabólicas de fermentação alcoólica, ciclo de Krebs e fermentação lática	-
4.31	$\frac{dE}{dt} = -DE + \left(\varnothing_1 \frac{r_1 \upsilon_1}{Y_{(P/S)1}} \right) X$ [g L^{-1} h^{-1}]	Taxa de formação do etanol	-

Continuação da Tabela 4.5

Nº	Equações	Descrição	Obs
4.32	$\frac{dL}{dt} = -DL + \left(\varnothing_3 \frac{r_3 \upsilon_3}{Y_{(P/S)3}}\right) X$ [g L^{-1} h^{-1}]	Taxa de formação do ácido lático	Necessária a Equação (4.22)
4.33	$\frac{de_1}{dt} = \alpha u_1 \frac{G}{K_1 + G} - \left(\sum_j (r_j v_j) + \beta\right) e_1 + \alpha^*$ [$g_{enzima1}$ $g^{-1}_{célula}$ h^{-1}] ≡ h^{-1}	Taxa de produção da enzima chave para a rota metabólica da fermentação alcoólica	$\frac{de_i}{dt} = \alpha u_i \frac{G}{K_i + G} - \left(\sum_j (r_j v_j) + \beta\right) e_i + \alpha^*$ Fórmula geral
4.34	$\frac{de_2}{dt} = \alpha u_2 \frac{G}{K_2 + G} - \left(\sum_j (r_j v_j) + \beta\right) e_2 + \alpha^*$ [$g_{enzima2}$ $g^{-1}_{célula}$ h^{-1}] ≡ h^{-1}	Taxa de produção da enzima chave para a rota metabólica do ciclo de Krebs	-
4.35	$\frac{de_3}{dt} = \alpha u_3 \frac{G}{K_1 + G} - \left(\sum_j (r_j v_j) + \beta\right) e_3 + \alpha^*$ [$g_{enzima3}$ $g^{-1}_{célula}$ h^{-1}] ≡ h^{-1}	Taxa de produção da enzima chave para a rota metabólica da fermentação lática	-
4.36	$q_{CO_2} = \frac{\varnothing_1 r_1 \upsilon_1}{Y_{(P/S)1}} + \frac{\varnothing_2 r_2 \upsilon_2}{Y_{(X/S)2}}$ [h^{-1}]	Taxa específica de produção de CO_2 total no processo	$(q_{CO_2})_1 = \frac{\varnothing_1 r_1 \upsilon_1}{Y_{(P/S)1}}$ Taxa específica de produção de CO_2 na fermentação alcoólica (h^{-1}) $(q_{CO_2})_2 = \frac{\varnothing_2 r_2 \upsilon_2}{Y_{(X/S)2}}$ Taxa específica de produção de CO_2 no ciclo de Krebs (h^{-1})
4.37	$q_{O_2} = \frac{\varnothing_2 r_2}{Y_{(X/S)2}}$ [h^{-1}]	Taxa específica de consumo de O_2 no ciclo de Krebs (h^{-1})	-
4.38	$RQ = \frac{(q_{CO_2})_2}{q_{O_2}}$ [adimensional]	Quociente de respiração (exclusivo para o ciclo de Krebs)	-

Obs: e_i [g_{enzima_i} $g^{-1}_{célula}$]; K_i [gL^{-1}]; $\varnothing_i$ [$g\,g^{-1}$]; D [h^{-1}]; $Y_{(P/S)1}$ [g_{etanol} $g^{-1}_{glicose}$]; $Y_{(X/S)2}$ [$g_{célula}$ $g^{-1}_{glicose}$]; $Y_{(P/S)1}$ [$g_{lactato}$ $g^{-1}_{glicose}$]; α^* [h^{-1}];

O modelo cibernético proposto neste trabalho foi concebido com algumas diferenças em relação ao modelo tomado por base de Jones e Kompala (1999) descrito no Apêndice B, em função da adequação as características do processo em estudo. As referidas diferenças do modelo cibernético atual são:

a) Equações 4.17 e B.4 (velocidade instantânea de consumo de substrato para o ciclo de Krebs): a Equação 4.17 não contem o 2º termo de saturação de oxigênio para simular o efeito que a variação da concentração de oxigênio dissolvido tem na indução ou na inibição da síntese enzimática das vias oxidativas. Na Equação B.4 o oxigênio dissolvido é considerado como um segundo substrato, sendo incluído nessas equações como um segundo termo de saturação;

b) Equações 4.18 e B.5 (velocidade instantânea de consumo de substrato para fermentação lática): descrição análoga à letra a);

c) Equações 4.29 e B.6 (taxa de crescimento celular): a Equação 4.29 diferencia-se da Equação B.6 por estar ponderada pelo parâmetro estequiométrico para a rota metabólica de crescimento celular ($\varnothing_2$) e Coeficiente de rendimento da rota metabólica de crescimento celular ($Y_{X/S}$);

d) Equações 4.30 e B.7 (taxa de consumo de glicose para as 3 rotas metabólicas): na Equação 4.30 inclui o termo de controle cibernético para a rota metabólica de fermentação lática, sendo os três termos cibernéticos de controle das três rotas metabólicas ponderados também pelos respectivos parâmetros estequiométricos. Contudo, a Equação 4.30 não contempla os termos de taxa referentes ao carboidrato armazenado intracelularmente presente na Equação B.7;

e) Equações 4.31 e B8 (taxa de formação do etanol): na Equação 4.31 não foi inserida a subtração do termo cibernético relativo crescimento celular;

f) foi inserida a Equação 4.32 (taxa de formação do ácido lático) não estudada por Jones e Kompala (1999);

g) não foi considerada a Equação B.9, uma vez que neste estudo não se considerou a taxa de consumo de oxigênio dissolvido.

4.1.5.2 Condições iniciais e operacionais do processo

As condições iniciais [concentrações de células (X(0)), glicose (G(0)) e etanol (E(0))] e condições operacionais (taxa de diluição da linha de adição de glicose (D) e concentração de glicose na linha de alimentação (G_F)), necessárias para inicializar as equações diferenciais do

modelo cibernético proposto na Tabela 4.5, estão relacionados na Tabela 4.6 para operação em batelada e Tabela 4.7 para o modo contínuo. Os valores foram obtidos nas fermentações contínuas FC01 a FC07, FC10 e FC11 do trabalho de Camêlo (2009).

As concentrações de lactato não foram obtidas experimentalmente por Camêlo (2009), logo também não está disponível a condição inicial para a equação de taxa de formação de lactato (Equação 4.32). Assim, os valores das concentrações de lactato precisarão ser determinados empregando a Equação (4.32), o que será discutido na sessão 4.2 correspondente a concepção do modelo híbrido cibernético / neuronal a seguir.

As condições iniciais para as concentrações das enzimas chaves para cada uma das três rotas metabólicas [$e_1(0)$, $e_2(0)$ e $e_3(0)$] também não estão disponíveis no trabalho de Camêlo (2009) e serão tratadas como parâmetros a estimar, conforme exposto na Tabela 4.9.

Tabela 4.6 - Condições iniciais das variáveis e condições de operação do processo contínuo de produção de bioetanol por *Zymomonas mobilis* para o modelo cibernético – etapa operada em BATELADA (Camêlo, 2009)

Fermentações	Tempo Inicial (h)	Tempo Final (h)	X_0 (g L^{-1})	G_0 (g L^{-1})	E_0 (g L^{-1})	G_f (g L^{-1})	D (h^{-1})
FC01	0,0	17,5	0,029	92,638	9,099	0,000	0,00
FC02	0,0	21,5	0,051	92,466	4,832	0,000	0,00
FC03	0,0	15,5	0,058	140,491	2,420	0,000	0,00
FC04	0,0	23,5	0,023	145,767	2,424	0,000	0,00
FC05	0,0	35,5	0,102	194,745	3,104	0,000	0,00
FC06	0,0	36,5	0,271	184,791	3,099	0,000	0,00
FC07	0,0	62,5	0,098	197,527	3,987	0,000	0,00
FC10	0,0	22,5	0,068	90,798	8,091	0,000	0,00
FC11	0,0	22,5	0,068	96,319	7,054	0,000	0,00

Dos resultados do estudo paramétrico do modelo representativo do sistema (Daugulis et al., 1997), por meio dos gráficos de diagrama de bifurcação, Camêlo (2009) escolheu a taxa de diluição D = 0,06 h^{-1}, onde estados estacionários e oscilações podem ser atingidos. Assim, fixando esta taxa de diluição, variou apenas a concentração do meio reacional (G_0) e a concentração de alimentação (G_F), conforme constante das Tabelas 4.6 e 4.7.

Os fatores de rendimento e velocidades específicas para a fase operada em batelada foram calculados por Camêlo (2009) e estão na Tabela 4.8.

Tabela 4.7 - Condições iniciais das variáveis e condições de operação do processo contínuo de produção de bioetanol por *Zymomonas mobilis* para o modelo cibernético – etapa operada no modo CONTÍNUO (Camêlo, 2009)

Fermentações	Tempo Inicial (h)	Tempo Final (h)	X_0 (g L^{-1})	G_0 (g L^{-1})	E_0 (g L^{-1})	G_f (g L^{-1})	D (h^{-1})
FC01	20,0	80,0	1,074	0,758	36,442	100	0,06
FC02	23,5	98,0	1,389	1,675	41,459	200	0,06
FC03	17,5	70,0	1,426	2,752	58,700	150	0,06
FC04	25,5	94,0	1,705	7,026	52,416	200	0,06
FC05	38,0	103,5	2,300	7,357	98,523	200	0,06
FC06	38,5	93,0	2,320	26,814	84,103	200	0,06
FC07	64,5	123,5	1,672	17,606	60,373	200	0,06
	124,0	146,0	-	-	-	300	0,06
FC10	24,0	47,0	1,232	2,388	44,698	100	0,06
FC11	24,5	47,0	1,382	1,957	49,239	200	0,06

Como já discutido acima, Camêlo (2009) não mediu as concentrações de lactato (L) em seus experimentos, o que inviabilizou o cálculo dos valores correspondentes aos fatores de rendimento de substrato em lactato $Y_{(P/S)3}$. Desta forma, este fator de rendimento poderá ser abordado como parâmetro do modelo cibernético na sessão 4.1.5.3 (Tabela 4.9) ou poderá ser calculado pela correlação proposta na Equação (4.22).

Os valores das taxas específicas de crescimento constantes da última coluna da Tabela 4.8 não foram claramente especificados por Camêlo (2009). Ao final da apresentação dos gráficos experimentais das corridas FC01 a FC11, a referida autora cita serem correspondentes à taxa específica de crescimento, inserindo-os na tabela resumo das informações referentes às fermentações descontínuas e contínuas. No entanto, diferem dos valores das velocidades específicas máximas de crescimento calculados pela autora para a etapa em batelada, contudo não é possível certificar serem correspondentes à etapa contínua e / ou máximas.

Tabela 4.8 – Fatores de conversão e velocidades específicas de crescimento para operação do processo contínuo de produção de bioetanol por *Zymomonas mobilis* para o modelo cibernético

Fermentações	$t_{F\ Bat}$ (h)	$Y_{(P/S)1\ Bat}$ ($g_{Etanol}\ g^{-1}_{Glicose}$)	$Y_{(X/S)2\ Bat}$ ($g_{Célula}\ g^{-1}_{Glicose}$)	$\mu_{max\ Bat}$ (h^{-1})	μ (h^{-1})
FC01	18	0,497	0,014	0,299	0,319
FC02	22	0,384	0,014	0,288	0,264
FC03	16	0,336	0,011	0,281	0,291
FC04	24	0,235	0,013	0,263	0,257
FC05	36,5	0,486	0,014	0,102	0,113
FC06	37	0,534	0,012	0,093	0,093
FC07	63	0,477	0,014	0,145	0,115
FC08	37	0,495	0,012	0,093	0,093
FC09	22	0,463	0,014	0,247	0,247
FC10	23	0,447	0,018	0,247	0,222
FC11	23	0,467	0,015	0,223	0,247

4.1.5.3 Parâmetros do modelo cibernético

Os parâmetros para o modelo cibernético proposto na Tabela 4.5 constam da Tabela 4.9, onde estão detalhadas as suas situações e / ou origens.

Tabela 4.9 – Parâmetros para o modelo cibernético

Nº	Parâmetro	Descrição	Valores	Unidade	Situação e / ou origem
1	α	Taxa de síntese enzimática	(1)	h^{-1}	(1) Estimar parâmetro
2	α^*	Síntese enzimática constitutiva	(1)	h^{-1}	(1) Estimar parâmetro
3	β	Taxa de degradação enzimática	(1)	h^{-1}	(1) Estimar parâmetro
4	$\mu_{1,max}$	Taxa específica de crescimento máxima para a rota de metabólica fermentação alcoólica	(2)	h^{-1}	(2) Operação batelada: valores da Tabela 4.8 (2) Operação contínua: estimar parâmetro
5	$\mu_{2,max}$	Taxa específica de crescimento máxima para a rota metabólica de crescimento celular (Ciclo de Krebs)	(2)	h^{-1}	(2) Operação batelada: valores da Tabela 4.8 (2) Operação contínua: estimar parâmetro
6	$\mu_{3,max}$	Taxa específica de crescimento máxima para a rota metabólica de fermentação lática	(3)	h^{-1}	(3) Estima parâmetro. Necessário determinar os valores das concentrações de lactado, conforme discutido na sessão 4.2
7	$e_1(0)$	Concentração intracelular inicial da enzima chave para a rota metabólica de fermentação alcoólica	(4)	$g_{enzima1}\ g^{-1}_{célula}$	(4) Estimar condição inicial
8	$e_2(0)$	Concentração intracelular inicial da enzima chave para a rota metabólica de crescimento celular (ciclo de Krebs)	(4)	$g_{enzima2}\ g^{-1}_{célula}$	(4) Estimar condição inicial
9	$e_3(0)$	Concentração intracelular inicial da enzima chave para a rota metabólica da fermentação da glicose (fermentação lática)	(5)	$g_{enzima3}\ g^{-1}_{célula}$	(5) Estimar condição inicial. Necessário determinar os valores das concentrações de lactado, conforme discutido na sessão 4.2
10	k_1	Constante de saturação para via metabólica de fermentação alcoólica	(6)	$g\ L^{-1}$	(6) Determinar pelo gráfico $\mu = f(S)$ ou estimar parâmetro
11	k_2	Constante de saturação para via metabólica de crescimento celular (ciclo de Krebs)	(6)	$g\ L^{-1}$	(6) Determinar pelo gráfico $\mu = f(S)$ ou estimar parâmetro
12	k_3	Constante de saturação para via metabólica de fermentação lática	(6)	$g\ L^{-1}$	(6) Determinar pelo gráfico $\mu = f(S)$ ou estimar parâmetro
13	$\varnothing_1$	Parâmetro estequiométrico para a rota metabólica da fermentação alcoólica	2,380	$g\ g^{-1}$	- Valores na Tabela 4.4. Equação (4.11)

Continuação da Tabela 4.9

Nº	Parâmetro	Descrição	Valores	Unidade	Situação e / ou origem
14	$\varnothing_2$	Parâmetro estequiométrico para a rota metabólica de crescimento celular (ciclo Krebs)	1,752	$g\ g^{-1}$	- Valores na Tabela 4.4. Equação (4.11)
15	$\varnothing_3$	Parâmetro estequiométrico para a rota metabólica de fermentação lática	0,053	$g\ g^{-1}$	- Valores na Tabela 4.4. Equação (4.11)
16	$Y_{(P/S)1Bat}$	Coeficiente de rendimento para a rota metabólica de fermentação alcoólica – Operação em batelada	(7)	$g_{Etanol}\ g_{Glicose}^{-1}$	(7) Valores na Tabela 4.8
17	$Y_{(X/S)2Bat}$	Coeficiente de rendimento para a rota metabólica de crescimento celular (ciclo de Krebs) – Operação em batelada	(7)	$g_{Célula}\ g_{Glicose}^{-1}$	(7) Valores na Tabela 4.8
18	$Y_{(P/S)3Bat}$	Coeficiente de rendimento para a rota metabólica da fermentação da glicose (formação de lactato) – Operação em batelada	(7)	$g_{Lactato}\ g_{Glicose}^{-1}$	(7) Calcular pela Equação (4.22) – Tabela 4.5 ou determinar utilizando os valores de lactato, conforme discutido na sessão 4.2
19	$Y_{(P/S)1Cont}$	Coeficiente de rendimento para a rota metabólica da fermentação da glicose (formação de etanol) – Operação contínua	(8)	$g_{Etanol}\ g_{Glicose}^{-1}$	(8) Calcular pela Equação (4.19) – Tabela 4.5
20	$Y_{(X/S)2Cont}$	Coeficiente de rendimento para a rota metabólica da oxidação da glicose (ciclo de Krebs) – Operação contínua	(9)	$g_{Célula}\ g_{Glicose}^{-1}$	(9) Calcular pela Equação (4.20) – Tabela 4.5
21	$Y_{(P/S)3Cont}$	Coeficiente de rendimento para a rota metabólica da fermentação da glicose (formação de lactato) – Operação contínua	(10)	$g_{Lactato}\ g_{Glicose}^{-1}$	(10) Calcular pela Equação (4.21) – Tabela 4.5. Necessário determinar os valores das concentrações de lactado, conforme discutido na sessão 4.2

Da análise dos dados da Tabela 4.9 verifica-se a necessidade de estimar 9 – 13 parâmetros, em função da abordagem a ser adotada. A Tabela 4.10 apresenta a comparação quanto à relação do número de equações *versus* número de parâmetros referente aos modelos fenomenológico utilizado por Camêlo (2009) e o modelo cibernético proposto.

Tabela 4.10 – Comparação entre números de equações, parâmetros e graus de liberdade do modelo matemático fenomenológico utilizado por Camêlo (2009) *versus* o modelo cibernético proposto neste trabalho para o processo contínuo de produção de etanol por *Zymomonas mobilis*

Modelo	Origem	Quantidade		Graus de liberdade
		Equações	Parâmetros	
Fenomenológico Camêlo (2009)	Daugulis et al.(1997): *Zymomonas mobilis* (contínuo)	15	18	-3
Cibernético	Jones e Kompala (1999): *Saccharomyces cerevisiae* (contínuo)	26	9 - 13	17 - 13

Observando a Tabela 4.10, verifica-se que o modelo cibernético concebido tem grau de liberdade positivo, enquanto o modelo fenomenológico proposto por Daugulis et al. (1997) e utilizado por Camêlo (2009) possui grau de liberdade negativo. Desta forma as correlações na matriz de covariância do modelo cibernético serão menores, ocasionando menor interdependência dos parâmetros e, por conseguinte, favorecendo a etapa de estimação.

Dada as diferenças de condições operacionais de cada fermentação experimental de Camêlo (2009) - FC01a FC07, FC10 e FC11, os parâmetros devem ser estimados para cada uma das fermentações contínuas.

Tem em vista Camêlo (2009) não ter medido experimentalmente as concentrações de lactato, será estudada a proposta do modelo híbrido como alternativa de representação do processo fermentativo em estudo e também para permitir determinar os valores dos dados de concentração de lactato. A proposta do modelo híbrido está na sessão 4.2.

4.2 CONCEPÇÃO DO MODELO HÍBRIDO CIBERNÉTICO / NEURONAL

Como descrito anteriormente, os dados experimentais referentes à concentração lactato no meio reacional não foram medidos, implicando também no desconhecimento de suas condições iniciais. A falta da condição inicial não permite inicializar de taxa de formação do ácido lático (Equação 4.32) e consequentemente não há possibilidade de simular o processo. Da mesma forma, as equações de taxa de produção de enzima chave para a i-ésima rota metabólica (Equações 4.33, 4.34 e 4.35) também não podem ser integradas, visto a ausência dos valores iniciais das respectivas enzimas chaves, condição suficiente, pois Kompala et al. (1986) entenderam estar implícito ser desnecessária a identificação da enzima chave para cada substrato e fazer medidas de seu nível durante o crescimento, posto que a simulação do modelo requer somente o valor inicial do nível relativo da enzima. Visto que estas variáveis são termos de outras equações do modelo cibernético proposto para o processo, verifica-se a impossibilidade de resolver o modelo.

Nesta condição, foi proposta uma rede neuronal artificial com saídas compostas por componentes do modelo cibernético, destinada a gerar os dados para alimentar as equações de taxa do balanço material do modelo híbrido cibernético / neuronal (MHCN) proposto para a representação do processo em estudo.

4.2.1 Definição das variáveis de entrada e de saída da RNA

4.2.1.1 Variáveis de entrada

As variáveis de entrada da RNA são as correspondentes aos dados experimentais e condições de processo das fermentações contínuas estudadas por Camêlo (2009). A Tabela 3.6 do Capítulo 3, esboça a sequência de entrada das variáveis de alimentação e as condições de treinamento para a RNA do MHCN em função do uso dos elementos de atraso dinâmico nas variáveis de concentração e do emprego da variável G_F.

A Figura 3.15 do Capítulo 3 ilustra a disposição das variáveis na entrada da rede neuronal.

4.2.1.2 Variáveis de saída

As variáveis de saída Z_1, Z_2 e Z_3 incorporam o conceito cibernético, uma vez que são deduzidas a partir das equações do modelo cibernético proposto para o processo fermentativo de produção de etanol por *Zymomona mobilis*.

A Tabela 4.11 apresenta a nomenclatura das variáveis cibernéticas de saída das RNA.

Tabela 4.11 - Variáveis cibernéticas de saída da RNA do MHCN

Nr	Var. saída	Descrição
1	Z_1	Variável cibernética de saída relativa à rota metabólica da fermentação alcoólica [h^{-1}]
2	Z_2	Variável cibernética de saída relativa à rota metabólica de crescimento celular [h^{-1}]
3	Z_3	Variável cibernética de saída relativa à rota metabólica da fermentação lática [h^{-1}]

A Figura 3.15 do Capítulo 3 ilustra a disposição das variáveis na saída da rede neuronal.

Para deduzir a variáveis cibernéticas de saída torna-se necessário explicitar os termos cibernéticos e fatores de rendimento das equações do modelo cibernético proposto, conforme descrito abaixo.

4.2.1.2.1 Variável Z_1 - fermentação alcoólica:

partindo da Equação $\frac{dE}{dt} = -DE + \left(\varnothing_1 \frac{r_1 \upsilon_1}{Y_{(P/S)1}} \right) X$ (4.31), tem-se:

$$Z_1 = \frac{r_1 \upsilon_1}{Y_{(P/S)1}} = \frac{1}{X} \frac{1}{\varnothing_1} \left(\frac{dE}{dt} + DE \right) \quad [h^{-1}] \tag{4.39}$$

4.2.1.2.2 Variável Z_2 - Crescimento celular:

da Equação $\frac{dX}{dt} = \left(\varnothing_2 \frac{r_2 \upsilon_2}{Y_{(X/S)2}} - D \right) X$ (4.29), obtém-se:

$$Z_2 = \frac{r_2 \upsilon_2}{Y_{(X/S)2}} = \frac{1}{\varnothing_2} \left(\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} + D \right) \quad [h^{-1}] \tag{4.40}$$

4.2.1.2.3 Variável Z_3 - fermentação lática:

Os dados experimentais de Camêlo (2009) não contemplam a concentração de ácido lático, o que inviabiliza empregar diretamente a Equação (4.32) na definição da variável cibernética relativa à rota metabólica da fermentação lática.

$$\frac{dL}{dt} = -DL + \left(\varnothing_3 \frac{r_3 \upsilon_3}{Y_{(P/S)3}} \right) X \qquad [g\ L^{-1}\ h^{-1}] \tag{4.32}$$

Dessa forma, devem-se explicitar os termos cibernéticos partindo da equação de balanço material para o consumo de glicose (Equação 4.30), de forma a correlacionar a variável cibernética Z_3 à fermentação lática. Então:

tendo a equação $\frac{dG}{dt} = (G_F - G)D - \left(\varnothing_1 \frac{r_1 \upsilon_1}{Y_{(P/S)1}} + \varnothing_2 \frac{r_2 \upsilon_2}{Y_{(X/S)2}} + \varnothing_3 \frac{r_3 \upsilon_3}{Y_{(P/S)3}} \right) X$ (4.30), chega-se a:

$$Z_3 = \frac{r_3 \upsilon_3}{Y_{(P/S)3}} = -\frac{1}{\varnothing_3} \left[\frac{1}{x} \left(\frac{dG}{dt} - (G_F - G)D \right) + \varnothing_1 \frac{r_1 \upsilon_1}{Y_{(P/S)1}} + \varnothing_2 \frac{r_2 \upsilon_2}{Y_{(X/S)2}} \right] \qquad [h^{-1}] \tag{4.41}$$

Com os valores de $Z_3 = \frac{r_3 \upsilon_3}{Y_{(P/S)3}}$, pode-se substituir dinamicamente na Equação de taxa de formação do lactato (Equação 4.32) para obtenção das concentrações de lactato ao longo do tempo de fermentação:

$$\frac{dL}{dt} = -DL + \left(\varnothing_3 \frac{r_3 \upsilon_3}{Y_{(P/S)3}} \right) X \qquad [g\ L^{-1}\ h^{-1}] \tag{4.32}$$

O valor da <u>concentração inicial de lactato (L_0)</u> para a simulação da equação diferencial para lactato (Equação 4.32) pode ser:

a) iniciando a simulação no tempo zero da operação em batelada: considerado ZERO, como normalmente assumido para os produtos em processos fermentativos;

b) iniciando a simulação no modo contínuo: selecionar a concentração correspondente ao tempo de início da operação contínua.

Desta maneira, o MHCN concebido pode ser empregado como sensor vitural (*soft sensor*) para acompanhamento da produção de lactato durante o processo fermentativo.

Além disso, utilizando as Equações 4.33, 4.34 e 4.35 é possível utilizar o modelo cibernético proposto, a partir da determinação da concentração inicial das enzimas chaves para cada uma das três rotas metabólicas, para simular o perfil enzimático das vias da fermentação

alcoólica, ciclo de Krebs e fermentação lática ao longo do processo contínuo em estudo. Tal possibilidade está em consonância com a proposta de Kompala et al. (1986), quando discutiram estar implícito não ser necessário fazer a medida do nível enzimático ao longo do crescimento, visto que a simulação requer somente o valor inicial do nível relativo da enzima para iniciação da equação diferencial correspondente. Assim, a partir da determinação do valor máximo na fase exponencial de crescimento das enzimas correspondente a cada rota metabólica [$e_1(0)$; $e_2(0)$; $e_3(0)$], torna-se possível identificar o perfil enzimático ao longo do processo.

Outra possibilidade é o uso do MHCN para promover simulações para estudos de otimização na determinação experimental das concentrações enzimáticas, incluindo o próprio valor inicial das enzimas chaves. É possível também determinar outros metabólitos de difícil quantificação experimental.

As condições iniciais das variáveis, as condições operacionais do processo e os parâmetros necessários para solução das equações das variáveis cibernéticas de saída, correspondente a i-ésima da rota metabólica, têm a localização descrita na Tabela 4.12.

Tabela 4.12 – Fontes das condições iniciais, condições de operação e parâmetros necessários para simulação das equações das variáveis cibernéticas de saída para as três rotas metabólicas do processo contínuo de produção de etanol por *Zymomonas mobilis*

Dados	Operação	
	Batelada	Contínua
$\mathbf{E_0}$	Tabela 4.6	Tabela 4.7
$\mathbf{X_0}$	Tabela 4.6	Tabela 4.7
$\mathbf{G_0}$	Tabela 4.6	Tabela 4.7
$\mathbf{G_F}$	Tabela 4.6	Tabela 4.7
$\mathbf{D}$	Tabela 4.6	Tabela 4.7
$\varnothing_1$	Tabela 4.9	Tabela 4.9
$\varnothing_2$	Tabela 4.9	Tabela 4.9
$\varnothing_3$	Tabela 4.9	Tabela 4.9
$\mathbf{Y_{(P/S)1}}$	Tabela 4.8	Equação (4.19)
$\mathbf{Y_{(X/S)2}}$	Tabela 4.8	Equação (4.20)
$\mathbf{Y_{(P/S)3}}$	Equação (4.22)	Equação (4.21)

Os demais termos das Equações (4.39), (4.40) e (4.41) são calculadas continuamente no decorrer do processo fermentativo pelas equações do modelo cibernético descritas na Tabela 4.5.

CAPÍTULO 5

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos no trabalho de proposição de um modelo matemático para melhor representar o processo fermentativo para produção de bioetanol utilizando *Zymomonas mobilis*, descrito em Camêlo (2009), permitindo assim o estudo da dinâmica característica. Para tal empregaram-se técnicas de modelagem cibernética, de redes neuronais artificiais (RNA) e de modelagem híbrida. Os resultados obtidos foram comparados com a resposta do modelo fenomenológico proposto por Daugulis et al. (1997), o qual fora implementado e testado por Camêlo (2009).

São evidenciados os tratamentos aplicados aos dados experimentais, visando adequá-los para o treinamento das RNA, bem como lhes imprimir características a serem absorvidas pelo aprendizado do sistema neuronal. Neste contexto, técnicas de interpolação por *Spline* cúbica e introdução de elementos de atrasos unitários foram aplicados conforme descrito no Capítulo 3.

Os resultados estão dispostos na ordem cronológica de obtenção, ou seja, apresentação da distribuição dos dados históricos e aplicação de tratamentos aos dados, distribuição dos dados históricos em subconjuntos de dados de treinamento e teste, análise de desempenho e seleção das melhores RNA para compor o MHCN e para a RNA autônoma e, por fim, a apresentação e discussão das simulações do modelo híbrido cibernético/neuronal em suas diversas condições, comparando-as com as respostas da RNA autônoma e do modelo fenomenológico proposto por Daugulis et al. (1997) / Camêlo (2009).

5.1 RESULTADOS DA INTERPOLAÇÃO DE DADOS

Os longos tempos necessários para fermentações, principalmente em processos contínuos, aliados à escassez de instrumentos de medida adequados constituem-se em fatores

de dificuldade na obtenção de quantidade suficiente de dados experimentais para aplicação de metodologias de inteligência artificial, em específicos nas redes neuronais artificiais. As RNA, por sua concepção, são mais eficientemente treinadas para problemas com uma grande quantidade de dados históricos (Baughman & Liu, 1995; Haykim, 1999).

Dado as dificuldades citadas acima, Boareto (2005) verificou na literatura que técnicas de interpolação são mais empregadas nos casos em que os valores conhecidos dos dados experimentais podem ser considerados como exatos e confiáveis (Dieguez, 1992; Burden e Faires, 2003). Nestes termos, apesar dos dados experimentais originários de Camêlo (2009) terem sido obtidos em condições operacionais capazes de impelir comportamento oscilatório ao sistema, a disponibilidade de técnicas consagradas para interpolação permite assumir a hipótese do erro de interpolação ser menor que o erro global da rede neuronal (Burden e Faires, 2003), portanto passíveis de serem utilizadas no processo em estudo.

Portanto, os dados experimentais foram interpolados empregando a função *spline* cúbica, conforme metodologia descrita na seção 3.3 do Capítulo 3, tomando como referência a variável independente tempo, a qual foi seccionada em intervalos de 0,5 h. A Tabela 5.1 apresenta as quantidades de dados interpolados obtidos, comparando-as com as quantidades de dados experimentais disponíveis (Tabela 3.4), considerando as condições de treinamento das redes neuronais.

Na Tabela 5.1 são consideradas as condições de treinamento das RNA com inserção de atrasos dinâmicos nas variáveis de estado (E, G e X). As quantidades de dados experimentais e interpolados referem-se igualmente a todas as variáveis de treinamento.

Como pode ser visto na Tabela 5.1, os dados experimentais precisam ser tratados para uso no treinamento das redes. Assim, os dados experimentais de Camêlo (2009) foram interpolados de modo a gerar quantidade suficiente de dados históricos e também foram inseridos elementos de atraso unitário (1 e 2 atrasos dinâmicos) para imprimir comportamento dinâmico não linear as redes neuronais, como discutido por Haykim (2001), tornando-as capazes de responder a esse padrão comportamental do sistema.

Tabela 5.1 - Comparação da quantidade de dados experimentais (Camêlo, 2009) e da quantidade de dados interpolados para fermentações alcoólicas operadas em processo contínuo empregando *Zymomonas mobilis*. Os dados desta tabela referem-se somente a etapa de operação contínua sem adição de etanol exógeno

Fermentações	**Quantidade de dados**				
	Experimentais	**Interpolados**			**Obs**
		Sem atraso dinâmico	**1 atraso dinâmico**	**2 atrasos dinâmicos**	
FC01	19	124	122	121	-
FC02	11	152	151	150	-
FC03	16	108	107	106	-
FC04	20	140	139	138	-
FC05	25	134	133	132	-
FC06	16	112	111	110	-
FC07	17	166	165	164	-
FC08	-	-	-	-	(1)
FC09	-	-	-	-	(2)
FC10	5	48	47	47	-
FC11	5	48	47	46	-
TOTAL	**141**	**1032**	**1022**	**1014**	-

Obs: - Conforme descrito ao final da seção 3.2.1.2 do Cap 3:

*(1) e (2) as FC08 e FC09 não foram empregadas neste estudo;

*(1) a FC08 é continuação da FC06, quando se inicia a adição de etanol exógeno.

Nesse sentido, para auxiliar na interpretação de alguns gráficos apresentados neste trabalho, a Tabela 5.2 apresenta – da esquerda para a direita - a seqüência de tratamento aplicada aos dados interpolados a partir dos dados experimentais de Camêlo (2009).

Na Tabela 5.2 pode ser distinguido o início / final dos intervalos de dados históricos para cada fermentação, dentro de cada condição definida pelo tratamento dos dados aplicado a cada vetor coluna das variáveis de treinamento (entradas e saídas). As informações desta tabela serão importantes para auxiliar na interpretação dos gráficos dos valores preditos pela RNA e observados (dados históricos) *versus* sequência de dados históricos, empregados na análise do desempenho das RNA.

Observa-se também na Tabela 5.2 que as fermentações FC08 e FC09 não são utilizadas neste trabalho, cuja explicação já fora detalhada ao final da sessão 3.2.1.2 do Capítulo 3. Além disso, a ordem de aplicação dos tratamentos de dados segue da esquerda para a direita, sequência na qual se percebe a redução do total de dados. A perda de dados interpolados é ocasionada pela aplicação sucessiva dos tratamentos, como se segue:

(1) o cálculo das derivadas para determinação das variáveis cibernéticas de saída (Zi): foi realizado utilizando o método de Euler Explícito implementado no Matlab, implicando na perda do último dado interpolado de cada variável de treinamento;

(2) retirada dos valores zero das variáveis Z(i) para não prejudicar o treinamento das RNA: os valores zero estavam localizados no início de cada fermentação;

(3) implementação dos elementos unitários de atraso dinâmicos para as variáveis de estado E, G e X: foram implementados um e dois atrasos.

Tabela 5.2 – Seqüência dos intervalos dos dados históricos dentro de cada fermentação contínua (FC) e de tratamentos aplicados aos dados

	Dados históricos interpolados – Intervalo de dados por FC									
	Inicial		Com cálculo das Var $Z_{(i)}$		Sem as Variáveis $Z_{(i)} = 0$		Com 1 atraso dinâmico nas Var de estado		Com 2 atrasos dinâmicos nas Var de estado	
FC	Início	Final	Início	Final	Início	Final	Início	Final	Início	Final
01	1	126	1	125	1	124	1	122	1	121
02	127	280	126	278	125	276	123	273	122	271
03	281	390	279	387	277	384	274	380	272	377
04	391	532	388	528	385	524	381	519	378	515
05	533	688	529	663	525	658	520	652	516	647
06	669	782	664	776	659	770	653	763	648	757
07	783	950	777	943	771	936	764	928	758	921
10	951	1000	944	992	937	984	929	975	922	968
11	1001	1050	993	1041	985	1032	976	1022	969	1014
Total dados	1050		1041		1032		1022		1014	

5.2 REDES NEURONAIS ARTIFICIAIS

Nesta etapa foi utilizada técnica de modelagem por processos subsimbólicos - redes neuronais artificiais, buscando um modelo matemático de sistema neuronal teorizado para integrar o modelo híbrido cibernético/neuronal (MHCN), de forma a permitir o estudo da dinâmica e a representação conveniente das variáveis de estado do processo de produção de bioetanol em processo contínuo, catalisado por *Zymomonas mobilis*, estudado por Camêlo (2009).

Também foram treinadas redes neuronais para comparação de desempenho com o próprio MHCN proposto nesse trabalho. O modelo fenomenológico de Daugulis et al. (1997) - implementado por Camêlo (2009) – também foi comparado com o MHCN.

Para tanto, foi utilizado o programa STATISTICA®, cujo funcionamento e configurações foram apresentados no Capítulo 3.

Em consonância com a topologia das redes a serem treinadas, definida nas Tabelas 3.6 e 3.7 do Capítulo 3, várias RNA foram testadas dentro da arquitetura e finalidades, assim especificadas:

a) RNA autônoma: as saídas são compostas pelas variáveis de estado de concentrações de etanol, de glicose e de células (calculadas um passo a frente). Tem a finalidade de comparação com as respostas dos modelos MHCN e fenomenológico.
b) RNA cibernético/neuronal: contem na saída da rede as 3 variáveis cibernéticas de saída ($Z_{(i)}$) definidas pelas Equações (4.39), (4.40) (4.41) do Capítulo 4. Destina-se a gerar os dados para alimentar as equações de taxa do balanço material do modelo híbrido cibernético/neuronal concebido no Capítulo 4. Sendo i = 1, 2, 3;

Para tanto, os dados interpolados cujas quantidades constam da Tabela 5.2, foram divididos em 2 subconjuntos para o treinamento das RNA: subconjunto de treinamento e subconjunto de teste na proporção de 80% e 20%, respectivamente. Estas proporções estão descritas na sessão 3.5.2 Capítulo 3, cujas quantidades de interesse para esta fase estão especificadas na mesma tabela. Em função da relativa pequena quantidade de dados históricos disponível, não foi selecionado o subconjunto de validação.

Tabela 5.3 - Distribuição do conjunto de dados interpolados em subconjuntos para treinamento e para teste, conforme a condição de treinamento definida com ou sem atrasos dinâmicos. Proporção: 80% de dados para treinamento e 20% de dados para teste

Subconjunto de dados	**Treinamento - atraso dinâmico**		
	Sem atraso	**1 atraso**	**2 atrasos**
Treinamento	826	818	811
Teste	206	204	203
Total	1032	1022	1014

Dentre as redes neuronais treinadas para cada condição de investigação (sem atraso dinâmico, com 1 e com 2 atrasos dinâmicos) – definidas na Tabela 3.6 e 3.7 do Capítulo 3 - o programa STATISTICA selecionou e reteve as dez RNA de menor erro de teste, em acordo com a configuração estabelecida na seção 3.5.1 do Capítulo 3. Dentre estas, com a inserção de atrasos dinâmicos nas variáveis de estado e a colocação ou não da variável de condição de processo "G_f" na camada de entrada, foi investigada a influência da quantidade de variáveis na eficiência do treinamento das RNA. Além disso, a presença de elementos de atraso unitários (z) resulta em um comportamento dinâmico não linear nas redes possuidoras de

unidades não lineares (Haykin, 2001). O tempo de treinamento variou entre 15 - 50 min para cada condição estabelecida na Tabela 3.6 e 3.7. Desta forma, a seguir são mostradas as análises estatísticas empregadas na definição da melhor RNA destinada à representação do processo.

Para a seleção das melhores redes neuronais obtidas, em ambos os casos, baseou-se na metodologia de seleção proposta por Boareto (2005), adaptando-a para as características especificas do caso em estudo.

5.2.1 Análise do desempenho das RNA

O programa STATISTICA para treinamento das redes gera critérios estatísticos próprias, as quais permitem analisar e verificar os desempenhos das RNA.

O funcionamento do programa de treinamento e os fundamentos da metodologia utilizados para gerar os resultados das tabelas desta seção, estão discriminados na seção 3.5 do Capítulo 3.

5.2.1.1 Seleção da RNA autônoma

Nesta etapa foram preparadas as RNA com as saídas compostas pelas variáveis de estado as concentrações de etanol, de glicose e de células. Tem a finalidade de propiciar comparação com as respostas dos modelos cibernético e fenomenológico, analisando assim a eficiência do MHCN frente a outros modelos. A metodologia elaborada para o treinamento das estruturas está descrita na Tabela 3.6 e 3.7 do Capítulo 3.

5.2.1.1.1 Características e desempenho

Na Tabela 5.4 estão as características inerentes às melhores redes neuronais obtidas no treinamento para cada estrutura de rede contendo as variáveis de estado de concentração etanol, de células e de glicose um passo adiante (k+1). As estruturas destas RNA foram definidas na Tabela 3.6 e 3.7 do Capítulo 3. Tal qual o ocorrido no treinamento das RNA do MHCN, apesar do programa de treinamento ter sido configurado para buscar o melhor desempenho dentre as redes do tipo linear, MLP e RBF, observa-se que as de redes do tipo MLP se sobressaíram, cabendo recordar que o programa fora configurado para reter as RNA mais eficientemente treinadas e não a diversidade de redes.

Tabela 5.4 - Relação com as características próprias das melhores RNA autônomas obtidas dentro de cada estrutura de rede com variáveis de estado na saída investigada

Nr	MLP	Perfil	Performance		Erro		Algoritmo	Função	Função de Ativação Camada		Correlação			Condição
		RNA	Trein.	Teste	Trein.	Teste	Trein.	Erro	Escondida	Saída	E	G	X	Trein.
1	8	MLP 7-11-3	0,999834	0,999943	0,000025	0,000011	BFGS 162	SOS	Tanh	Linear	0,999695	0,999950	0,999856	1 ats com Gf
2	3	MLP 7-10-3	0,999828	0,999941	0,000027	0,000012	BFGS 152	SOS	Exponencial	Linear	0,999701	0,999935	0,999849	1 ats com Gf
3	2	MLP 6-10-3	0,999820	0,999936	0,000028	0,000013	BFGS 132	SOS	Exponencial	Linear	0,999677	0,999935	0,999850	1 ats sem Gf
4	6	MLP 9-11-3	0,999915	0,999726	0,000013	0,000046	BFGS 159	SOS	Tanh	Linear	0,999842	0,999968	0,999934	2 ats sem Gf
5	7	MLP 9-11-3	0,999917	0,999719	0,000013	0,000047	BFGS 142	SOS	Exponential	Linear	0,999852	0,999973	0,999927	2 ats sem Gf

Legenda: Nr – classificação da RNA por ordem crescente de erro de teste; MLP – *Perceptron* multicamada. Indica o número atribuído à RNA no programa de treinamento (Statistisca); - Trein. – treinamento; BFGS - Algoritimo Broyden, Fletcher, Goldfarb e Shanno (1970); SOS – Soma dos quadrados; Tanh – tangente hiperbólica; E – concentração de etanol (g L^{-1}); G – concentração de glicose (g L^{-1}); X – concentração de células (g L^{-1}); ats – atraso dinâmico inserido nas variáveis de estado.

Na Tabela 5.4 o método BFGS 152, por exemplo, refere-se à aplicação do algoritmo de Broyden, Fletcher, Goldfarb e Shanno (1970) na otimização das redes neuronais, com 152 iterações.

Analisando os dados da Tabela 5.4, logo a seguir, observa-se:

- o erro de teste da rede de Nr 1 < 2 < 3 < 4 < 5, tendo ordem de grandeza de 10^{-5} para as 5 RNA;

- o coeficiente de correlação para a variável de saída de concentração de etanol de Nr 5> 4 > 2 > 1 > 3;

- o coeficiente de correlação para a variável de saída concentração de glicose de Nr 5 > 4> 1 > 2 > 3;

- o coeficiente de correlação para a variável de saída concentração de células de Nr 4 > 5 > 1 > 3 > 2;

- para as RNA em análise, não há acentuada diferença entre os coeficientes de correlação referente a cada uma das 3 variáveis de saída;

- as redes Nr 1, 2 e 3 apresentam erro de teste muito próximos, com variação da ordem de 10^{-5};

- analisando o número de parâmetros das RNA com variáveis de saída concentração de etanol, de glicose e de células em k+1 (EGX) tem-se:

  * RNA Nr 1 (MLP 7-11-3): EGX_{k+1} = 124;
  * RNA Nr 2 (MLP 7-10-3): EGX_{k+1} = 113;
  * RNA Nr 3 (MLP 6-10-3): EGX_{k+1} = 103;
  * RNA Nr 4 (MLP 9-11-3): EGX_{k+1} = 146;
  * RNA Nr 5 (MLP 9-11-3): EGX_{k+1} = 146.

Conforme já discutido quando do estudo da Tabela 5.4, a rede neuronal de melhor desempenho é a de menor valor para o erro de teste. Nestes termos, a RNA Nr 1 apresenta o melhor desempenho, seguida pelas RNA Nr 2 e 3 com pouquíssima diferença (10^{-5}).

Confrontando as RNA Nr 1 e 3, observa-se que as RNA Nr 1 contem 11 parâmetros a mais. Contudo, exibe menor erro de teste e coeficientes de correlação ligeiramente maiores. Isto posto, optou-se pela RNA Nr 1 MLP.8 (7-11-3) para emprego na presente pesquisa.

Sendo a rede neuronal artificial autônoma MLP.8 foi selecionada dentre as demais estudadas, foram procedidas análises estatísticas complementares, objetivando complementar a verificação estatística de sua capacidade de representação das variáveis de concentração de etanol, concentração de células e concentração de glicose do processo fermentativo contínuo de produção de etanol por *Zymomonas mobilis*.

5.2.1.1.2 Dados preditos pelas RNA versus observados

Na Figura 5.1 os valores preditos pela RNA MLP.8 para a variável de saída concentração de etanol (E_{k+1}) versus valores observados para essa mesma variável (interpolados) são apresentados.

Observa-se na Figura 5.1 que os pontos estão bem dispostos ao longo de uma reta. Isto indica que os dados preditos estão bem correlacionados com os dados observados (interpolados), logo os dados experimentais relativos à concentração de etanol são bem representados pela rede MLP.8 (Montgomery e Runger, 2003).

A Figura 5.2 exibe os valores preditos pela RNA MLP.8 para a variável de saída concentração de glicose (G_{k+1}), versus valores observados para essa mesma variável (valores interpolados).

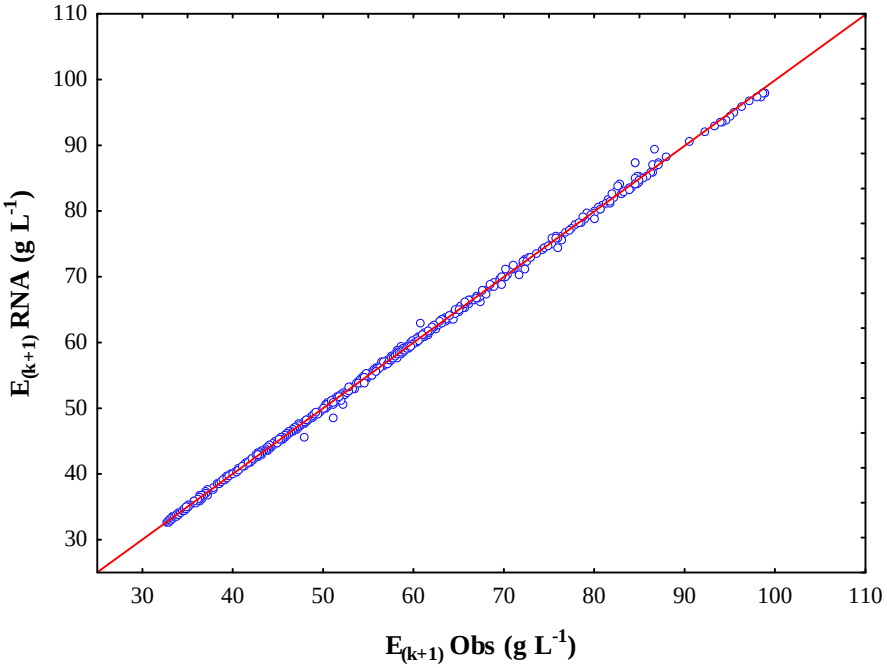


Figura 5.1 – Comparação dos valores da variável de saída concentração de etanol um passo a frente (E_{k+1}) ($g.L^{-1}.h^{-1}$). Valores preditos pela RNA autônoma MLP.8 para a concentração de etanol versus valores-alvo para concentração de etanol (Obs ≡ observado). Curva de ajuste Y = 0,0865+0,9983*X. Dados provenientes da etapa de operação contínua das FC01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 10 e 11, sem adição de etanol exógeno (Camêlo, 2009). **o** Concentração de etanol (interpolada); —— Curva de ajuste

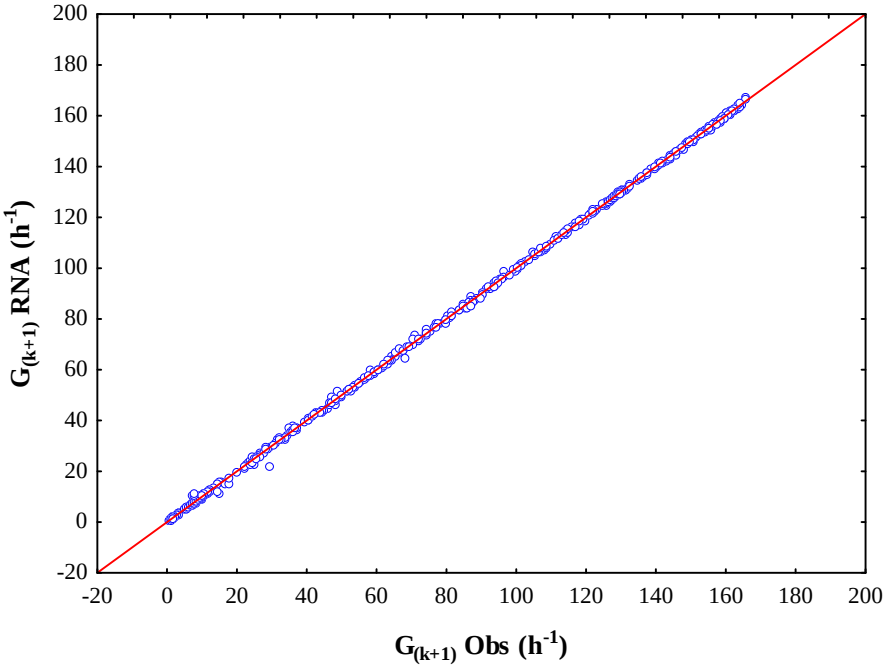


Figura 5.2 - Comparação dos valores da variável de saída concentração de glicose um passo a frente (G_{k+1}) ($g.L^{-1}.h^{-1}$). Valores preditos pela RNA autônoma MLP.8 para a concentração de glicose versus valores-alvo para concentração de glicose (Obs ≡ observado). Curva de ajuste Y = 0,0046+0,9999*X. Dados provenientes da etapa de operação contínua das FC01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 10 e 11, sem adição de etanol exógeno (Camêlo, 2009). o Concentração de glicose (interpolada); — Curva de ajuste

Verifica-se na Figura 5.2 que os pontos também estão bem dispostos ao longo de uma reta. Isto indica que os dados preditos estão bem correlacionados com os dados observados (interpolados), logo os dados experimentais são bem representados pela rede MLP.8 (Montgomery e Runger, 2003).

A Figura 5.3 reporta os valores preditos pela RNA MLP.8 para a variável cibernética de saída concentração de células (X_{k+1}) versus valores observados para essa mesma variável (valores interpolados).

Da mesma forma do discutido para as Figuras 5.1 e 5.2, nota-se na Figura 5.3 que os pontos também estão bem dispostos ao longo de uma reta, indicando estarem os dados preditos bem correlacionados com os dados observados (interpolados). Logo os dados experimentais são bem representados pela rede MLP.8 (Montgomery e Runger, 2003).

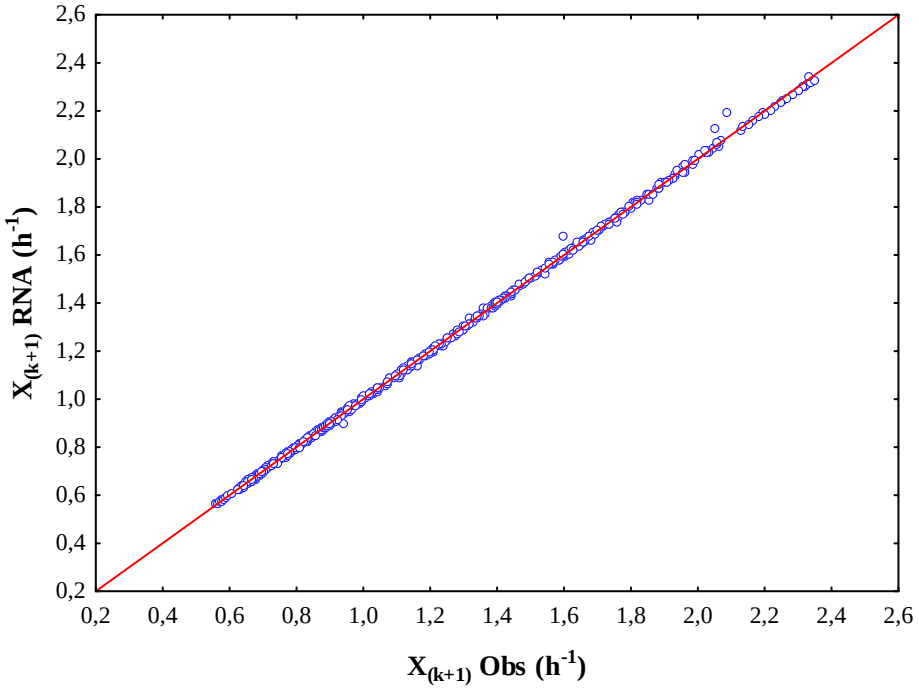


Figura 5.3 - Comparação dos valores da variável de saída concentração de células um passo a frente (X_{k+1}) ($g.L^{-1}.h^{-1}$). Valores preditos pela RNA autônoma MLP.8 para a concentração de células versus valores-alvo para concentração de células (Obs ≡ observado). Curva de ajuste Y = 0,0006+0,9996*X. Dados provenientes da etapa de operação contínua das FC01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 10 e 11, sem adição de etanol exógeno (Camêlo, 2009). **o** Concentração de etanol (interpolada); —— Curva de ajuste

5.2.1.1.3 Comparação dos dados experimentais com os dados preditos pela RNA

A capacidade de predição da rede neuronal selecionada foi verificada também comparando os dados preditos para a variável-alvo com os dados históricos utilizados em função do número de casos. Recorrendo as informações para os dados com um atraso dinâmico contidas na Tabela 5.2, é possível identificar cada fermentação contínua ao longo da sequência de dados históricos disposta no eixo das abscissas.

A Figura 5.4 apresenta a comparação dos valores preditos pela RNA autônoma MLP.8 e valores da variável de saída referente à concentração de etanol (E_{k+1}) ($g\ L^{-1}$) determinado a partir dos dados interpolados pela inserção de um elemento de atraso dinâmico versus a sequência de dados históricos.

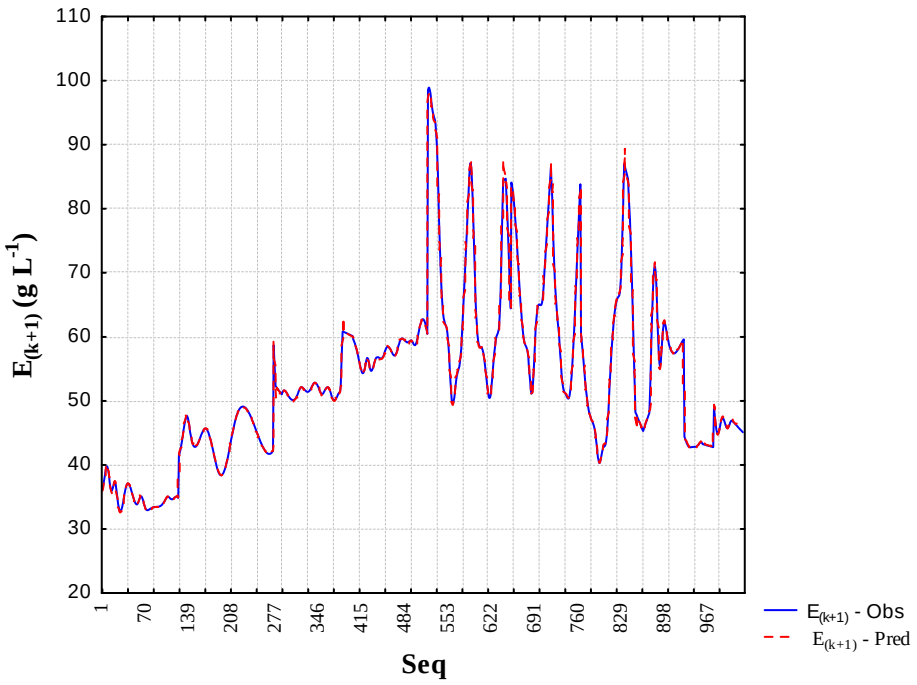


Figura 5.4 - Comparação dos valores da concentração de etanol (E_{k+1}) (g L^{-1}). Valores preditos pela RNA autônoma MLP.8 (Pred = predito) e valores observados (Obs = observado) versus sequência de dados históricos (Seq = sequência). Dados provenientes da etapa de operação contínua das FC01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 10 e 11, sem adição de etanol exógeno (Camêlo, 2009). – – Valores preditos; —— Valores observados

Na Figura 5.4 há boa sobreposição dos dados preditos em relação aos dados observados, reforçando o indicativo da capacidade da RNA MLP.8 em predizer a variável de saída relacionada à concentração de etanol.

A Figura 5.5 exibe a comparação dos valores preditos pela RNA autônoma MLP.8 e valores da variável de saída referente à concentração de etanol (G_{k+1}) (g L^{-1}) determinado a partir dos dados interpolados pela inserção de um elemento de atraso dinâmico versus a sequência de dados históricos.

Na Figura 5.5 a boa sobreposição dos dados preditos em relação aos dados observados pode ser constatada, reforçando o indicativo da capacidade da RNA MLP.8 em predizer a variável de saída relacionada à concentração de glicose.

Na Figura 5.6 a comparação dos valores preditos pela RNA autônoma MLP.8 e valores da variável de saída referente à concentração de etanol (X_{k+1}) (g L^{-1}) determinado a partir dos dados interpolados pela inserção de um elemento de atraso dinâmico versus a sequência de dados históricos é demonstrada.

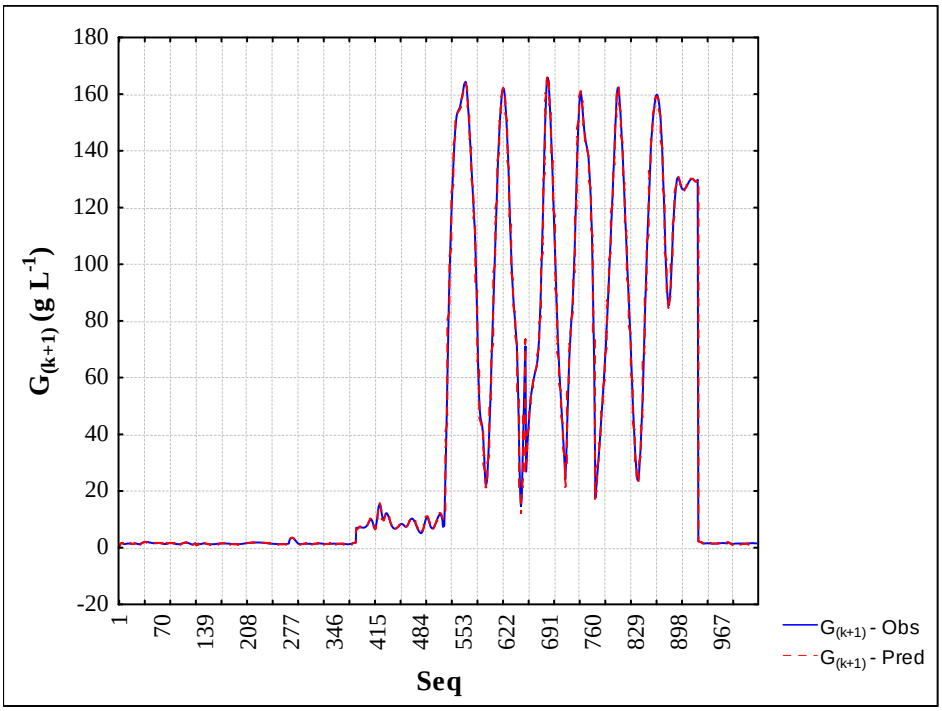


Figura 5.5 - Comparação dos valores da concentração de glicose (G_{k+1}) (g L^{-1}). Valores preditos pela RNA autônoma MLP.8 (Pred = predito) e valores observados (Obs = observado) versus sequência de dados históricos (Seq = sequência). Dados provenientes da etapa de operação contínua das FC01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 10 e 11, sem adição de etanol exógeno (Camêlo, 2009). – – Valores preditos; —— Valores observados

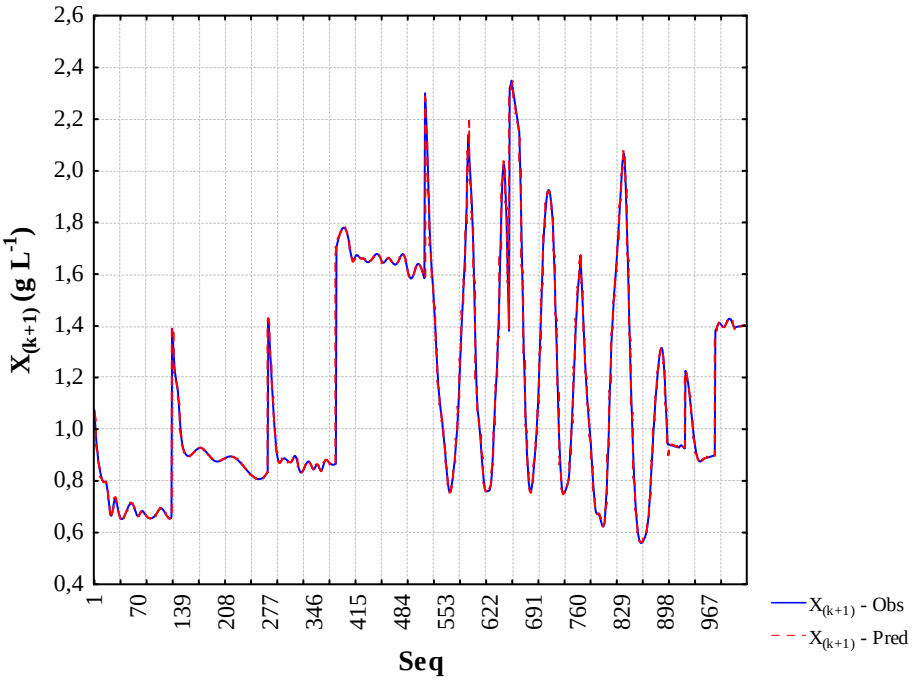


Figura 5.6 - Comparação dos valores da concentração de células (X_{k+1}) (g L^{-1}). Valores preditos pela RNA autônoma MLP.8 (Pred = predito) e valores observados (Obs = observado) versus sequência de dados históricos (Seq = sequência). Dados provenientes da etapa de operação contínua das FC01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 10 e 11, sem adição de etanol exógeno (Camêlo, 2009). – – Valores preditos; —— Valores observados

Na Figura 5.6 novamente boa sobreposição dos dados preditos em relação aos dados observados pode ser constatada, reforçando o indicativo da capacidade da RNA MLP.8 em predizer a variável de saída relacionada à concentração de células.

5.2.1.2 Seleção da RNA para integrar o modelo híbrido cibernético/neuronal

Nesta etapa foram preparadas as RNA com as saídas compostas pelas variáveis cibernéticas de saída para as rotas metabólicas da fermentação alcoólica, do crescimento celular e da fermentação lática. Especificamente destina-se a compor o MHCN juntamente com as equações de balanço material do modelo cibernético. A metodologia elaborada para o treinamento das estruturas está descrita nas Tabelas 3.7 e 3.8 do Capítulo 3.

5.2.1.2.1 Características e desempenho

A Tabela 5.5 apresenta as características inerentes às melhores redes neuronais obtidas no treinamento para cada estrutura de rede definida na Tabela 3.6 e 3.7 do Capítulo 3. Apesar do programa de treinamento ter sido configurado para buscar o melhor desempenho dentre as redes do tipo linear, MLP e RBF, observa-se que as redes do tipo MLP se sobressaíram, cabendo recordar que o programa fora configurado para reter as RNA mais eficientemente treinadas e não a diversidade de redes.

Na Tabela 5.5 a abreviatura BFGS 162, por exemplo, refere-se à aplicação do algoritmo de Broyden, Fletcher, Goldfarb e Shanno (1970) na otimização das redes neuronais, com 162 iterações.

Tabela 5.5 - Relação com as características próprias das melhores RNA autônoma obtidas dentro de cada estrutura de rede com variáveis de estado na saída investigada

Nr	MLP	Perfil	Performance		Erro		Algoritmo	Função	Função de Ativação Camada		Correlação			Condição
		RNA	Trein.	Teste	Trein.	Teste	Trein.	Erro	Escondida	Saída	Z1	Z2	Z3	Trein
1	9	MLP 7-8-1	0,991312	0,994659	0,000186	0,000121	BFGS 117	SOS	Tanh	Linear	-	-	0,991312	1 ats com G_f
2	6	MLP 6-10-1	0,985017	0,991001	0,000315	0,000182	BFGS 88	SOS	Tanh	Linear	-	0,985017	-	1 ats sem G_f
3	7	MLP 10-9-1	0,970383	0,981298	0,000307	0,000208	BFGS 69	SOS	Exponencial	Linear	0,970383	-	-	2 ats com G_f
4	51	MLP 7-12-3	0,978503	0,989168	0,000972	0,000464	BFGS 242	SOS	Logística	Linear	0,961755	0,983909	0,989844	1 ats com G_f
5	4	MLP 10-12-3	0,985846	0,973570	0,000637	0,001066	BFGS 164	SOS	Tanh	Linear	0,973691	0,991180	0,992668	2 ats com G_f
6	9	MLP 9-13-3	0,974990	0,958669	0,001338	0,001954	BFGS 259	SOS	Tanh	Linear	0,975313	0,991210	0,958446	2 ats sem G_f
7	1	MLP 6-11-3	0,964314	0,970772	0,001843	0,001543	BFGS 302	SOS	Exponencial	Logística	0,959944	0,981490	0,951508	1 ats sem G_f
8	8	MLP 9-11-3	0,975071	0,956851	0,001339	0,002004	BFGS 390	SOS	Logística	Linear	0,975866	0,990739	0,958610	2 ats sem G_f
9	9	MLP 4-10-3	0,581550	0,558266	0,016882	0,017872	BFGS 115	SOS	Logística	Logística	0,516356	0,556565	0,671727	Sem ats com G_f

Legenda: Nr – classificação da RNA por ordem crescente de erro de teste; MLP – *Perceptron* multicamada. Indica o número atribuído à RNA no programa de treinamento (Statistisca); - Trein. – treinamento; BFGS - Algoritimo Broyden, Fletcher, Goldfarb e Shanno (1970); SOS – Soma dos quadrados; Tanh – tangente hiperbólica; E – concentração de etanol (g L^{-1}); G – concentração de glicose (g L^{-1}); X – concentração de células (g L^{-1}); ats – atraso dinâmico inserido nas variáveis de estado.

Seguindo a mesma metodologia aplicada análise da Tabela 5.4, na Tabela 5.5 tem-se:

- o erro de teste da rede de Nr 1 < 2 < 3 < 4 < 5 < 7 < 6 < 8 < 9, sendo que as 4 primeiras têm ordem de grandeza de 10^{-4} (MLP 9, 6, 7 e 51);

- o coeficiente de correlação para a variável cibernética de saída Z_1 de Nr 8 > 6 > 5> 3 > 4 > 7 > 9. As RNA de Nr 1 e 2 não apresentam a variável cibernética referente à concentração de etanol na saída (Z_1);

- o coeficiente de correlação para a variável cibernética de saída Z_2 de Nr 6 > 5 > 8> 2 > 4 > 7 > 9. As RNA de Nr 1 e 3 não apresentam a variável cibernética referente à concentração de células na saída (Z_2);

- o coeficiente de correlação para a variável cibernética de saída Z_3 de Nr 5 > 1 > 4 > 8 > 6 > 7 > 9. As RNA de Nr 2 e 3 não apresentam a variável cibernética referente à concentração de etanol na saída (Z_3);

- não há acentuado aumento nos coeficientes de correlação das redes com uma variável cibernética de saída (RNA Nr 1, 2 e 3) quando comparadas com as correlatas variáveis da RNA Nr 4;

- as redes com uma variável cibernética de saída (RNA Nr 1, 2 e 3) não apresentam redução significativa no erro de teste em relação a RNA Nr 4, estando todas contidas na ordem de grandeza 10^{-4};

- analisando o número de parâmetros das RNA tem-se:

* RNA com 1 saída cibernética cada (Nr 1, 2 e 3): Z1 (MLP 10-9-1) = 109, Z2 (MLP 6-10-1) = 81 e Z3 (MLP 7-8-1) = 73. Total de parâmetros das RNA Z1+Z2+Z3 = 263;

* RNA Nr 4 (MLP 7-12-3): Z1Z2Z3 = 135;

* RNA Nr 5 (MLP 10-12-3): Z1Z2Z3 = 171;

* RNA Nr 6 (MLP 9-13-3): Z1Z2Z3 = 172;

* RNA Nr 7 (MLP 6-11-3): Z1Z2Z3 = 113;

* RNA Nr 8 (MLP 9-11-3): Z1Z2Z3 = 138;

* RNA Nr 9 (MLP 4-10-3): Z1Z2Z3 = 83.

Conforme descrito na literatura e apresentado no Capítulo 3 deste trabalho, a rede neuronal de melhor desempenho é a de menor valor para o erro de teste, posto que os dados usados para tal cálculo permitem a avaliação do desempenho da rede durante o treinamento (Baughman & Liu, 1995; Haykin, 1999; De Souza Jr., 2003), uma vez não tomando parte no ajuste dos parâmetros da rede (pesos e *biases*). O ajuste destes parâmetros - pesos e *biases*, nas interconexões das camadas de entrada-camada escondida e camada escondida-camada de saída é procedido tendo por base os dados de treinamento.

Assim, analisando as informações acima relacionadas, verifica-se claramente que as 4 primeiras RNA apresentam os menores erros de teste – ordem de grandeza 10^{-4}. A demais RNA (Nr 5 a 9) além de conterem erro de teste de ordem maior que 10^{-4} (10^{-3} e 10^{-2}), não demonstram significativo aumento nos coeficientes de correlação quando comparadas com as RNA Nr 1 a 4.

Comparando as RNA Nr 1 a 4, observa-se que as RNA Nr 1, 2 e 3 (com uma variável cibernética de saída cada) são um pouco melhores que a RNA Nr 4 (com 3 variáveis cibernéticas de saída) em termos de erro de teste e coeficientes de correlação. Contudo, implicam em aumento de 94,8% no número de parâmetros.

Desta forma, a rede MLP.51 (7-12-3) treinada com dados contendo 1 elemento de atraso dinâmico e a variável G_f - com 7 neurônios na camada de entrada, 12 neurônios na cada escondida (unidades de processamento matemático) e 3 neurônios na cada de saída – foi selecionada para integrar o modelo híbrido cibernético / neuronal (MHCN).

Tendo em vista a escolha da rede neuronal artificial MLP.51 dentre as demais estudadas neste trabalho, foram submetidas às análises estatísticas complementares. Este procedimento teve por finalidade complementar a verificação estatística de sua adequação para representação das variáveis de concentração de etanol, concentração de células e concentração de glicose do processo fermentativo em estudo.

5.2.1.2.2 Dados preditos pelas RNA *versus* observados

Uma forma de análise da regressão muito utilizada para verificar o desempenho das redes é o gráfico dos valores preditos pela RNA versus os valores observados (valores-alvo).

A Figura 5.7 apresenta valores preditos pela RNA MLP.51 (com saídas Z1Z2Z3) para a variável cibernética de saída referente à rota metabólica da fermentação alcoólica (Z_1) versus valores observados para essa mesma variável (interpolados).

Na Figura 5.7 pode se observar que os pontos estão bem dispostos ao longo de uma reta, apesar de algumas dispersões. Isto indica que os dados preditos estão relativamente bem correlacionados com os dados observados (interpolados), logo os dados experimentais são bem representados pela rede MLP.51 (Montgomery e Runger, 2003).

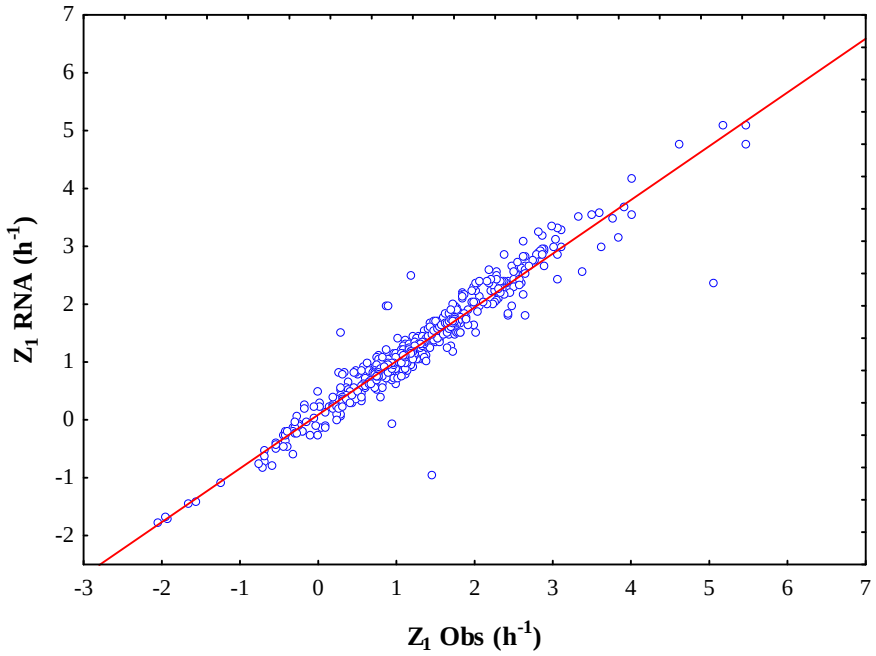


Figura 5.7 - Comparação dos valores da variável cibernética de saída referente à rota metabólica da fermentação alcoólica (Z_1) (h^{-1}). Valores preditos pela RNA MLP.51 (Z_1 RNA) versus valores calculados pelo modelo cibernético no Matlab (Obs ≡ observado). Curva de ajuste Y = 0,0874 + 0,9287*X. Dados provenientes da etapa de operação contínua das FC01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 10 e 11, sem adição de etanol exógeno (Camêlo, 2009).
o Dados de Z_1; —— Curva de ajuste

A Figura 5.8 apresenta valores preditos pela RNA MLP.51 (com saídas Z1Z2Z3) para a variável cibernética de saída referente à rota metabólica do crescimento celular (Z_2) versus valores observados para essa mesma variável (valores interpolados).

Na Figura 5.8 pode se observar que os pontos também estão bem dispostos ao longo de uma reta, apesar de algumas dispersões. Isto indica que os dados preditos estão relativamente bem correlacionados com os dados observados (interpolados), logo os dados experimentais são bem representados pela rede MLP.51 (Montgomery e Runger, 2003).

A Figura 5.9 apresenta valores preditos pela RNA MLP.51 (com saídas Z1Z2Z3) para a variável cibernética de saída referente à rota metabólica da fermentação lática (Z_3) versus valores observados para essa mesma variável (valores interpolados).

Na Figura 5.9 pode se observar que os pontos estão bem dispostos ao longo de uma reta, com dispersões bem menores quando comparada com as Figuras 5.6 e 5.7. Isto indica que os dados preditos estão bem correlacionados com os dados observados (interpolados), logo os dados experimentais são bem representados pela rede MLP.51 (Montgomery e Runger, 2003).

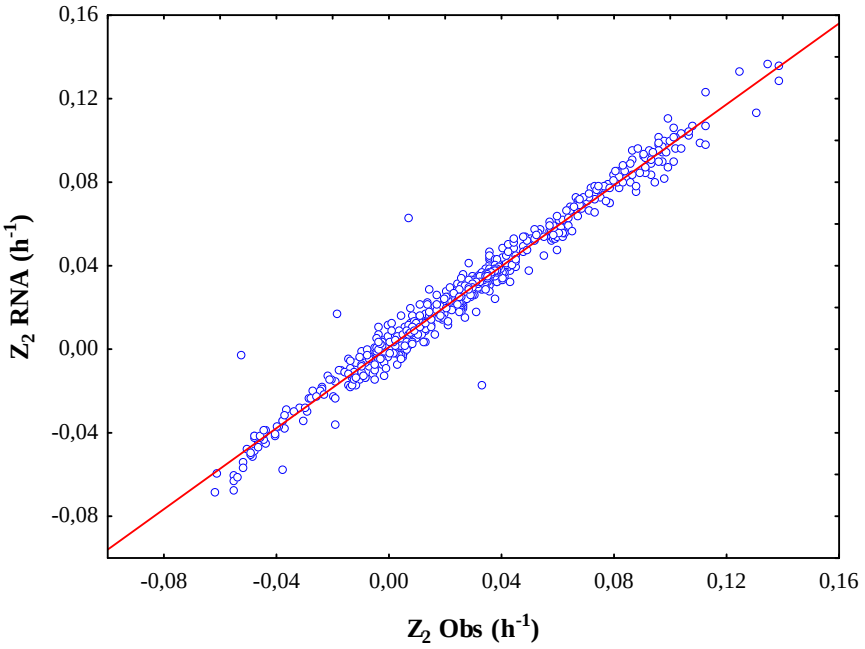


Figura 5.8 - Comparação dos valores da variável cibernética de saída referente à rota metabólica de formação de células (Z_2) (h^{-1}). Valores preditos pela RNA MLP.51 (Z_2 RNA) versus valores calculados pelo modelo cibernético no Matlab (Obs ≡ observado). Curva de ajuste Y = 0,001+0,9691*X. Dados provenientes da etapa de operação contínua das FC01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 10 e 11, sem adição de etanol exógeno (Camêlo, 2009). o Dados de Z_2; — Curva de ajuste

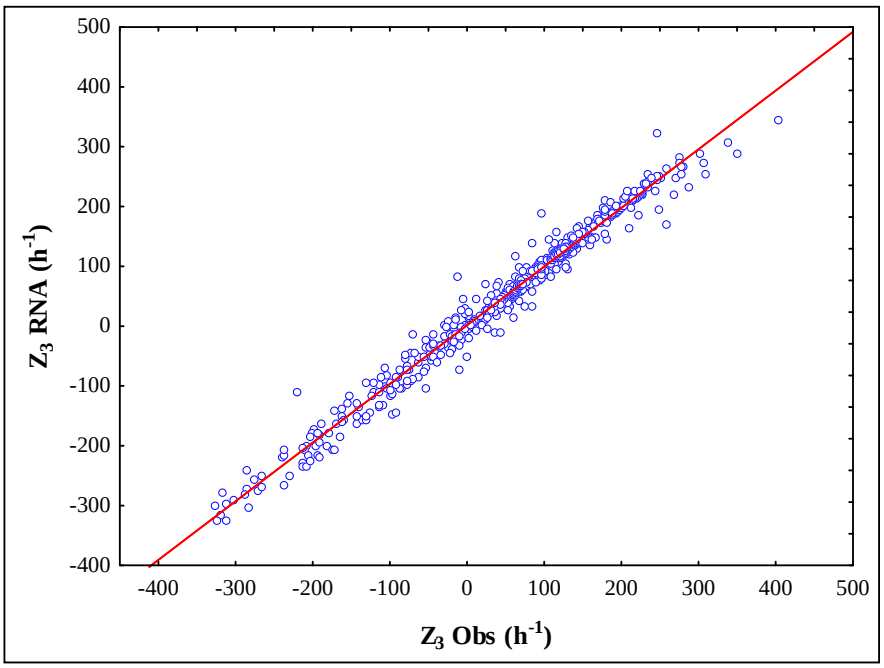


Figura 5.9 - Comparação dos valores da variável cibernética de saída referente à rota metabólica da fermentação lática (Z_3) (h^{-1}). Valores preditos pela RNA MLP.51 (Z_3 RNA) versus valores calculados pelo modelo cibernético no Matlab (Obs ≡ observado). Curva de ajuste Y = 1,5415+0,9809*X. Dados provenientes da etapa de operação contínua das FC01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 10 e 11, sem adição de etanol exógeno (Camêlo, 2009). o Dados de Z_3; — Curva de ajuste

5.2.1.2.3 Comparação dos dados experimentais com os dados preditos pela RNA

Para verificação adicional da capacidade de predição da rede neuronal MLP.51, comparam-se os dados preditos para a variável-alvo com os dados históricos utilizados em função do número de casos. Os dados históricos das variáveis de saída da RNA MLP.51 foram calculados no Matlab empregando as Equações (4.39), (4.40) e (4.41) do modelo híbrido cibernético / neuronal (MHCN), propostas no Capítulo 4. Com auxílio da Tabela 5.2, utilizando a coluna referente aos dados com um atraso dinâmico (dados utilizados no treinamento da MLP.51), é possível identificar cada fermentação contínua ao longo da sequência de dados históricos disposta no eixo das abscissas.

A Figura 5.10 apresenta a comparação dos valores preditos pela RNA MLP.51 e dos valores da variável cibernética de saída referente à rota metabólica da fermentação alcoólica (Z_1) (h^{-1}) calculada no Matlab empregando as Equações (4.39), (4.40) e (4.41) versus a sequência de dados históricos.

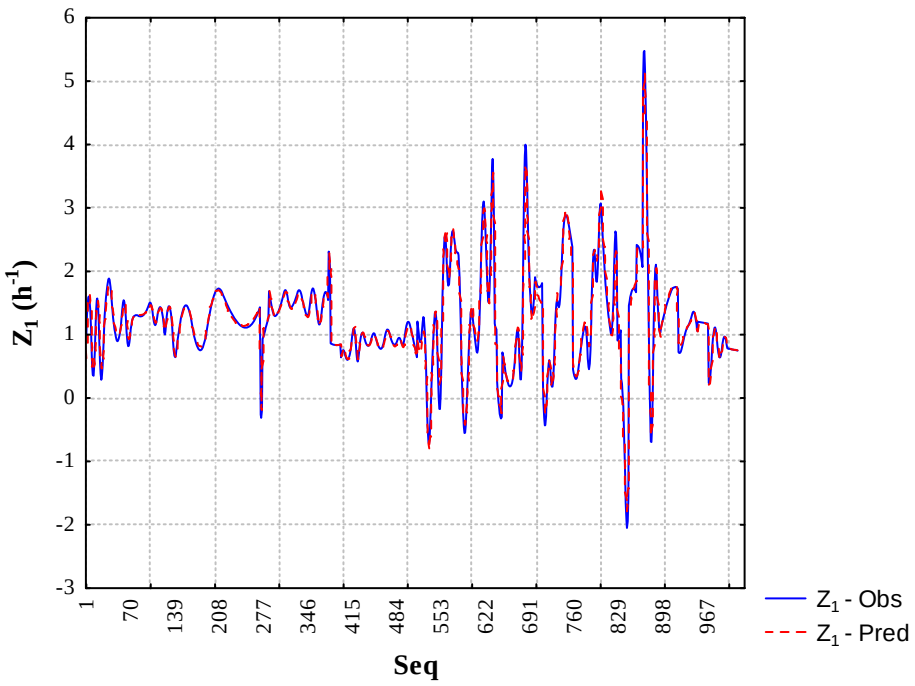


Figura 5.10 – Comparação dos valores da variável cibernética de saída referente à rota metabólica da fermentação alcoólica (Z_1) (h^{-1}). Valores preditos pela RNA MLP.51 (Pred ≡ predito) e valores calculados no Matlab (Obs ≡ observado) versus sequência de dados históricos (Seq = sequência). Dados provenientes da etapa de operação contínua das FC01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 10 e 11, sem adição de etanol exógeno (Camêlo, 2009). — — Valores preditos; —— Valores observados

Na Figura 5.10 verifica-se boa sobreposição dos dados preditos em relação aos dados observados, sendo mais um indicativo da capacidade da RNA MLP.51 em representar a variável cibernética de saída relacionada à rota metabólica de formação de etanol.

A Figura 5.11 apresenta a comparação dos valores preditos pela RNA MLP.51 e dos valores da variável cibernética de saída referente à rota metabólica do crescimento celular (Z_2) (h^{-1}) calculada no Matlab empregando as Equações (4.39), (4.40) e (4.41) versus a sequência de dados históricos.

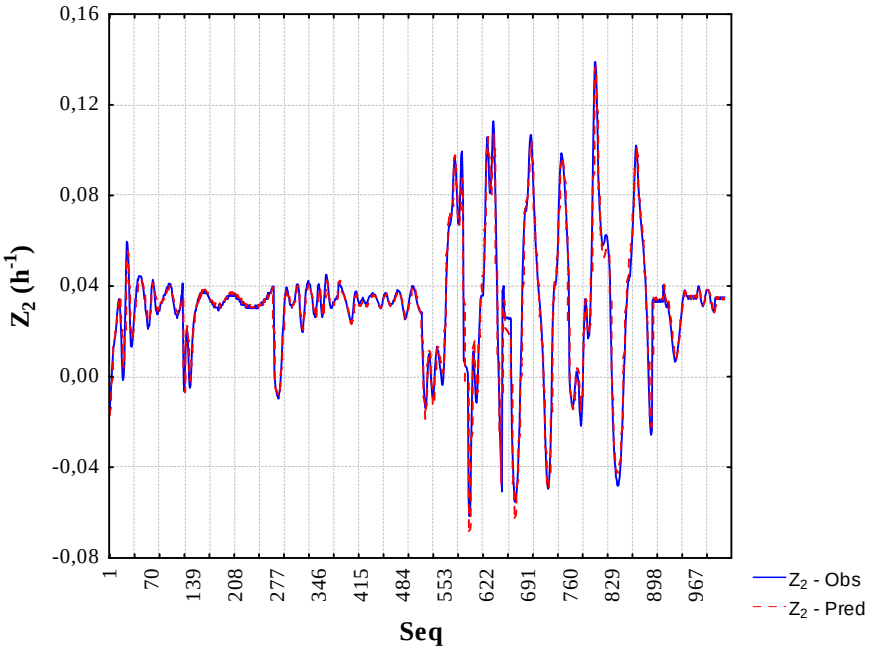


Figura 5.11 - Comparação dos valores da variável cibernética de saída referente à rota metabólica de formação de células (Z_2) (h^{-1}). Valores preditos pela RNA MLP.51 (Pred ≡ predito) e valores calculados no Matlab (Obs ≡ observado) versus sequência de dados históricos (Seq = sequência). Dados provenientes da etapa de operação contínua das FC01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 10 e 11, sem adição de etanol exógeno (Camêlo, 2009). — — Valores preditos; —— Valores observados

Na Figura 5.11 também há boa sobreposição dos dados preditos em relação aos dados observados, constituindo em mais uma evidência da habilidade da RNA MLP.51 na representação da variável cibernética de saída relacionada à rota metabólica de formação de células.

A Figura 5.12 apresenta a comparação dos valores preditos pela RNA MLP.51 e dos valores da variável cibernética de saída referente à rota metabólica da formação de lactato (Z_3) (h^{-1}) calculada no Matlab empregando as Equações (4.39), (4.40) e (4.41) versus a sequência de dados históricos.

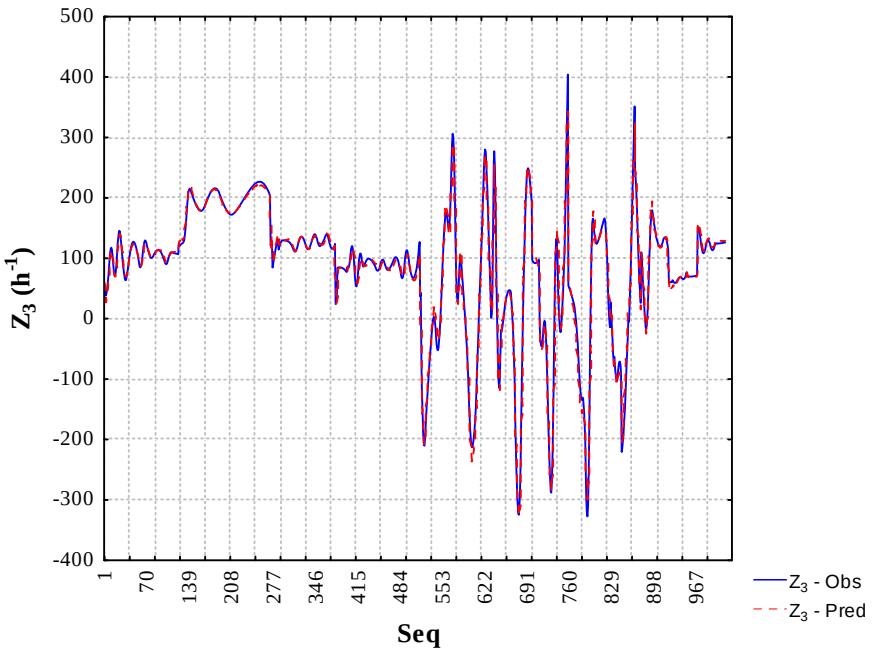


Figura 5.12 - Comparação dos valores da variável cibernética de saída referente à rota metabólica da fermentação lática (Z_3) (h^{-1}). Valores preditos pela RNA MLP.51 (Pred ≡ predito) e valores calculados no Matlab (Obs ≡ observado) versus sequência de dados históricos (Seq = sequência). Dados provenientes da etapa de operação contínua das FC01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 10 e 11, sem adição de etanol exógeno (Camêlo, 2009). — — Valores preditos; —— Valores observados

Aos mesmos moldes do já constatado nas Figuras 5.10 e 5.11, na Figura 5.12 observa-se sobreposição adequada dos dados preditos em relação aos dados observados, evidenciando condição da RNA MLP.51 em representar a variável cibernética de saída relacionada à rota metabólica da fermentação lática.

5.3 MODELO HÍBRIDO CIBERNÉTICO/NEURONAL (MHCN)

Nesta sessão são apresentadas as simulações do MHCN nas diversas condições de operação das nove fermentações contínuas, de forma a verificar sua capacidade de representação da dinâmica complexa das variáveis de estado do processo de produção de bioetanol em processo contínuo, catalisado por *Zymomonas mobilis*, estudado por Camêlo (2009). Há de enfatizar a dificuldade trazida para a capacidade de predição do modelo ocasionada pela complexidade da dinâmica em estudo, a qual pode exibir tendência ao estado estacionário ou comportamento oscilatório em função das condições operacionais.

Como já discutido no Capítulo 3, as variáveis de estado foram interpoladas a partir dos dados experimentais de Camêlo (2009) para as concentrações de etanol, de células e de glicose (E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp}), sendo a variável independente para interpolação o tempo (h). A variável tempo (h) foi dividida em intervalos iguais a 0,5 h, para todas as fermentações contínuas aplicadas neste trabalho. Desta forma, as variáveis experimentais interpoladas assim definidas constituíram os dados históricos de entrada para o treinamento das RNA.

Para auxiliar a interpretação dos gráficos, é oportuno relembrar o descrito na Tabela 3.3 do Capítulo 3. Assim, a etapa contínua do processo nas fermentações contínuas FC01, 02, 03, 04, 10 e 11 tende ao estado estacionário e nas FC05 e 06 tende ao comportamento oscilatório. Na FC07, especificamente, no período contínuo de [63,0 a 124,0] h com G_F = 200 g L^{-1} o comportamento oscilatório é observado e no período contínuo de [124,0 a 147,0] h com G_F = 300 g L^{-1} o sistema tende ao estado estacionário.

As respostas do modelo serão analisadas utilizando os gráficos apresentados para cada condição testada. A partir desta proposição, as figuras deste capítulo apresentaram sistematicamente, para cada FC, as simulações do MHCN para as concentrações das variáveis de estado (etanol, células e glicose) em função das sequência dos dados.

Para uma análise mais criteriosa do comportamento do modelo em relação aos dados experimentais em toda a etapa contínua sem adição de etanol, serão empregados os critérios estatísticos descritos na sessão 3.8 do Capítulo 3, as quais serão relatadas em tabelas para cada variável de estado referente a cada FC.

5.3.1 MHCN alimentado com variáveis experimentais (E_{Exp} X_{Exp} e G_{Exp}) - Teste 1

No presente teste será investigada a capacidade de predição do comportamento dinâmico complexo do processo de produção de etanol pelo MHCN quando da disponibilidade completa das medições a cada tempo de amostragem. Nesta condição de teste do MHCN, a rede neuronal MPL.51 será realimentada pelos valores experimentais interpolados a partir dos dados experimentais das concentrações de etanol, de células e de glicose (E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp}).

5.3.1.1 Análise estatística das simulações (FC01 – FC11)

Nas Tabelas 5.6 a 5.8 estão relacionados os critérios estatísticos referentes à regressão linear da curva resposta dos gráficos dos valores simulados pelo modelo (preditos) versus os

valores experimentais interpolados (observados) relativos às concentrações de etanol, células e glicose, respectivamente.

As respostas do MHCN para este teste, serão analisadas empregando os critérios estatísticos constantes nas tabelas a seguir, associadas aos gráficos de comparação das respostas simuladas pelo modelo com os dados experimentais, os quais estão dispostos nos itens subsequentes. Desta forma, os dados das tabelas serão discutidos juntamente com a análise dos gráficos para cada fermentação contínua.

Tabela 5.6 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de etanol – Teste 1

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC01	0,9516	0,5737	0,7900	7,9000
FC02	0,9291	1,9638	0,9500	3,4000
FC03	0,7427	2,1980	1,1000	-7,1000
FC04	0,2558	5,2189	0,5100	28,0000
FC05	0,9866	4,8987	0,9600	1,4000
FC06	0,8690	34,7542	0,8900	2,5000
FC07	0,9247	17,4531	1,0000	1,0000
FC10	0,6287	0,7422	0,5100	22,0000
FC11	0,8778	0,4843	1,1000	-4,3000

Tabela 5.7 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de células – Teste 1

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC01	0,9880	0,00018	0,9100	0,0740
FC02	0,9797	0,0013	0,8900	0,1300
FC03	0,9882	0,00084	1,1000	-0,094
FC04	0,9145	0,0038	1,5000	-0,9600
FC05	0,9972	0,0010	0,9900	-0,0041
FC06	0,9825	0,0208	0,9900	-0,1100
FC07	0,9543	0,0122	0,9400	0,1300
FC10	0,9958	0,00046	0,9800	0,0360
FC11	0,9395	0,0000071	0,9800	0,0320

Tabela 5.8 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de glicose – Teste 1

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC01	0,0098	1,5310	0,5000	0,6100
FC02	0,0004	2,1581	-0,0200	0,058
FC03	0,0259	8,5621	-0,6800	4,4000
FC04	0,0755	54,4956	0,6800	8,4000
FC05	0,9970	9,7347	0,9700	3,6000
FC06	0,9859	42,2356	0,9400	9,0000
FC07	0,9510	104,1578	0,9400	1,4000
FC10	0,2462	0,2719	1,3000	-0,3800
FC11	0,3211	1,8860	2,6000	-3,7000

Analisando as Tabelas 5.6, 5.7 e 5.8, pode-se verificar que os parâmetros estatísticos inerentes à concentração celular são melhores em relação às demais concentrações. Os referentes à concentração de etanol se sobressai quando comparada a da concentração de glicose. Tal condição constitui-se em indício da provável melhor representação da concentração celular, seguida da concentração de etanol em relação à concentração de glicose pelo MHCN.

Visualizando especificamente a Tabela 5.8, verifica-se que os critérios estatísticos só foram satisfatórios para as FC05, 06 e 07, as quais são as fermentações contínuas cuja fase contínua tende ao comportamento oscilatório.

Ainda na Tabela 5.8, são pronunciados os baixíssimos valores de R^2 para as fermentações FC01, 02, 03 e 04 e baixos valores do mesmo critério estatístico para as FC10 e 11. Além disso, os outros 3 critérios estastísticos empregados na análise também estão ruins para a maioria das 6 fermentações citadas (FC01, 02, 03, 04, 10 e 11). Nas condições apresentadas por estes critérios estatísticos, a capacidade preditiva do MHCN só se mostra satisfatória para as FC05, 06 e 07.

Os gráficos referentes às FC03, 10 e 11 foram dispostos no Apêndice D, pois as curvas simuladas apresentavam perfis semelhantes aos da FC01. O mesmo procedimento foi adotado para a FC07 uma vez que exibiu comportamento simulado semelhante ao da FC06.

5.3.1.2 Fermentação contínua 01 (FC01)

Na Figura 5.13 são apresentadas as simulações para a FC01.

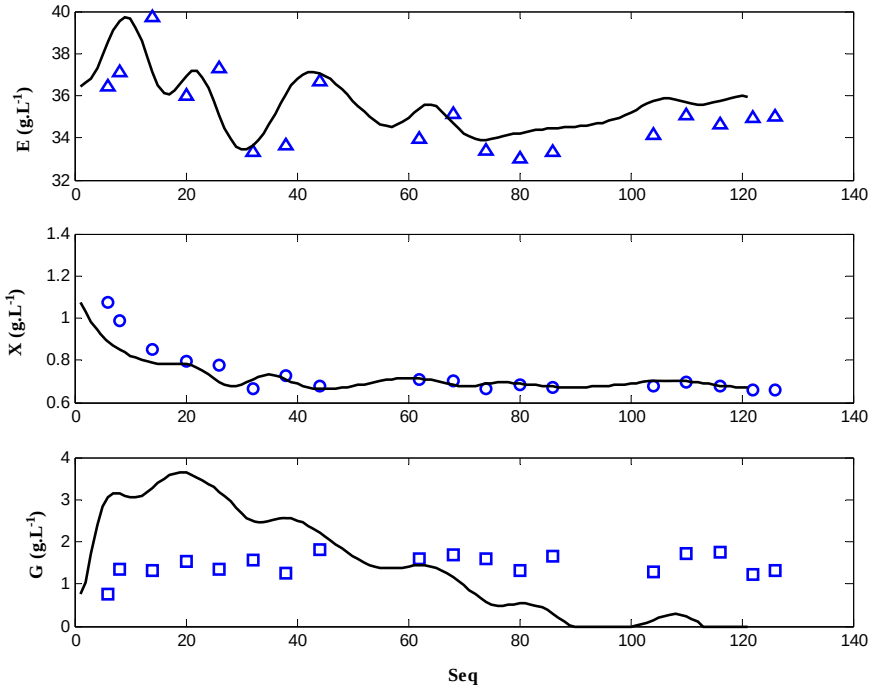


Figura 5.13_ – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC01 – Teste 1. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

A regressão linear para concentração de etanol apresentada na Tabela 5.6 mostra coeficiente de determinação muito bom, erro quadrático médio relativamente baixo, coeficiente angular próximo à unidade e coeficiente linear alto. Assim, na Figura 5.13 verifica-se que a respectiva curva simulada pelo MHCN não sobrepõe os dados experimentais, contudo representa a tendência do comportamento dos dados medidos na FC01.

Para a concentração de células, a regressão linear mostrada na Tabela 5.7 revela coeficiente de determinação excelente, erro quadrático médio baixíssimo, coeficiente angular muito próximo à unidade e coeficiente linear tendendo a zero. Desta forma, observa-se na Figura 5.13 que a correspondente curva simulada pelo MHCN sobrepõe os dados experimentais, com um leve afastamento na fase inicial. Verifica-se também adequada representação da tendência a estado estacionário da fermentação.

A Tabela 5.8 exibe a regressão linear para concentração de glicose, quando tem coeficiente de determinação muito baixo, erro quadrático médio não muito alto, coeficiente angular não tendendo à unidade e coeficiente linear não tendendo a zero. Portanto, na Figura 5.13 tem-se que a correlata curva simulada pelo MHCN não é capaz de predizer comportamento dos dados experimentais, apesar de aproximar-se no intervalo da sequência

dados [40; 60], aproximadamente. O comportamento de tendência ao estado estacionário da curva experimental não é reproduzido pelo MHCN.

5.3.1.3 Fermentação contínua 02 (FC02)

Na Figura 5.14 são apresentadas as simulações para a FC02.

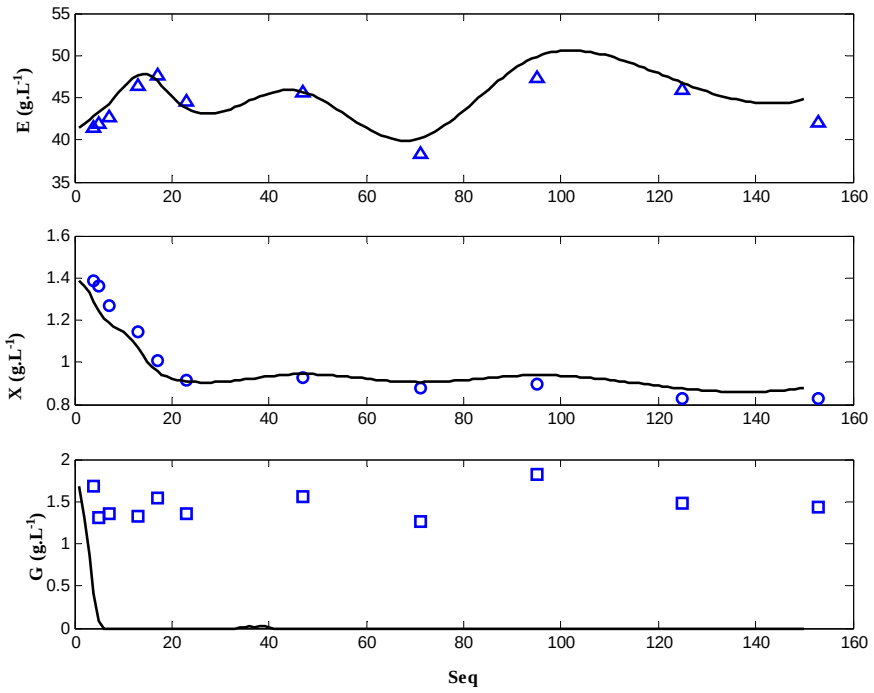


Figura 5.14 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC02 – Teste 1. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

Para esta fermentação, a regressão linear para concentração de etanol apresentada na Tabela 5.6, mostra coeficiente de determinação muito bom, erro quadrático médio não muito elevado, coeficiente angular tendendo à unidade e coeficiente linear alto. Assim, na Figura 5.14 pode-se considerar que a respectiva curva simulada pelo MHCN sobrepõe os dados experimentais e representa a tendência ao estado estacionário da FC02.

Considerando a concentração de células, a regressão linear mostrada na Tabela 5.7 revelou coeficiente de determinação muito bom, erro quadrático médio baixíssimo, coeficiente angular próximo à unidade e coeficiente linear tendendo a zero. Desta forma, verifica-se na Figura 5.14 ser razoável assumir que a correspondente curva simulada pelo

MHCN sobrepõe os dados experimentais, com um leve afastamento na fase inicial e prediz a tendência do comportamento de estado estacionário da fermentação.

Na Tabela 5.8 é apresentada a regressão linear para concentração de glicose tendo coeficiente de determinação muito baixo, erro quadrático médio não muito alto, coeficiente angular não tendendo à unidade e coeficiente linear tendendo a zero. Portanto, na Figura 5.14 tem-se que a correlata curva simulada pelo MHCN não é capaz de predizer os valores dos dados medidos e nem o comportamento de estado estacionário destes dados.

5.3.1.4 Fermentação contínua 04 (FC04)

Na Figura 5.15 são apresentadas as simulações para a FC04.

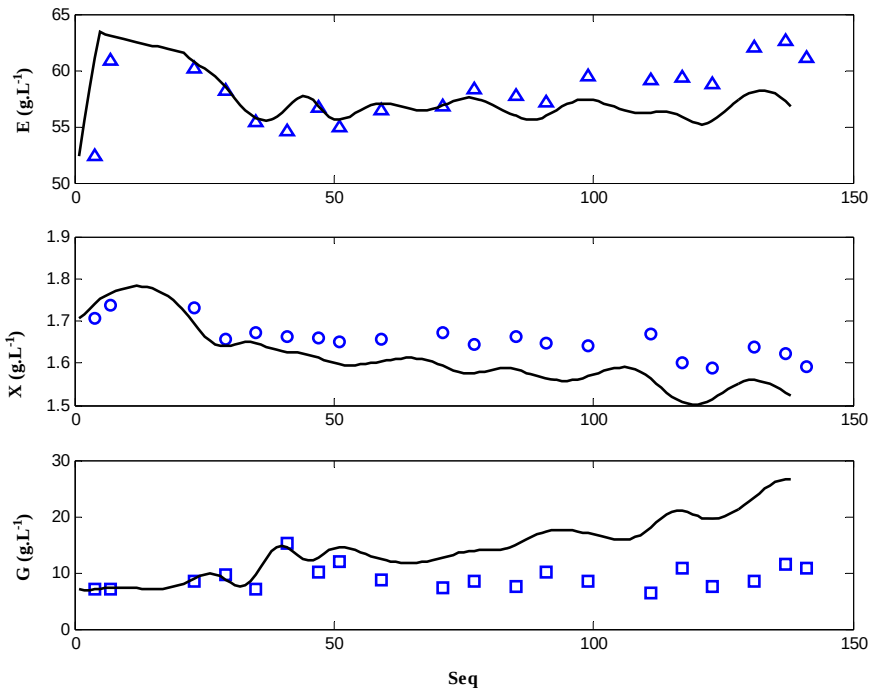


Figura 5.15 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC04 – Teste 1. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

A regressão linear para concentração de etanol constante da Tabela 5.6 mostra coeficiente de determinação muito baixo, erro quadrático médio não muito alto, coeficiente angular não tendendo à unidade e o coeficiente linear muito alto. Portanto, na Figura 5.15 verifica-se que a respectiva curva simulada pelo MHCN não sobrepõe os dados experimentais, contudo não esboça afastamento acentuado em relação aos mesmos. Pode-se considerar, todavia, que segue a tendência do comportamento de estado estacionário.

Para a concentração de células, a regressão linear mostrada na Tabela 5.7 revela coeficiente de determinação muito bom, erro quadrático médio baixíssimo, coeficiente angular muito distante da unidade e coeficiente linear não tendendo a zero. Desta forma, observa-se na Figura 5.15 que a correspondente curva simulada pelo MHCN não sobrepõe os dados experimentais, no entanto não se afasta totalmente destes dados. O comportamento com viés para o estado estacionário da fermentação é bem representado.

A regressão linear mostrada na Tabela 5.8 refere-se à concentração de glicose tendo coeficiente de determinação muito baixo, erro quadrático médio alto, coeficiente angular não próximo à unidade e coeficiente linear alto. Portanto, na Figura 5.15 tem-se que a correlata curva simulada pelo MHCN não é capaz de predizer comportamento dos dados experimentais, divergindo mais acentuadamente em relação a estes a partir do ponto nº 50 da sequência dados, aproximadamente. Não se pode afirmar que o MHCN prediz o comportamento de estado estacionário da FC04.

5.3.1.5 Fermentação contínua 05 (FC05)

A Figura 5.16 encerra os resultados das simulações para a FC05.

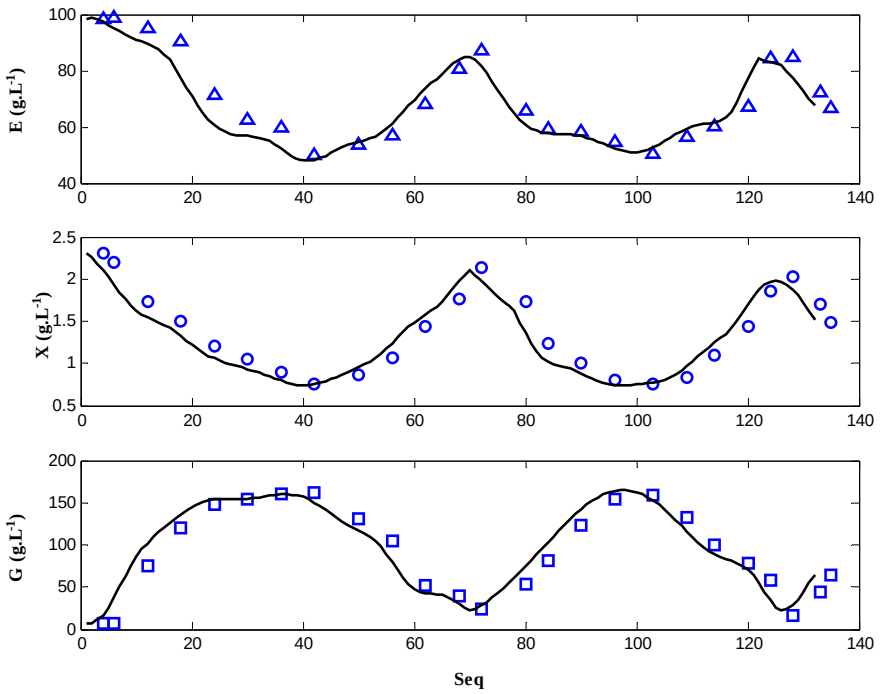


Figura 5.16 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC05 – Teste 1. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

Visualizando a regressão linear para concentração de etanol exibida na Tabela 5.6 tem-se coeficiente de determinação excelente, erro quadrático médio não muito alto, coeficiente angular muito próximo à unidade e coeficiente linear muito alto. Deste modo, na Figura 5.16 pode ser considerado que a respectiva curva simulada pelo MHCN reproduz com boa aproximação os valores dos dados experimentais. Além disso, o MHCN mostra capacidade em representar o comportamento oscilatório da curva de dados medidos.

Para a concentração de células, a regressão linear mostrada na Tabela 5.7 mostra coeficiente de determinação excelente, erro quadrático médio baixíssimo, coeficiente angular muito próximo à unidade e coeficiente linear tendendo a zero. Por conseguinte, na Figura 5.16 tem-se a correspondente curva simulada pelo MHCN sobrepondo os dados experimentais. O comportamento oscilatório da fermentação é adequadamente representado.

Diferentemente do verificado nas fermentações anteriores, as quais tendiam ao estado estacionário, a regressão linear mostrada na Tabela 5.8 refere-se à concentração de glicose exibindo coeficiente de determinação excelente, erro quadrático médio não muito alto, coeficiente angular muito próximo à unidade e coeficiente linear alto. Consequentemente, a correlata curva simulada pelo MHCN na Figura 5.16 é capaz de predizer os valores dos dados experimentais. Deste modo, pode se afirmar que o MHCN prediz a tendência ao comportamento oscilatório da FC05.

5.3.1.6 Fermentação contínua 06 (FC06)

Na Figura 5.17 são apresentadas as simulações para a FC06.

Da regressão linear para concentração de etanol, exibida na Tabela 5.6, tem-se coeficiente de determinação bom, erro quadrático médio alto, coeficiente angular próximo à unidade e coeficiente linear alto. Deste modo, na Figura 5.17 não se pode assumir com segurança razoável que a respectiva curva simulada pelo MHCN reproduza com boa aproximação os valores dos dados experimentais, visto as condições dos parâmetros estatísticos, ademais da boa aproximação gráfica. Todavia, o MHCN mostra-se hábil em representar o comportamento oscilatório da curva de dados experimentais.

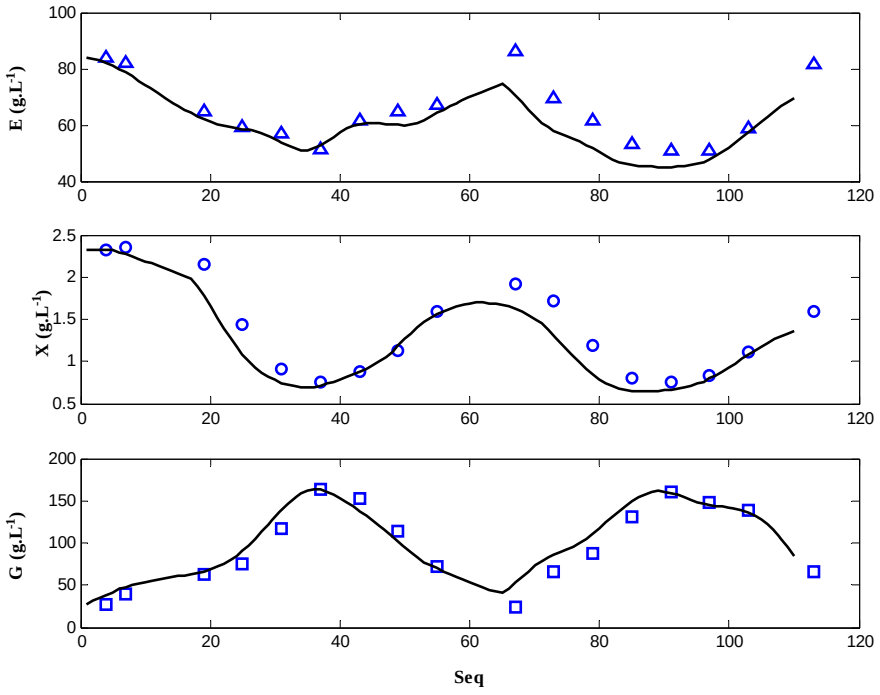


Figura 5.17 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC06 – Teste 1. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

Para a concentração de células, a regressão linear mostrada na Tabela 5.7 mostra coeficiente de determinação muito bom, erro quadrático médio baixíssimo, coeficiente angular muito próximo à unidade e coeficiente linear tendendo a zero. Muito embora a curva simulada pelo MHCN da Figura 5.17 para a concentração celular apresente alguns pequenos desvios em relação aos dados experimentais, conquanto ao associar a análise gráfica aos resultados de boa qualidade dos critérios estatísticos, torna-se razoável considerar a capacidade do modelo em predizer com aproximação suficiente os valores dos dados experimentais. Nesta mesma condição, o comportamento oscilatório da fermentação é representado convenientemente.

Na regressão linear mostrada na Tabela 5.8, relativa à concentração de glicose, mostra coeficiente de determinação excelente, erro quadrático médio alto, coeficiente angular muito próximo à unidade e coeficiente linear alto. Assim, a correspondente curva simulada pelo MHCN na Figura 5.17 não demonstra capacidade na predição dos valores experimentais pois, apesar da boa proximidade da curva no gráfico, principalmente o erro quadrático médio contraindica tal consideração. Entretanto, pode se afirmar que o MHCN prediz o comportamento oscilatório da FC06 com muito boa aproximação.

5.3.1.7 Considerações gerais

Ratificando o já observado nos critérios estatísticos tabulados nas Tabelas 5.6, 5.7 e 5.8, a análise das figuras corrobora a constatação da melhor capacidade preditiva do MHCN para a concentração celular e posteriormente para a concentração de etanol. Para a concentração de glicose a predição do MHCN mostrou-se mais eficaz para as fermentações contínuas FC05, 06 e 07 (FC07 - Apêndice D), as quais tendem ao comportamento oscilatório na fase contínua.

A menor capacidade de predição para a concentração de glicose pode ser entendida quando se analisa a equação de taxa do consumo de glicose (Eq. 4.30). No segundo membro da Equação 4.30 estão inseridos as variáveis cibernéticas para as três rotas abarcadas pela proposta cibernética, quais sejam, fermentação alcoólica, crescimento celular e fermentação lática. Assim, os erros para cada variável de estado são somados, implicando no maior desvio e consequente diminuição da capacidade preditiva do MHCN para a variável de estado em questão.

Como pode ser observado nas Figuras 5.10, 5.11 e 5.12, a RNA MLP.51 treinada para compor o MHCN apresenta boa sobreposição dos dados históricos (observados) pelos dados preditos relativos as variáveis cibernéticas de saída (Z_1, Z_2 e Z_3), constituindo-se um indicativo da sua capacidade de predição. Desta forma, sendo os resultados da predição pela rede neuronal (MLP.51) tão boa, há de se questionar o por quê da falha de predição do MHCN para as FC01, 02, 03, 04, 10 e 11 (FC03, 10 e 11 – Apêndice D), onde há tendência ao estado estacionário e da predição bem melhor para as FC05, 06 e 07 (FC07 – Apêndice D), quando o comportamento oscilatório é evidenciado. Para entender o pressuposto paradóxico faz-se necessário analisar o comportamento dos dados experimentais e sua implicação direta na resposta desta RNA. Assim, analisando a Tabela 5.2 percebe-se que, na condição de treinamento da RNA MLP.51 com um atraso dinâmico, o intervalo da sequência de dados [520; 928] corresponde aos dados de treinamente das FC05, 06 e 07 (FC07 – Apêndice D) na etapa contínua onde oscilações com grande amplitude nas variáveis de estado são observadas (ver Figuras 3.2 - Capítulo 3 e Figuras C.4 e C.5 no Apêndice C). Neste mesmo intervalo da sequência de dados também são observadas oscilações com acentuada amplitude para as variáveis cibernéticas de saída, quando comparadas com as respostas para as mesmas variáveis dos demais intervalos de dados (ver Figuras 5.10, 5.11 e 5.12). Desta forma, dada a pronunciada diferença de escala das respostas, verifica-se que a RNA MLP.51 do MHCN adquiriu capacidade de predição para as FC05, 06 e 07 (FC07 – Apêndice D), no entanto não o fez para as outras fermentações contínuas. Como discutido no parágrafo anterior, a falta de

predição do MHCN torna-se mais evidente para a concentração de glicose por conter o somatório dos erros associados as três variáveis cibernéticas de saída na Equação 4.30. Assim sendo, ao ajustarem seus parâmetros (pesos e biases) para representar as oscilações, as RNA falharam na representação das FC01, 02, 03, 04, 10 e 11 (FC03, 10 e 11 – Apêndice D), onde as oscilações não são observadas.

A Tabela 5.9 apresenta sinteticamente a capacidade de predição do MHCN analisada em função dos critérios estatísticos e perfis da curvas simuladas, conforme discutido acima.

Tabela 5.9 – Resumo da capacidade de predição do MHCN para as fermentações contínuas do processo de produção de etanol por *Zymomonas mobilis* – Teste 1

FC	E		X		G		Obs
01	N	EE	DE	EE	N	N	-
02	DE	EE	DE	EE	N	N	-
03	N	EE	DE	EE	N	N	Semelhante à FC01 - Apêndice D
04	N	EE	N	EE	N	N	-
05	DE	CO	DE	CO	DE	CO	-
06	N	CO	DE	CO	N	CO	-
07	N	CO	DE	DO	N	CO	Semelhante à FC06 - Apêndice D
10	N	EE	DE	EE	N	N	Semelhante à FC01 - Apêndice D
11	N	EE	DE	EE	N	N	Semelhante à FC01 - Apêndice D

Legenda: - N : não apresenta capacidade preditiva;
- DE: capacidade preditiva para descrever o perfil dos dados experimentais;
- EE: capacidade preditiva para representar a tendência ao estado estacionário;
- CO: capacidade preditiva para representar a tendência ao comportamento oscilatório.

5.3.2 MHCN alimentado com variáveis experimentais (E_{Exp} X_{Exp} e G_{Exp}) - Teste 1 com correção do erro de predição

Na Tabela 5.8 e nas Figuras 5.13 a 5.18 e D.1 a D.4 verificou-se que o MHCN simulado nas condições do Teste 1 só demonstrou capacidade de predição satisfatória para a concentração de glicose nas fermentações contínuas FC05, 06 e 07 (FC07 – Apêndice D), sendo ineficiente nas demais fermentações.

Frente a tal situação foi planejada a repetição das mesmas condições de alimentação do Teste 1, contudo inserindo a correção do erro de predição nas equações de taxa das variáveis de concentração de etanol, de células e de glicose. Mesmo tendo a predição do MHCN sido satisfatória para as concentrações de etanol e de células, a correção também foi inserida de

forma a verificar possível melhora. Assim, o erro de predição para cada variável de estado foi calculado segundo as equações:

$$\boldsymbol{erroE(k) = E(k) - \hat{E}(k/k-1)} \tag{5.1}$$

$$\boldsymbol{erroX(k) = X(k) - \hat{X}(k/k-1)} \tag{5.2}$$

$$\boldsymbol{erroG(k) = G(k) - \hat{G}(k/k-1)} \tag{5.3}$$

onde: $\boldsymbol{erroE(k)}$ ≡ erro de predição para a concentração de etanol; $\boldsymbol{E(k)}$ ≡ variável medida para concentração de etanol; $\boldsymbol{\hat{E}(k/k-1)}$ ≡ variável predita no tempo de amostragem "k-1" para concentração de etanol em "k"; $\boldsymbol{erroX(k)}$ ≡ erro de predição para a concentração de células; $\boldsymbol{X(k)}$ ≡ variável medida para concentração de células; $\boldsymbol{\hat{X}(k/k-1)}$ ≡ variável predita no tempo de amostragem "k-1"para concentração de células em "k"; $\boldsymbol{erroG(k)}$ ≡ erro de predição para a concentração de glicose; $\boldsymbol{G(k)}$ ≡ variável medida para concentração de glicose; $\boldsymbol{\hat{G}(k/k-1)}$ ≡ variável predita no tempo de amostagem "k-1"para concentração de glicose em "k".

5.3.2.1 Análise estatística das simulações (FC01 – FC11)

Nas Tabelas 5.10 a 5.12 estão relacionados os parâmetros estatísticos referentes à regressão linear da curva resposta dos gráficos dos valores simulados pelo modelo (preditos) versus os valores experimentais interpolados (observados) relativos às concentrações de etanol, células e glicose, respectivamente.

As respostas do MHCN para este teste, serão analisadas pelos critérios estatísticos constantes nas tabelas a seguir, associadas aos gráficos de comparação das respostas simuladas pelo modelo com os dados experimentais, os quais estão dispostos nos itens subsequentes. Desta forma, os dados das tabelas serão discutidos juntamente com a análise dos gráficos para cada fermentação contínua.

Tabela 5.10 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de etanol – Teste 1 com correção do erro de predição

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC01	0,9964	0,0117	1,0000	-0,6800
FC02	0,9998	0,0024	0,9900	0,2800
FC03	0,9801	0,0280	1,0000	-0,5200
FC04	0,9904	0,0459	1,0000	-0,2900
FC05	0,9992	0,1804	1,0000	0,2400
FC06	0,9988	0,1388	1,0000	-0,1300
FC07	0,9984	0,2004	1,0000	0,2100
FC10	0,9833	0,0037	1,0000	-1,6000
FC11	0,9930	0,0096	1,1000	-3,3000

Os critérios estatísticos calculados para a concentração de etanol estão muito bons. Ressalva deve ser feita para os coeficientes lineares das FC10 e 11 que apresentam valores altos, portanto não tendem a zero.

Tabela 5.11 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de células – Teste 1 com correção do erro de predição

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC01	0,9990	0,000006	1,0000	-0,00014
FC02	0,9994	0,000007	1,0000	-0,0028
FC03	0,9998	0,000003	1,0000	-0,0035
FC04	0,9986	0,000003	1,0000	-0,0130
FC05	0,9990	0,000181	1,0000	0,000073
FC06	0,9998	0,000073	1,0000	-0,0016
FC07	0,9998	0,000040	1,0000	-0,00044
FC10	0,9998	0,000004	1,0000	-0,0100
FC11	0,9851	0,000002	1,1000	-0,0850

Avaliando os critérios estatísticos para a concentração de células, verifica-se que estão muito bons. Destaque os valores baixíssimos para o MSE e tendendo a zero para o coeficiente linear.

Tabela 5.12 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de glicose – Teste 1 com correção do erro de predição

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC01	0,8962	0,0062	1,0000	-0,0160
FC02	0,8250	0,0104	1,1000	-0,1700
FC03	0,9851	0,0075	0,8900	0,1400
FC04	0,9839	0,1062	1,1000	-0,4600
FC05	0,9998	0,6350	1,0000	-0,6700
FC06	0,9996	0,9211	1,0000	-0,4200
FC07	0,9998	0,1699	1,0000	0,1600
FC10	0,9626	0,0057	1,1000	-0,1500
FC11	0,9604	0,0182	1,2000	-0,4300

Analisando os critérios estatísticos para a concentração de glicose, observam-se valores muito bons. O único pequeno desvio seria o valor do coeficiente angular na FC11.

Observando conjuntamente as três tabelas, verifica-se que os critérios estatísticos obtidos para a concentração celular são um pouco melhores em relação às demais concentrações, em especial para o erro quadrático médio e coeficiente linear. Essa constatação pode indicar capacidade preditiva ligeiramente melhor para a concentração celular em relação às demais.

Os gráficos referentes às FC02, 03, 04 e 10 foram dispostos no Apêndice D, pois as curvas simuladas apresentavam perfis semelhantes aos da FC01. O mesmo procedimento foi adotado para a FC06 e 07 uma vez que exibiu comportamento simulado semelhante ao da FC05.

5.3.2.2 Fermentação contínua 01 (FC01)

Na Figura 5.18 são apresentadas as simulações para a FC01.

Considerando os critérios estatíticos das Tabelas 5.10 a 5.12 e a Figura 5.18, verifica-se a boa capacidade de predição do MHCN para os valores experimentais e na descrição da

tendência ao estado estacionário da FC01, muito embora pequenos desvios sejam observados na fase inicial.

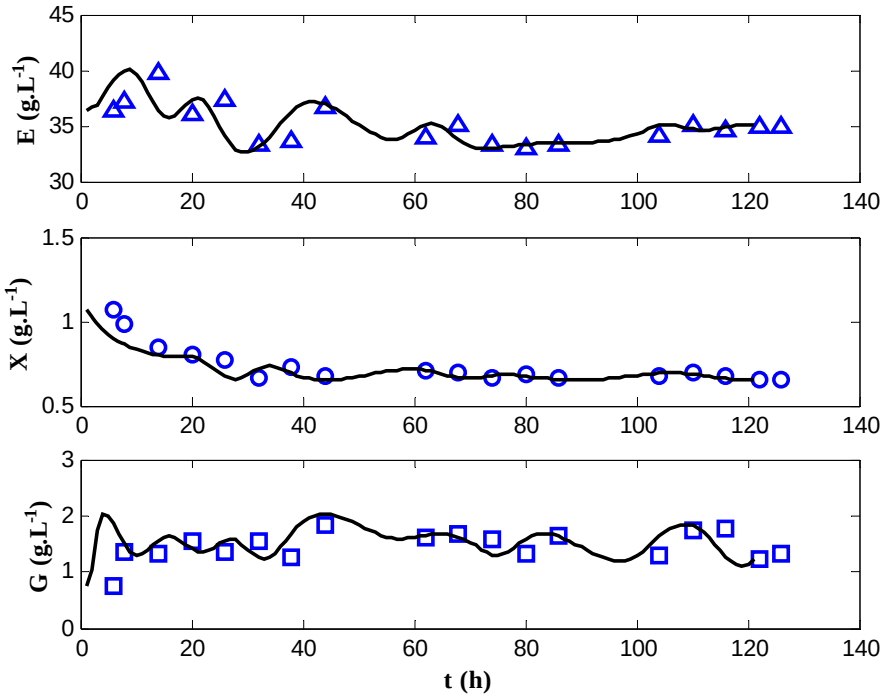


Figura 5.18 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC01 – Teste 1 com correção do erro de predição. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

5.3.2.3 Fermentação contínua 05 (FC05)

A Figura 5.19 encerra os resultados das simulações para a FC05.

A partir dos critérios estatíticos das Tabelas 5.10 a 5.12 e dos perfis da Figura 5.19, verifica-se a muito boa capacidade de predição do MHCN para os valores experimentais e na descrição da tendência ao comportamento oscilatório da FC05. Para a concentração de etanol é evidenciado pequeno desvio na fase inicial.

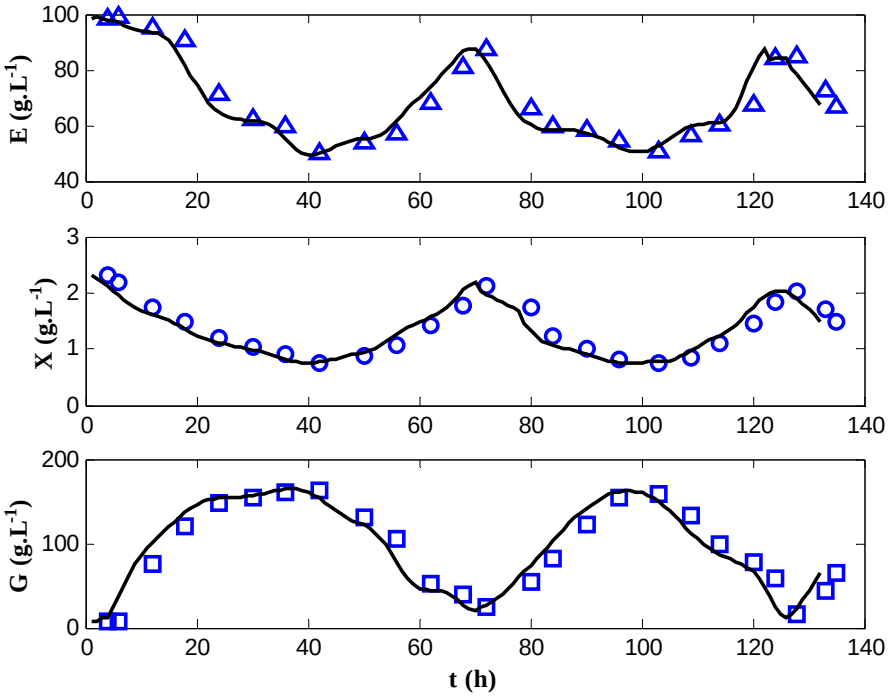


Figura 5.19 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC05 – Teste 1 com correção do erro de predição. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

5.3.2.4 Fermentação contínua 11 (FC11)

As respostas do MHCN para a FC11 estão na Figura 5.21.

Observando os critérios estatíticos das Tabelas 5.10 a 5.12 e a Figura 5.20, verifica-se:

- para concentração de etanol um desvio em relação aos dois primeiros pontos experimentais. Para os demais pontos medidos o modelo apresenta boa predição dos valores experimentais. Apesar do desvio inicial, o MHCN demonstra capacidade adequada em descrever a tendência ao estado estacionário da FC11;

- para a concentração de células o afastamento dos dois pontos iniciais bem mais tênue do verificado nas concentrações de células e de glicose. Assim, o MHCN apresenta adequada

predição para a descrição dos valores experimentais e da tendência ao estado estacionário da FC11;

- para a concentração de glicose o desvio dos dois primeiros pontos experimentais é similar ao observado para a concentração de etanol. Para os demais pontos medidos a curva simulada está muito próxima, mas o MHCN demonstra qualidade preditiva menor quando comparada com a curva simulada da concentração de células. Todavia, o modelo híbrido reproduz adequadamente a tendência ao estado estacionário da FC11.

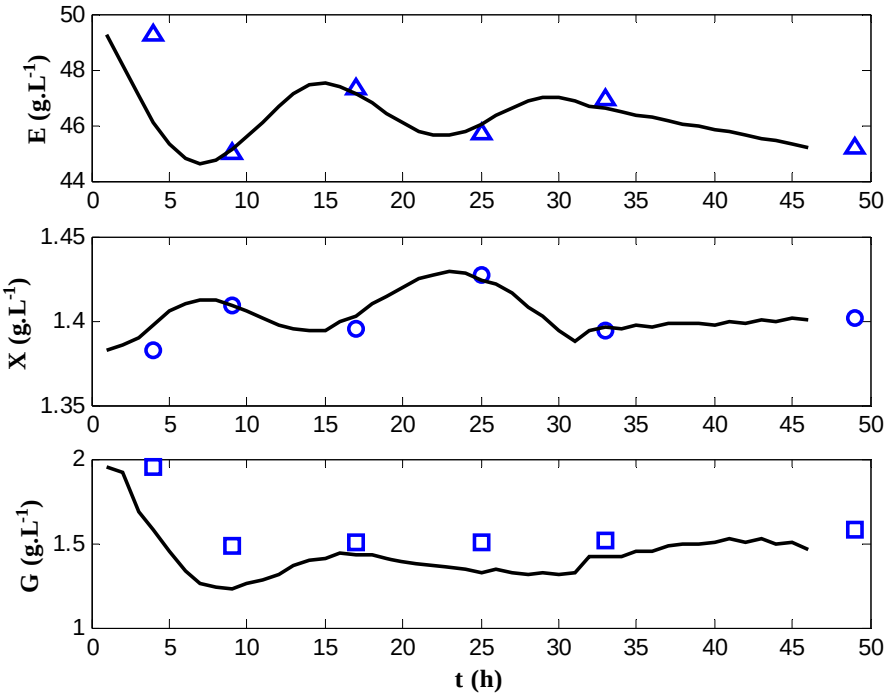


Figura 5.20 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC11 – Teste 1 com correção do erro de predição. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

5.3.2.5 Considerações gerais

Como já verificado na análise dos critérios estatísticos nas Tabelas 5.10 a 5.12, a representação dos dados experimentais da curva simulada para a concentração de células é melhor quando comparada com as duas outras concentrações. Outra evidência é o melhor desempenho do MHCN na representação da dinâmica complexa das FC05, 06 e 07 (FC06 e 07 – Apêndice D), onde há comportamento oscilatório na fase contínua do processo.

Por fim, o MHCN simulado nas condições de alimentação definidas para o Teste 1 com correção do erro de predição apresenta melhor desempenho preditivo em relação ao Teste 1 apresentado na sessão 5.3.1.

A Tabela 5.13 apresenta sinteticamente a capacidade de predição do MHCN analisada em função dos critérios estatísticos e perfis da curvas simuladas, conforme discutido acima.

Tabela 5.13 – Resumo da capacidade de predição do MHCN para as fermentações contínuas do processo de produção de etanol por *Zymomonas mobilis* – Teste 1 com correção do erro de predição

FC	**E**		**X**		**G**		**Obs**
01	DE	EE	DE	EE	DE	EE	-
02	DE	EE	DE	EE	DE	EE	Semelhante à FC01 - Apêndice D
03	DE	EE	DE	EE	DE	EE	Semelhante à FC01 - Apêndice D
04	DE	EE	DE	EE	DE	EE	Semelhante à FC01 - Apêndice D
05	DE	CO	DE	CO	DE	CO	-
06	DE	CO	DE	CO	DE	CO	Semelhante à FC05 - Apêndice D
07	DE	CO	DE	CO	DE	CO	Semelhante à FC05 - Apêndice D
10	DE	EE	DE	EE	DE	EE	Semelhante à FC01 - Apêndice D
11	N	EE	DE	EE	N	EE	-

Legenda: - N : não apresenta capacidade preditiva;
- DE: capacidade preditiva para descrever o perfil dos dados experimentais;
- EE: capacidade preditiva para representar a tendência ao estado estacionário;
- CO: capacidade preditiva para representar a tendência ao comportamento oscilatório.

5.4 COMPARAÇÃO DO MHCN COM A RNA AUTÔNOMA E COM O MODELO FENOMENOLÓGICO

Nesta sessão serão comparadas as melhores simulações do MHCN (Teste 1 com correção do erro de predição) com as predições da RNA autônoma MLP.8 e com as simulações do modelo fenomenológico proposto por Daugulis et al. (1997) nas condições implementadas por Camêlo (2009) - com os dados experimentais das FC01, 02, 03, 04, 05 e 06. A seleção destas seis fermentações está vinculada à proposta de Camêlo (2009) para as simulações do modelo fenomenológico. O modelo de Daugulis et al. (1997) é detalhado no Apêndice A.

A comparação será efetuada com todos os modelos simulados na fase de operação contínua sem adição de etanol exógeno de cada fermentação contínua, relembrando que nesta

etapa as FC01, 02, 03, 04 tendem ao estado estacionário e as FC05 e 06 exibem comportamento oscilatório.

5.4.1 Análise estatística das comparações entre os modelos

Nas Tabelas 5.14 a 5.16 estão relacionados os coeficientes de determinação relativos às concentrações de etanol, células e glicose, respectivamente.

Os valores dos R^2 das tabelas a seguir serão analisadas conjuntamente com os gráficos das curvas simuladas dos MHCN, da RNA autônoma (MLP.8) e do modelo fenomenológico de Daugulis et al. (1997) / Camêlo (2009) e com o perfil dos dados experimentais, cujas figuras serão dispostas após as tabelas.

Tabela 5.14 – Parâmetro estatístico para comparação da capacidade preditiva dos modelos avaliados para a variável de concentração de etanol

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)		
	MHCN Teste 1 com correção do erro de predição	RNA autônoma (MLP.8)	Modelo fenomenológico
FC01	0,9964	0,9702	0,4134
FC02	0,9998	0,9892	0,0112
FC03	0,9801	0,9010	0,0106
FC04	0,9904	0,9428	0,2576
FC05	0,9992	0,9873	0,1410
FC06	0,9988	0,9832	0,0771

Analisando a Tabela 5.14, observa-se que os valores do R^2 correspondentes à concentração de etanol podem ser avaliados como:

- no MHCN - excelentes, exceto na FC03 onde é muito bom;
- na RNA autônoma - muito bons para todas as FC;
- no modelo fenomenológico - muito baixos.

Tabela 5.15 – Parâmetro estatístico para comparação da capacidade preditiva dos modelos avaliados para a variável de concentração de células

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)		
	MHCN Teste 1 com correção do erro de predição	RNA autônoma (MLP.8)	Modelo fenomenológico
FC01	0,9990	0,9911	0,7215
FC02	0,9994	0,9964	0,5119
FC03	0,9998	0,9949	0,2911
FC04	0,9986	0,9852	0,5285
FC05	0,9990	0,9861	0,0779
FC06	0,9998	0,9900	0,0937

Na Tabela 5.15, os valores do R^2 obtidos para a concentração de células podem ser considerados:

- no MHCN – todos excelentes;

- na RNA autônoma: excelentes nas FC01, 02, 03 e 06; muito bons nas FC04 e 05;

- no modelo fenomenológico: baixos nas FC01, 02, 04 e 06; muito baixos nas FC03 e 05.

Tabela 5.16 – Parâmetro estatístico para comparação da capacidade preditiva dos modelos avaliados para a variável de concentração de glicose

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)		
	MHCN Teste 1 com correção do erro de predição	RNA autônoma (MLP.8)	Modelo fenomenológico
FC01	0,8962	0,9201	0,1026
FC02	0,8250	0,8827	0,1635
FC03	0,9851	0,9750	0,2367
FC04	0,9839	0,9550	0,0103
FC05	0,9998	0,9875	0,0019
FC06	0,9996	0,9839	0,0066

Da Tabela 5.16,verifica-se que os valores do R^2 referentes à concentração de glicose podem ser considerados:

- no MHCN – excelentes nas FC05 e 06; muito bons nas FC03 e 04; baixos nas FC01 e 02;

- na RNA autônoma: excelentes nas FC01, 02, 03 e 06; muito bons nas FC04 e 05;
- no modelo fenomenológico: baixos nas FC01, 02, 04 e 06; muito baixos nas FC03 e 05.

Das observações obtidas das Tabelas 5.14 a 5.16, verifica-se que o MHCN e a RNA autoônoma apresentam valores de coeficiente de determinação excelentes e muito bons, exceto para as FC01 e 02 da concentração de glicose onde são baixos. Os valores do R^2 do MHCN são um pouco melhores que os da RNA autônoma, exceção feita para as FC01 e 02 da concentração de glicose onde o inverso é observado. Já para o modelo fenomenológico normalmente são muito baixos, menos para as FC01, 02 e 04 relativos à concentração de células onde são apenas baixos.

Tais resultados dos valores de R^2 são indicativos da boa capacidade de predição do MHCN e da RNA autônoma e da predição ruim apresentada pelo modelo fenomenológico prosposto por Daugulis et al. (1997), o que será corroborado pela análise comparativa dos perfis das curvas simuladas das Figuras 5.22 a 5.27 exibidas a seguir.

5.4.2 Fermentação contínua 01 (FC01)

Na Figura 5.21 são apresentadas as comparações entre o MHCN, RNA autônoma MLP.8 e o modelo fenomenológico para a FC01.

Observando a Figura 5.21 verifica-se a boa predição do MHCN e RNA autônoma MLP.8 para as três concentrações da FC01. No entanto, no intervalo comprendido entre o 2º e 3º pontos experimentais da concentração de glicose observa-se um desvio um pouco mais pronunciado em relação a RNA autônoma MLP.8, contudo apresentam o mesmo perfil ascendente.

O modelo fenomenológico não representou adequadamente os valores experimentais e também não descreveu o comportamento ao estado estacionário da FC01.

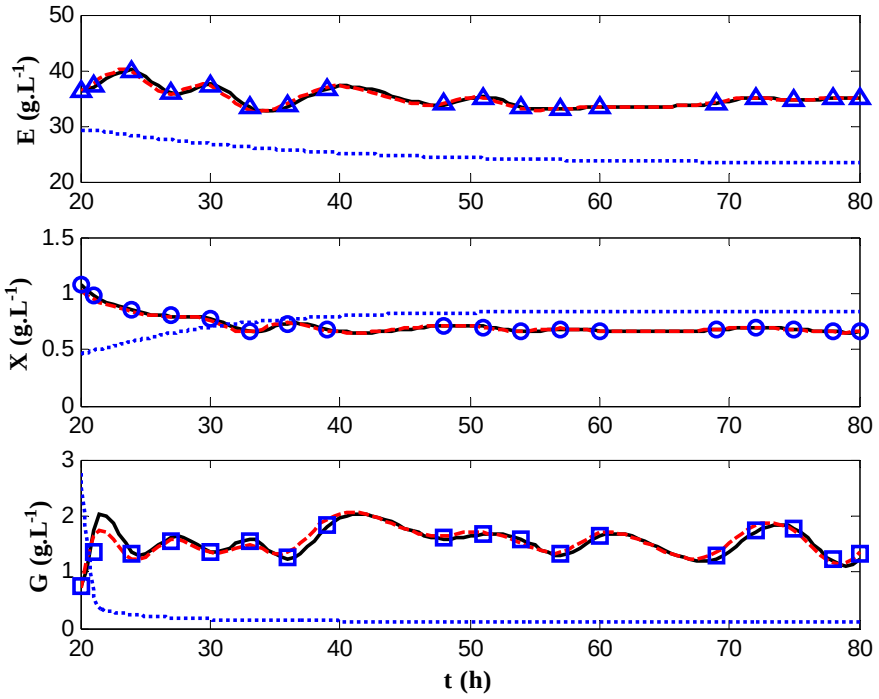


Figura 5.21 – Comparação das respostas do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} - Teste 1 com correção do erro de predição, da RNA autônoma MLP.8 e do modelo fenomenológico de Daugulis et al (1997) com os dados experimentais para a FC01. Valores simulados, preditos e dados experimentais versus tempo experimental referentes às concentrações de: ── Simulações do MHCN; – – Predição da RNA autônoma MLP.8; ... Simulações do modelo fenomenológico de Daugulis et al. (1997); Dados experimentais de Δ etanol, o células, □ glicose

5.4.3 Fermentação contínua 02 (FC02)

Na Figura 5.22 encontram-se as comparações entre o MHCN, RNA autônoma MLP.8 e o modelo fenomenológico para a FC02, onde se observa a boa predição do MHCN e RNA autônoma MLP.8 para as três concentrações da FC02, quando o modelo fenomenológico não descreveu adequadamente os valores experimentais e também não descreveu o comportamento ao estado estacionário da FC01.

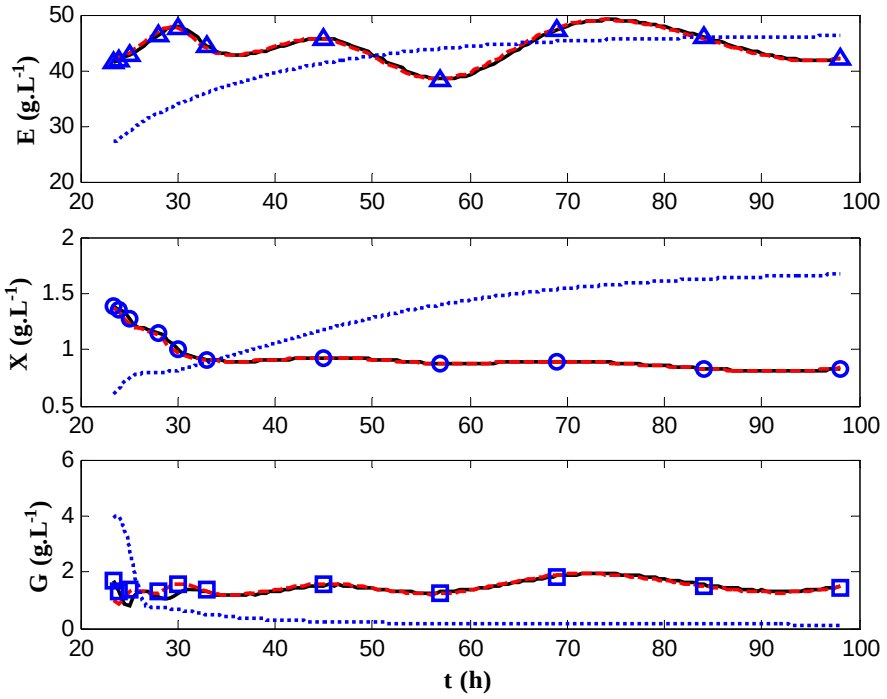


Figura 5.22 – Comparação das respostas do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} - Teste 1 com correção do erro de predição, da RNA autônoma MLP.8 e do modelo fenomenológico de Daugulis et al (1997) com os dados experimentais para a FC02. Valores simulados, preditos e dados experimentais versus tempo experimental referentes às concentrações de: ── Simulações do MHCN; – – Predição da RNA autônoma MLP.8; ... Simulações do modelo fenomenológico de Daugulis et al. (1997); Dados experimentais de Δ etanol, o células, □ glicose

5.4.4 Fermentação contínua 03 (FC03)

Na Figura 5.23 observam-se as comparações entre o MHCN, RNA autônoma MLP.8 e o modelo fenomenológico para a FC03.

A Figura 5.23 exibe boa predição do MHCN e RNA autônoma MLP.8 dos dados experimentais da FC03.

O modelo fenomenológico demosntrou desempenho um pouco melhor para a concentração de glicose, entretanto com grande desvio inicial.

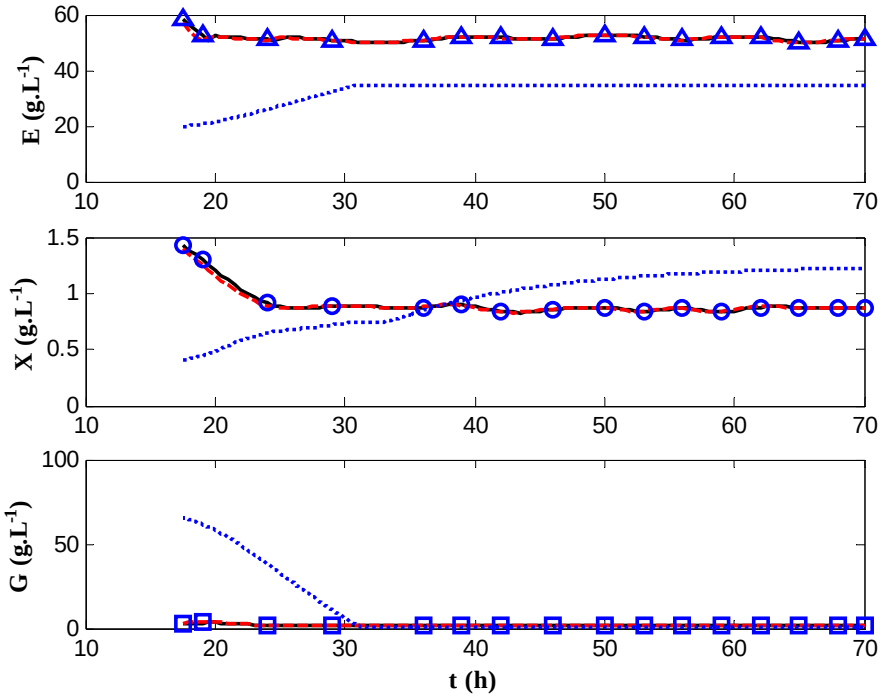


Figura 5.23 – Comparação das respostas do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} - Teste 1 com correção do erro de predição, da RNA autônoma MLP.8 e do modelo fenomenológico de Daugulis et al (1997) com os dados experimentais para a FC03. Valores simulados, preditos e dados experimentais versus tempo experimental referentes às concentrações de: ── Simulações do MHCN; – – Predição da RNA autônoma MLP.8; ... Simulações do modelo fenomenológico de Daugulis et al. (1997); Dados experimentais de Δ etanol, o células, □ glicose

5.4.5 Fermentação contínua 04 (FC04)

Na Figura 5.24 estão expostas as comparações entre o MHCN, RNA autônoma MLP.8 e o modelo fenomenológico para a FC04.

Na Figura 5.24 o MHCN e RNA autônoma MLP.8 predizem habilmente as três concentrações da FC04.

O modelo fenomenológico não prediz adequadamento o processo.

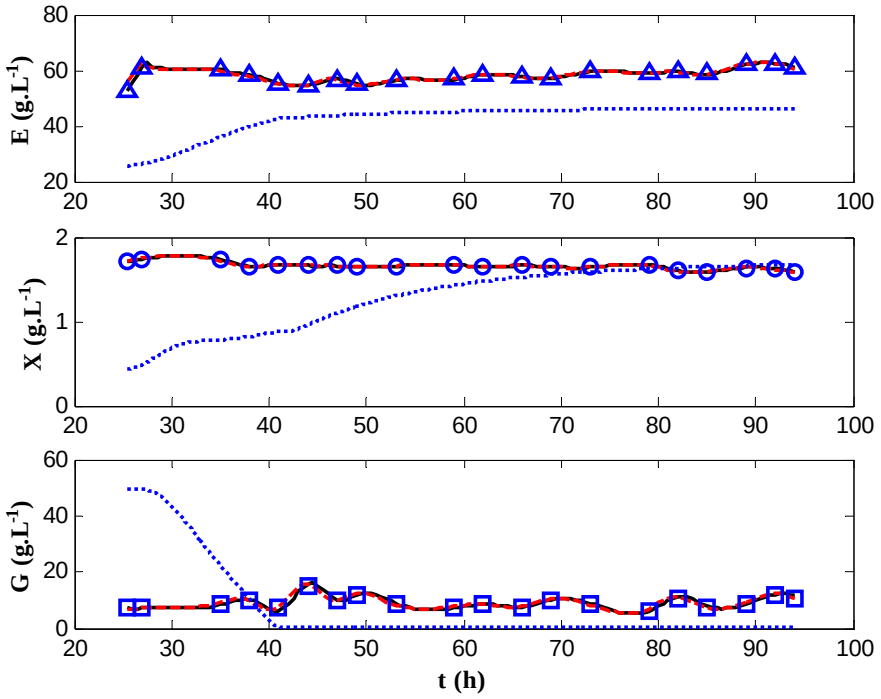


Figura 5.24 – Comparação das respostas do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} - Teste 1 com correção do erro de predição, da RNA autônoma MLP.8 e do modelo fenomenológico de Daugulis et al (1997) com os dados experimentais para a FC04. Valores simulados, preditos e dados experimentais versus tempo experimental referentes às concentrações de: ── Simulações do MHCN; – – Predição da RNA autônoma MLP.8; ... Simulações do modelo fenomenológico de Daugulis et al. (1997); Dados experimentais de Δ etanol, o células, □ glicose

5.4.6 Fermentação contínua 05 (FC05)

Na Figura 5.25 esboçam-se as comparações entre o MHCN, RNA autônoma MLP.8 e o modelo fenomenológico para a FC05.

Na Figura 5.25 o MHCN e a RNA autônoma MLP.8 mostram-se hábeis na predição do comportamento oscilatório da FC05 para as 3 variáveis analisadas, destacando-se em relação ao modelo fenomenológico implementado por Camêlo (2009). O modelo fenomenológico não se mostrou adequado para os dados experimentais.

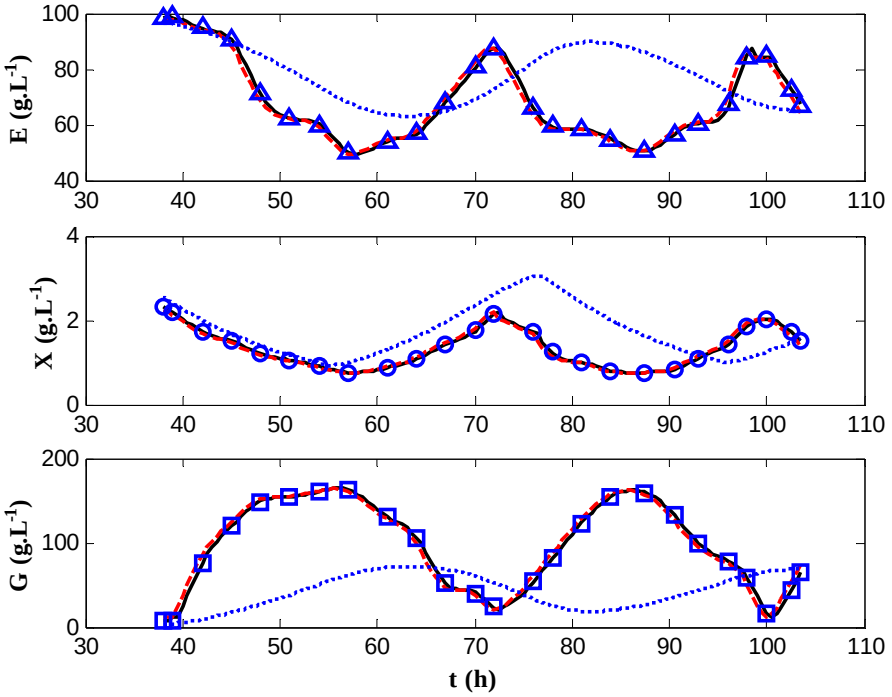


Figura 5.25 – Comparação das respostas do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} - Teste 1 com correção do erro de predição, da RNA autônoma MLP.8 e do modelo fenomenológico de Daugulis et al (1997) com os dados experimentais para a FC05. Valores simulados, preditos e dados experimentais versus tempo experimental referentes às concentrações de: — Simulações do MHCN; – – Predição da RNA autônoma MLP.8; ... Simulações do modelo fenomenológico de Daugulis et al. (1997); Dados experimentais de Δ etanol, o células, □ glicose

5.4.7 Fermentação contínua 06 (FC06)

Na Figura 5.26 dispõem-se as comparações entre o MHCN, RNA autônoma MLP.8 e o modelo fenomenológico para a FC06.

A RNA autônoma MLP.8 e o MHCN predizem adequadamente o comportamento oscilatório da FC06 das concentrações de etanol, de células e de glicose.

O modelo fenomenológico proposto por Daugulis et al. (1997) não prediz adequadamente os perfis estudados.

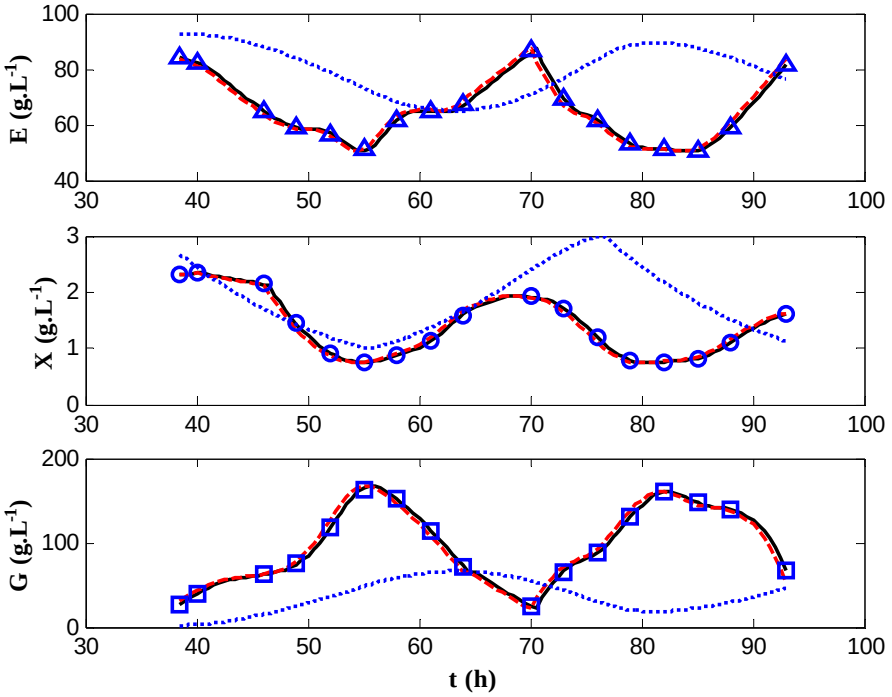


Figura 5.26 – Comparação das respostas do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} - Teste 1 com correção do erro de predição, da RNA autônoma MLP.8 e do modelo fenomenológico de Daugulis et al (1997) com os dados experimentais para a FC06. Valores simulados, preditos e dados experimentais versus tempo experimental referentes às concentrações de: — Simulações do MHCN; – – Predição da RNA autônoma MLP.8; ... Simulações do modelo fenomenológico de Daugulis et al. (1997); Dados experimentais de Δ etanol, o células, □ glicose

Como corroborado pelas comparações realizadas nas Figuras 5.21 a 5.26, apesar da rigorosa análise dos perfis das curvas e dos critérios estatísticos para a classificação do MHCN nas Tabelas 5.10 a 5.12, comprovou-se que este exibe muito boa capacidade de predição quando a MLP.51 é alimentada com os dados experimentais (dados históricos) das concentrações de etanol, de células e de glicose e o erro de predição é corrigido ao longo da simulação.

Melhor desempenho do modelo neuronal antônomo em relação ao modelo cibernético e deste último sobre o fenomenológico fora discutido por Patnaik (2009b) quando testou os 3 tipos de modelos em cultura simples *Ralstonia eutropha* e co-cultura de *Ralstonia eutropha* e *Lactobacillus delbrueckii*. Contudo, apresentam dificuldade de extrapolação, ficando sua aplicação limitada ao domínio do conjunto de dados de treinamento. Já os modelos cibernéticos são um sistema ideal de autocontrole com um mínimo de conhecimento determinístico. A introdução de variáveis de controle cibernético para síntese e atividade enzimática possibilita uma aproximação coerente para predição do fenômeno real. No entanto,

Ramkrishna (2003) discorre sobre a disponibilidade experimental dos fluxos metabólicos e a falta, principalmente, de uma estrutura para a descrição da regulação metabólica. Logo, a integração destes dois modelos na concepção de um modelo híbrido, compensando suas principais limitações, possibilita a identificação mais precisa da dinâmica do complexo processo oscilatório, a melhora da capacidade preditiva do modelo, além de ser reconhecida como uma alternativa quanto a custo e efetividade para análise de bioprocessos.

Nesta linha de abordagem, obteve-se o modelo híbrido cibernético/neuronal com eficiência similar ao neuronal autônomo, com a flexibilidade da junção das duas técnicas conforme discutido no parágrafo anterior.

Quanto ao modelo fenomenológico, a literatura científica é recorrente ao relatar a dificuldade no desenvolvimento de modelos matemáticos fenomenológicos simples com acurácia suficiente para a descrição de bioprocessos, argumentando sobre a alta não linearidade advindas das características intrínsecas dos micro-organismos, e a complexidade do meio reacional normalmente composto por várias fases (Glassey et al., 1994; Hussain, 1999; Henriques et al., 1999; Zorzetto et al., 2000; Vlassides et al., 2001; Patnaik, 2003; Oliveira, 2004). Para o processo contínuo de produção de etanol abordado neste estudo, faz-se oportuno destacar a sua alta complexidade, fator que dificulta a aplicão do modelo fenomenológico em conformidade com o já verificado na literatura.

5.5 MHCN PARA INFERÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE LACTATO - Teste 1 com correção do erro de predição

Como reportado na sessão 4.2.1.2.3, a concentração de lactato não foi medida experimentalmente por Camêlo (2009). Assim, a partir do cálculo da variável cibernética de saída Z_3, por intermédio da Equação 4.41, a concentração de lactato pode ser simulada dinamicamente empregando a Equação 4.32.

A correção do erro de predição na equação de taxa da variável de concentração de lactato (Equação 4.32) também será considerada, analogamente ao discutido na sessão 5.3.2 para as concentrações de etanol, de células e de glicose. Contudo, esta correção será procedida considerando uma aproximação em relação à estequiometria do catabolismo da glicose, posto a inexistência dos dados experimentais correspondentes. Para tal fim, a concentração de lactato será estimada em função da concentração celular, empregando os coeficentes estequiométricos $\varnothing_1$ e $\varnothing_3$ definidos na Tabela 4.4. A opção pela concentração celular para

esta estimativa deve-se a melhor capacidade preditiva do MCHN verificada para tal variável e por ter sido o coeficiente de rendimento para lactato calculado em função do rendimento da concentração de células (Equação 4.22), como discutido ao final da sessão 5.3.2 e apresentado na Tabela 4.5, respectivamente. Então a estimativa da concentração de lactato é dada pela correlação:

$$\mathbf{L_{Est}} = \frac{\varnothing_3 \mathbf{X}}{\varnothing_1} \tag{5.4}$$

Por conseguinte, a equação para determinar o erro de predição para a concentração de lactato é:

$$\boldsymbol{erroL(k) = L_{Est}(k) - \hat{L}(k/k-1)} \tag{5.5}$$

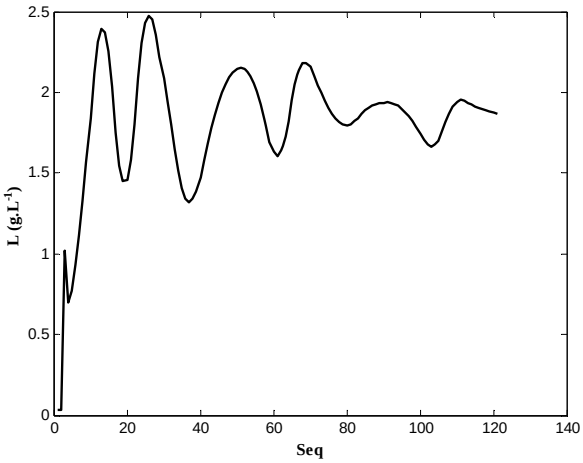
sendo: $\boldsymbol{erroL(k)}$ ≡ erro de predição para a concentração de lactato; $\boldsymbol{L_{Est}(k)}$ ≡ variável estimada para concentração de lactato; $\boldsymbol{\hat{L}(k/k-1)}$ ≡ variável predita no tempo de amostragem “k-1” para concentração de lactato em “k”.

Assim, o MHCN pode ser empregado como sensor virtual para inferir dinamicamente a concentração da variável de estado correspondente à rota metabólica de formação do lactato na fermentação alcoólica contínua utilizando *Zymomonas mobilis*.

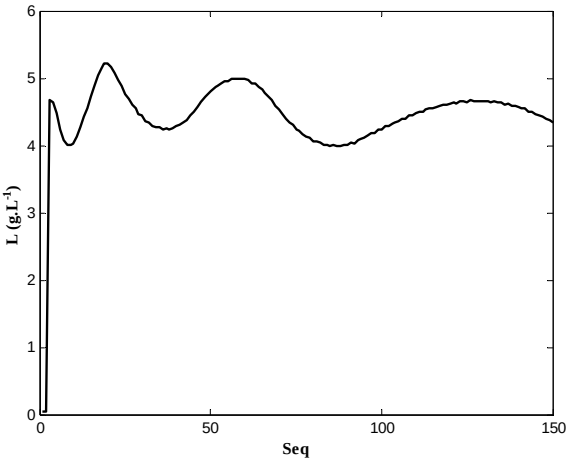
As Figuras 5.27, 5.28 e 5.29 apresentam os perfis das curvas simuladas pelo MHCN para a concentração de lactato correspondente as fermentações contínuas, assim dispostas:

- Figura 5.27: curvas simuladas das FC01, 02 e 03, onde a fase contínua tende ao estado estacionário;
- Figura 5.28: curvas simuladas das FC04, 10 e 11, tende também ao estado estacionário na fase contínua;
- Figura 5.29: curvas simuladas das FC05, 06 e 07, onde é verificado comportamento oscilatório na fase contínua.

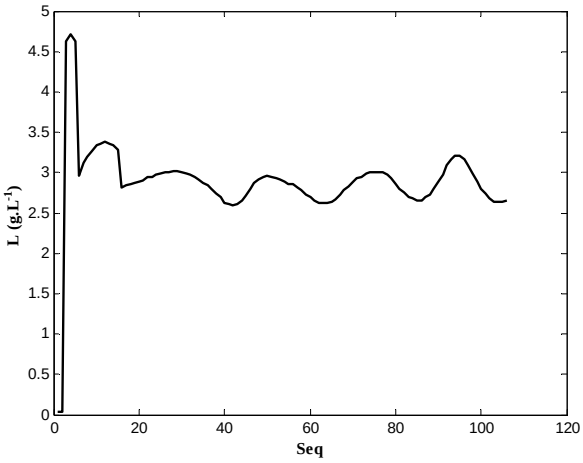
Nas Figuras 5.27 e 5.29 são observadas oscilações na variável concentração de lactato das FC01, 02, 03, 04, 10 e 11, onde as variáveis de concentração de etanol, de células e de glicose tendem ao estado estacionário. Analisando a Equação 4.32, verifica-se que a variável de estado da concentração de lactato é função da variável cibernética de saída Z_3, a qual apresenta uma amplitude de oscilação grande, variando no intervalo aproximado de [-350; 400], como pode ser constatado na Figura 5.12. Logo, torna-se razoável considerar a influência significativa do comportamento da variável cibernética de saída Z_3 nas oscilações observadas nas FC01, 02, 03, 04, 10 e 11 para a concentração de lactato.



(a) FC01

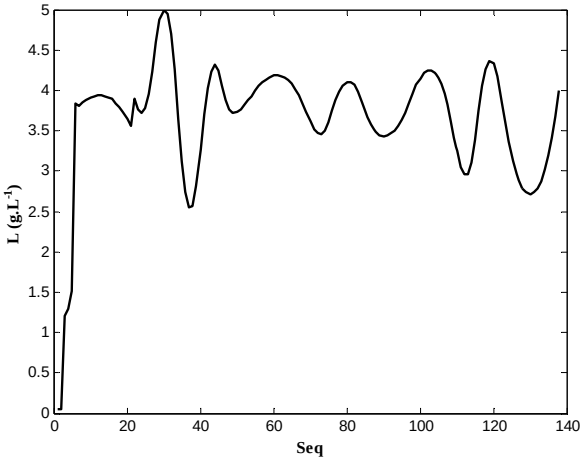


(b) FC02

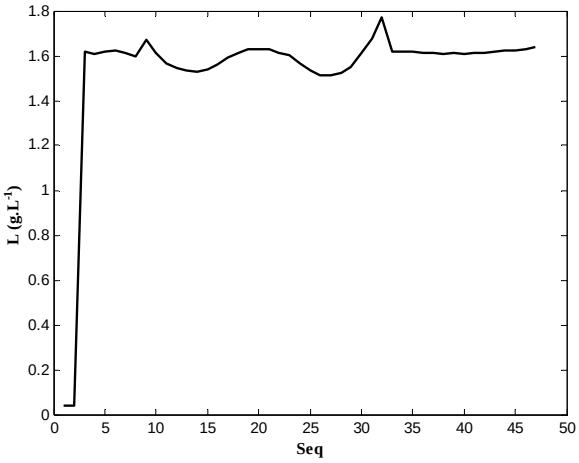


(c) FC03

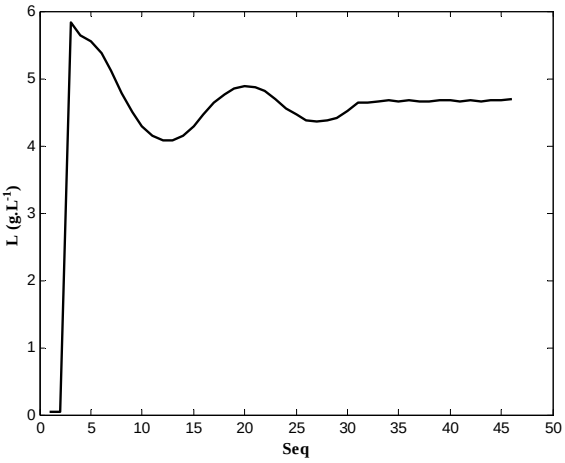
Figura 5.27 – Concentração de lactato (L_{Hyb}) simulada pelo MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} *versus* sequência de dados – Teste 1 com correção do erro de predição



(a) FC04

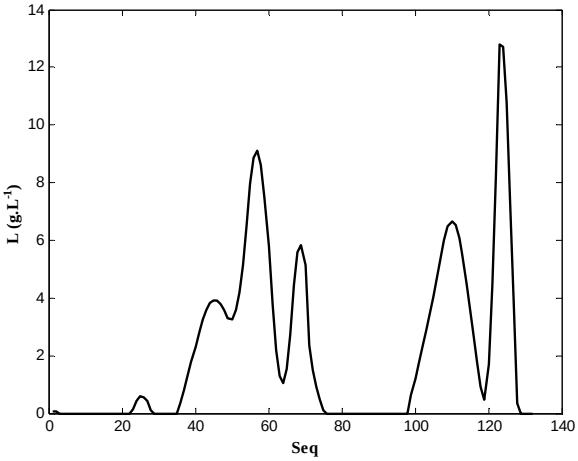


(b) FC10

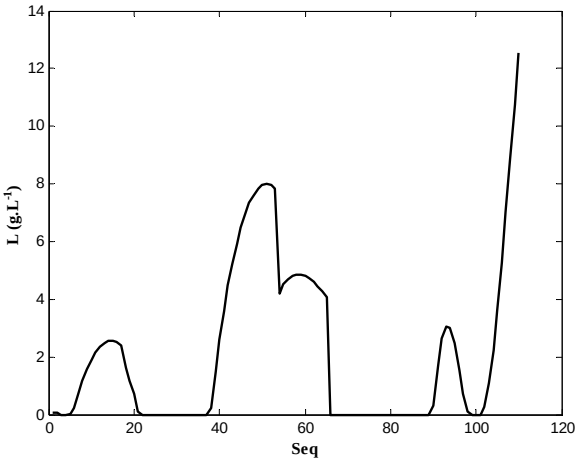


(c) FC11

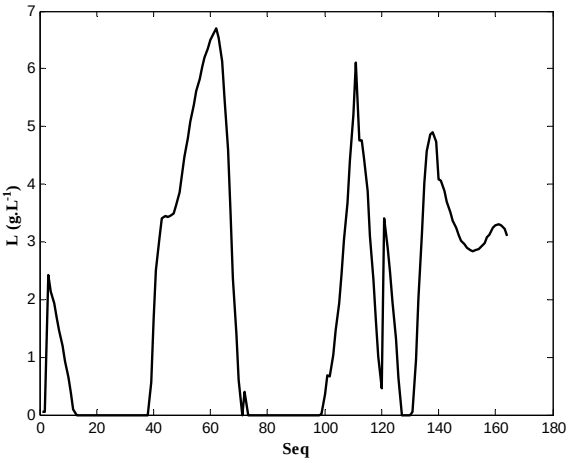
Figura 5.28 – Curva da concentração de lactato (L_{Hyb}) simulada pelo MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} *versus* sequência de dados – Teste 1 com correção do erro de predição



(a) FC05



(b) FC06



(c) FC07

Figura 5.29 – Curva da concentração de lactato (L_{Hyb}) simulada pelo MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} *versus* sequência de dados – Teste 1 com correção do erro de predição

CAPÍTULO 6

6 INVESTIGAÇÃO DO DESEMPENHO DO MHCN

6.1 MHCN NO CASO DE AUSÊNCIA DE MEDIÇÕES

Pensando no uso do MHCN na predição do processo em esquemas de monitoramento, torna-se viável a discussão abordando a possibilidade de ausência completa de medições ou ainda a disponibilidade parcial dessas medições para a alimentação do modelo (dados experimentais).

A possibilidade da presença completa de medições já fora apresentada na sessão 5.3 do Capítulo 5, quando foram discutidos os resultados do Teste 1 e do Teste 1 com correção do erro de predição. Nesta oportunidade, verificou-se que as respostas do MHCN para a concentração de glicose só eram satisfatórias para as fermentações contínuas com tendência ao comportamento oscilatório na etapa contínua. Portanto, o estudo para verificação da influência da ausência de variáveis medidas no comportamento do MHCN será realizado somente para as FC05, 06 e 07.

Assim sendo, neste capítulo são apresentadas as simulações do MHCN em diversas condições de alimentação, de forma a verificar a sua capacidade de representação da dinâmica complexa das variáveis de estado do processo de produção de bioetanol de forma contínua, empregando *Zymomonas mobilis* como agente biológico, estudado por Camêlo (2009). Há de enfatizar-se a dificuldade trazida para a capacidade de predição do modelo ocasionada pela complexidade da dinâmica em estudo, a qual pode exibir tendência ao estado estacionário ou comportamento oscilatório em função das condições operacionais. Para tanto, foram levados a termo 7 testes envolvendo as três fermentações contínuas com resultados adqueados de

predição de glicose, observadas no Teste 1 e no Teste 1 com correção do erro de predição (FC0, 06 e 07).

Desta forma, serão realizados os testes 2 ao 7, nas condições seguintes:

(1) testes de 2 a 4: Grupo 2 – com ausência de 1 medição;

(2) testes de 5 a 7: Grupo 3 – com ausência de 2 medições;

(3) teste 8: Grupo 4 - ausência de todas as medições.

Nos testes de 2 ao 8, será investigada a capacidade do MHNC na predição qualitativa do comportamento dinâmico complexo do processo de produção de etanol, na condição de disponibilidade parcial das medições.

6.1.1 MHCN realimentado no caso de ausência parcial de medições

Havendo ausência parcial de medições, poder-se-ia investigar a capacidade do MHCN em predizê-las.

Nesta condição de alimentação do MHCN, a rede neuronal MPL.51 - com arquitetura descrita nas Tabelas 3.6 e 3.7 da sessão 3.5.1 do Capítulo 3, será realimentada pelos valores das concentrações de etanol, de células e de glicose, efetuando a permuta entre:

a) Teste 2 a 4 – Grupo 2: duas das variáveis com valores experimentais interpolados a partir dos dados experimentais (E_{Exp}, X_{Exp}, G_{Exp} - medições) e uma das variáveis com valor híbrido;

b) Teste 5 a 7 – Grupo 3: uma das variáveis com valor experimental interpolado a partir dos dados experimentais (E_{Exp}, X_{Exp}, G_{Exp} - medições) e duas das variáveis com valores híbridos.

Os referidos valores híbridos para as variáveis foram os simulados pelo modelo híbrido (MHCN) explicitando as concentrações na condição um passo à frente (k+1) nas Equações (4.29), (4.30) e (4.31) definidas no Capítulo 4 (E_{Hyb}, X_{Hyb}, G_{Hyb}).

Na análise das respostas do MHCN para cada teste (2 a 7), serão utilizados os critérios estatísticos definidos na sessão 3.8 do Capítulo 3. Estes critérios estatísticos serão distribuídos em três tabelas para cada teste, sendo que cada tabela conterá os critérios estatísticos para uma das variáveis de estado.

Assim, empregando a mesma sistemática adotada para o Teste 1, as respostas do MHCN em cada teste, serão analisadas pelos critérios estatísticos constantes nas tabelas a seguir, associadas aos gráficos de comparação das respostas simuladas pelo modelo com os dados experimentais, os quais estão dispostos nos itens subsequentes. Desta forma, os dados

das tabelas serão discutidos juntamente com a análise dos gráficos para cada fermentação contínua em cada teste.

Por fim, todos os testes de alimentação para cada variável de estado dentro das respectivas fermentações serão comparados. Para tanto, os valores do coeficiente de determinação (R^2) serão dispostos em três tabelas, sendo uma para cada variável de estado na sessão 5.5.3.

6.1.1.1 MHCN alimentado com variáveis experimentais (E_{Exp} e X_{Exp}) e híbrida (G_{Hyb}) – Teste 2

Nesta condição, a rede neuronal MPL.51 será alimentada pelos valores experimentais interpolados das concentrações de etanol e de células (E_{Exp} e X_{Exp}) e pelo valor híbrido da concentração de glicose (G_{Hyb}) simuladas pelo modelo MHCN.

6.1.1.1.1 Análise estatística das simulações (FC05 – FC07)

Nas Tabelas 6.1 a 6.3 estão relacionados os critérios estatísticos referentes à regressão linear da curva resposta dos gráficos dos valores simulados pelo modelo (preditos) versus os valores experimentais interpolados (observados) relativos às concentrações de etanol, células e glicose, respectivamente.

Tabela 6.1 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de etanol – Teste 2

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC05	0,9793	23,0887	0,9800	-2,8000
FC06	0,8196	51,7177	0,9200	-0,1500
FC07	0,1377	2.607,97	1,3000	18,0000

Tabela 6.2 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de células – Teste 2

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC05	0,9754	0,0155	0,9100	0,0200
FC06	0,9616	0,3862	0,9900	-0,1500
FC07	0,1588	1,3746	0,9200	0,8900

Tabela 6.3 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de glicose – Teste 2

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC05	0,7593	709,4134	0,7400	36,0000
FC06	0,7453	530,3499	0,8200	23,0000
FC07	0,1203	15.087,98	1,1000	-36,0000

Analisando as Tabelas 6.1, 6.2 e 6.3, sem a medição da concentração de glicose, pode-se verificar que os critérios estatísticos inerentes à concentração celular são melhores em relação às demais concentrações, principalmente para o MSE e coeficiente linear. Analogamente, o mesmo padrão repete-se para a concentração de etanol frente à concentração de glicose. O coeficiente de determinção das três concentrações na FC07 estão muito baixos.

6.1.1.1.2 Fermentação contínua 05 (FC05)

A Figura 6.1 encerra os resultados das simulações para a FC05.

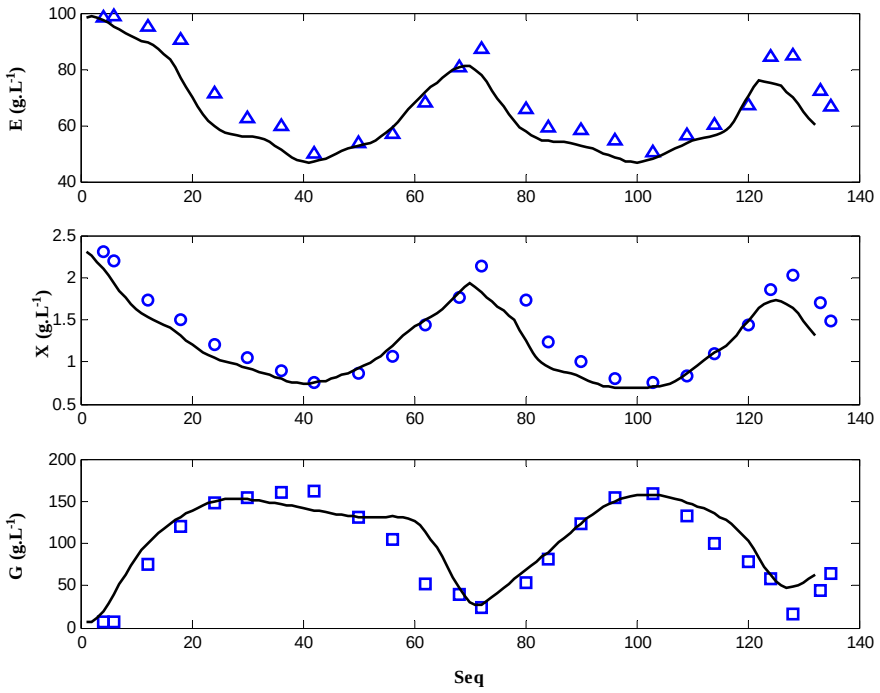


Figura 6.1 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Hyb} para a FC05 – Teste 2. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

Tendo os critérios estatísticos dispostos nas Tabelas 6.1, 6.2 e 6.3 e a Figura 6.1, observa-se a capacidade do MHCN em predizer somente a tendência ao comportamento

oscilatório para as concentrações de etanol, de células e de glicose para a FC05, na ausência da medição para concentração de glicose.

6.1.1.1.3 Fermentação contínua 06 (FC06)

Na Figura 6.2 são apresentadas as simulações para a FC06.

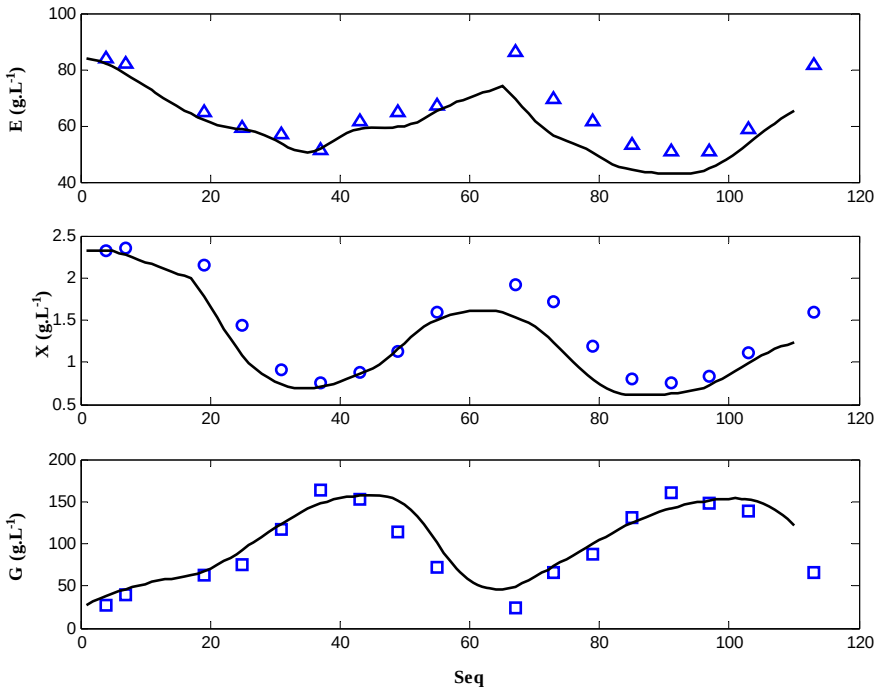


Figura 6.2 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Hyb} para a FC06 – Teste 2. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

A partir dos critérios estatísticos das Tabelas 6.1, 6.2 e 6.3 e da Figura 6.2, constata-se a capacidade do MHCN em predizer somente a tendência ao comportamento oscilatório para as concentrações de etanol, de células e de glicose para a FC06, na ausência da medição para concentração de glicose.

6.1.1.1.4 Fermentação contínua 07 (FC07)

Na Figura 6.3 são apresentadas as respostas do MHCN para a FC07.

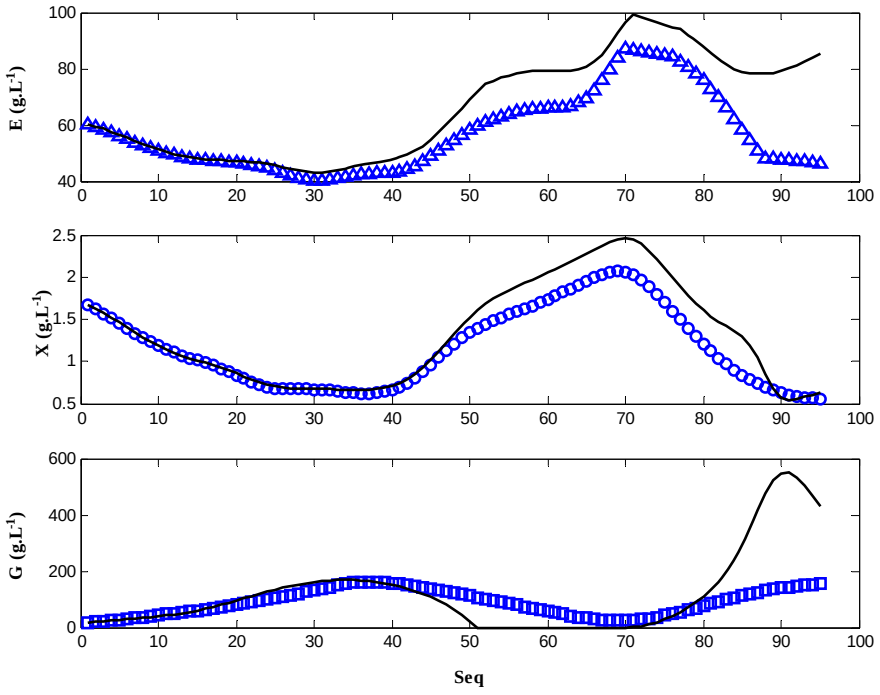


Figura 6.3 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Hyb} para a FC07 – Teste 2. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

A Figura 6.3 mostra as simulações para FC07 somente até o ponto nº 95 da sequência de dados, pois para a fase seguinte das simulações a resposta do MHCN apresenta grande distorção em relação aos dados medidos.

De posse dos critérios estatísticos dispostos nas Tabelas 6.1, 6.2 e 6.3 e da Figura 6.3, verifica-se a falta de capacidade de predição do MHCN para a FC07, na ausência da medição para concentração de glicose, ratificando o comportamento indicado pelos valores muito baixos do R^2 para as três concentrações.

6.1.1.2 MHCN alimentado com variáveis experimentais (E_{Exp} e G_{Exp}) e híbrida (X_{Hyb}) - Teste 3

Para este teste, a rede neuronal MPL.51 será alimentada pelos valores experimentais interpolados das concentrações de etanol e de glicose (E_{Exp} e G_{Exp}) e pelo valor híbrido da concentração de células (X_{Hyb}) simuladas pelo MHCN.

6.1.1.2.1 Análise estatística das simulações (FC05 – FC07)

Nas Tabelas 6.4 a 6.6 estão relacionados os critérios estatísticos referentes à regressão linear da curva resposta dos gráficos dos valores simulados pelo modelo (preditos) versus os valores experimentais interpolados (observados) relativos às concentrações de etanol, células e glicose, respectivamente.

Tabela 6.4 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de etanol – Teste 3

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC05	0,9502	12,1804	0,9300	3,6000
FC06	0,9231	17,7304	0,8400	7,7000
FC07	0,9608	7,3688	0,9300	5,6000

Tabela 6.5 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de células – Teste 3

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC05	0,9460	0,0183	0,7700	0,2700
FC06	0,7751	0,0971	0,7800	0,1300
FC07	0,8323	0,0288	0,9200	0,1100

Tabela 6.6 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de glicose – Teste 3

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC05	0,9938	51,7821	1,0000	3,5000
FC06	0,9813	94,2155	1,0000	7,4000
FC07	0,9928	15,2105	0,9800	3,4000

Analisando as Tabelas 6.4, 6.5 e 6.6, na ausência da medição da concentração celular, o R^2 para as concentrações de etanol e de glicose apresentam-se ligeiramente melhores quando comparadas as da concentração de células. Contudo, o MSE e o coeficiente linear da concentração de célula são bem melhores que os da demais concentrações.

6.1.1.2.2 Fermentação contínua 05 (FC05)

A Figura 6.4 encerra os resultados das simulações para a FC05.

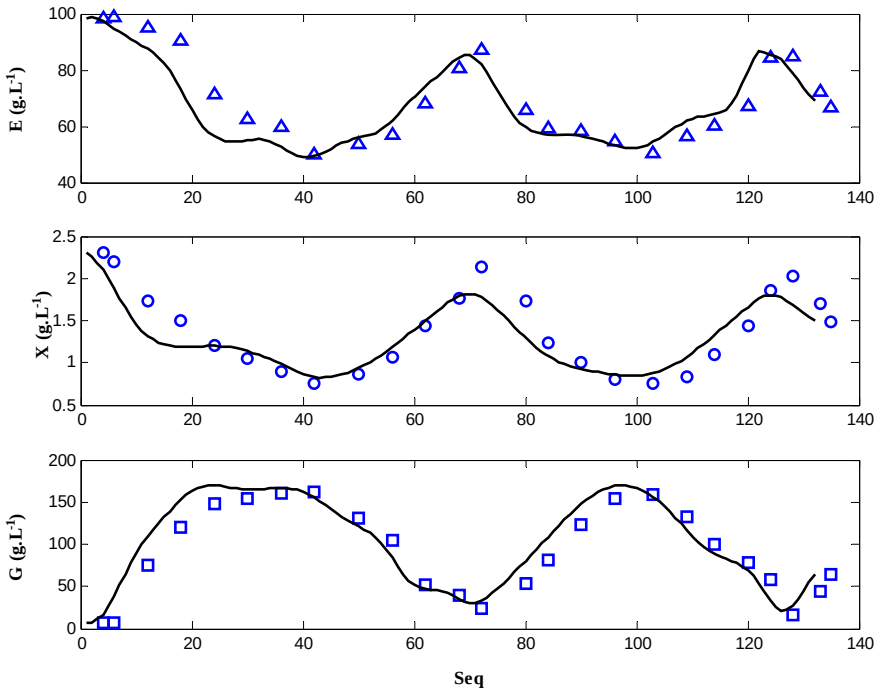


Figura 6.4 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Hyb} e G_{Exp} para a FC05 – Teste 3. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

Pautado nos critérios estatísticos dispostos nas Tabelas 6.4, 6.5 e 6.6 e no perfil da Figura 6.4, pode-se constatar que para a FC05 a capacidade do MHCN em predizer somente a tendência ao comportamento oscilatório para as concentrações de etanol, de células e de glicose, na ausência da medição para concentração de células.

6.1.1.2.3 Fermentação contínua 06 (FC06)

Na Figura 6.5 são apresentadas as simulações para a FC06.

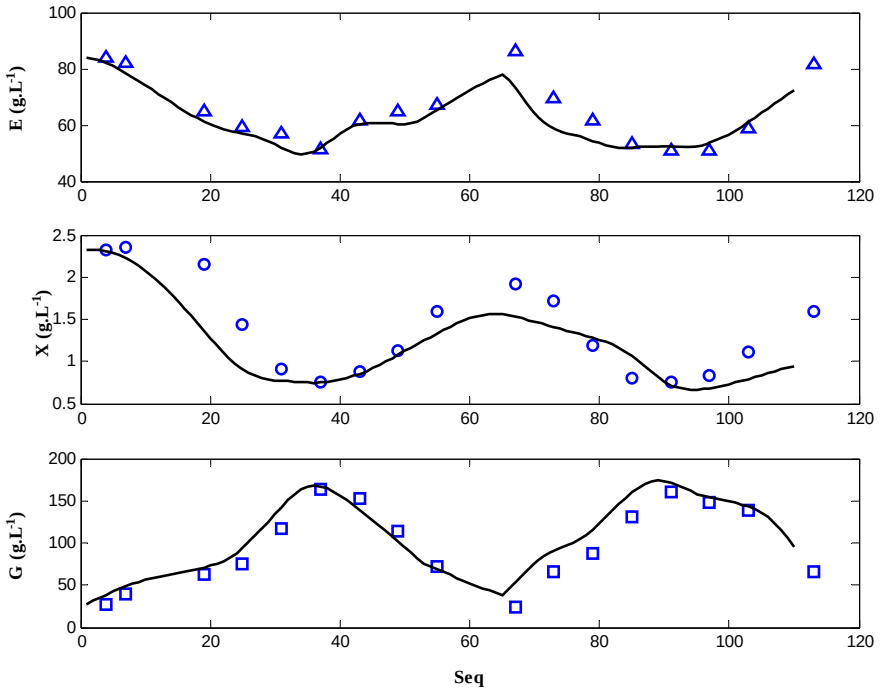


Figura 6.5 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Hyb} e G_{Exp} para a FC06 – Teste 3. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

Norteado pelos critérios estatísticos dispostos nas Tabelas 6.4, 6.5 e 6.6 e no perfil da Figura 6.5, observa-se para a FC06 a possibilidade do MHCN em predizer somente a tendência ao comportamento oscilatório para as concentrações de etanol, de células e de glicose, na ausência da medição para concentração de células.

6.1.1.2.4 Fermentação contínua 07 (FC07)

Na Figura 6.6 são apresentadas as respostas do MHCN para a FC07.

Apreciando os critérios estatísticos das Tabelas 6.4, 6.5 e 6.6 e da Figura 6.6, verifica-se para a FC07, na ausência da medição para concentração de células, que o MHCN:

- exibe capacidade para predizer o valor das concentrações de etanol e de células e para descrever a tendência ao comportamento oscilatório;

- possui capacidade para predizer somente a tendência ao comportamento oscilatório para a concentração de glicose.

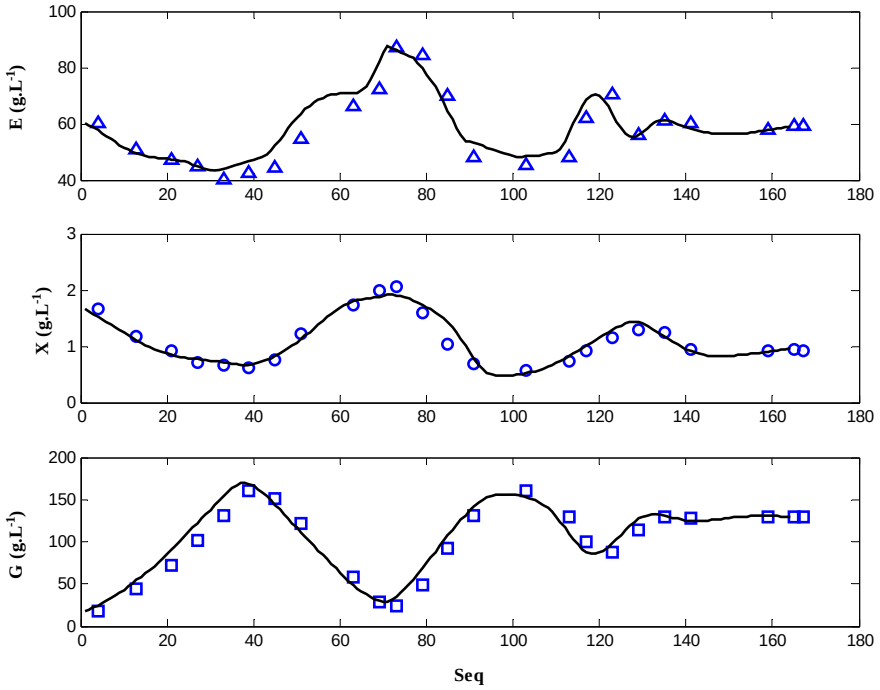


Figura 6.6 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Hyb} e G_{Exp} para a FC07 – Teste 3. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

6.1.1.3 MHCN alimentado com variáveis experimentais (X_{Exp} e G_{Exp}) e híbrida (E_{Hyb}) - Teste 4

Neste caso, a rede neuronal MPL.51 será alimentada pelos valores experimentais interpolados das concentrações de célula e de glicose (X_{Exp} e G_{Exp}) e pelo valor híbrido da concentração de etanol (E_{Hyb}) simulado pelo MHCN.

6.1.1.3.1 Análise estatística das simulações (FC05 – FC07)

Nas Tabelas 6.7 a 6.9 estão relacionados os critérios estatísticos referentes à regressão linear da curva resposta dos gráficos dos valores simulados pelo modelo (preditos) versus os valores experimentais interpolados (observados) relativos às concentrações de etanol, células e glicose, respectivamente.

Tabela 6.7 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de etanol – Teste 4

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC05	0,8378	41,8014	0,6900	20,0000
FC06	0,6395	56,4442	0,6400	19,0000
FC07	0,3059	127,4186	0,5600	28,0000

Tabela 6.8 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de células – Teste 4

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC05	0,9813	0,0039	0,9900	0,0180
FC06	0,9906	0,0113	0,9800	-0,0590
FC07	0,8830	0,02856	0,9200	0,1900

Tabela 6.9 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de glicose – Teste 4

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC05	0,9938	22,1903	0,9600	2,2000
FC06	0,9910	23,8414	0,9400	7,2000
FC07	0,9458	169,9207	0,9300	-1,200

Analisando as Tabelas 6.7, 6.8 e 6.9, sem a medição para a concentração de etanol, pode-se verificar que os critérios estatísticos inerentes à concentração celular são melhores em relação as demais concentrações, principalmente para MSE e coeficiente linear. Tal condição constitui-se em indício da provável melhor representação da concentração celular.

6.1.1.3.2 Fermentação contínua 05 (FC05)

A Figura 6.7 encerra os resultados das simulações para a FC05.

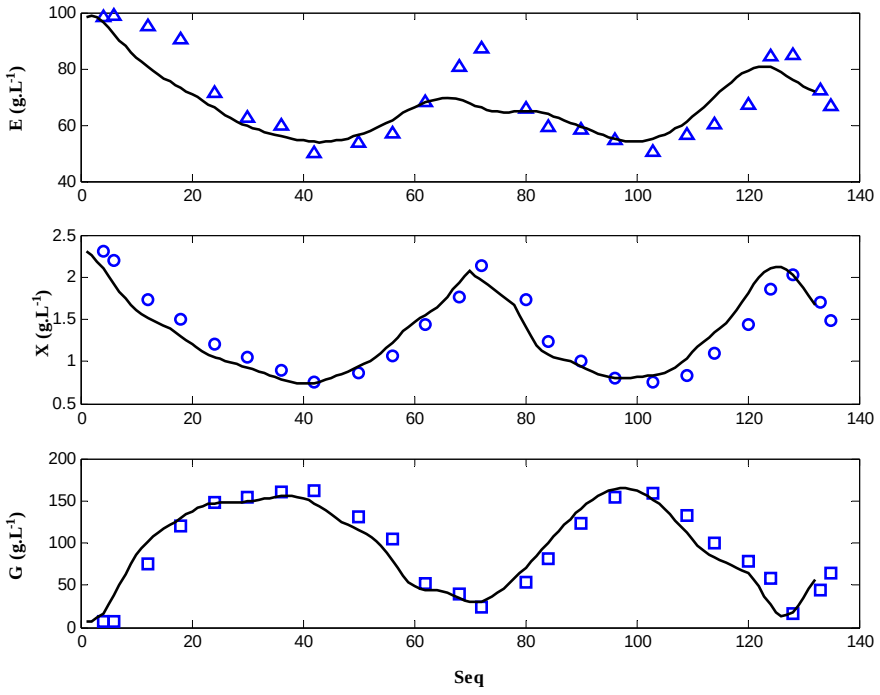


Figura 6.7 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC05 – Teste 4. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

Com base nos critérios estatísticos dispostos nas Tabelas 6.7, 6.8 e 6.9 e no perfil da Figura 6.7, verifica-se para a FC05, na ausência da medição para concentração de etanol, que o MHCN:

- é capaz de predizer somente a tendência ao estado estacionário da concentração de etanol, porém com padrão diferente do experimental em termos de períodos e amplitude.

- exibe capacidade em predizer o valor da concentração de células e para descrever a tendência ao comportamento oscilatório;

- exibe capacidade em predizer somente a tendência ao comportamento oscilatório para a concentração de glicose.

6.1.1.3.3 Fermentação contínua 06 (FC06)

Na Figura 6.8 são apresentadas as simulações para a FC06.

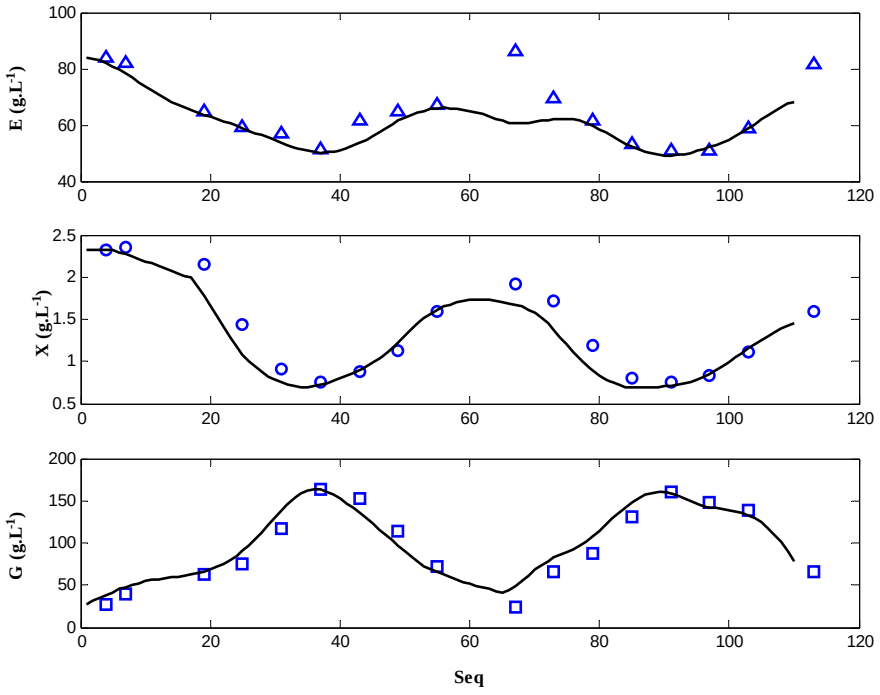


Figura 6.8 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC06 – Teste 4. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

Analisando os critérios estatísticos dispostos nas Tabelas 6.7, 6.8 e 6.9 e o perfil da Figura 6.8, verifica-se para a FC06, na ausência da medição para concentração de etanol, que o MHCN:

- exibe capacidade em predizer o valor da concentração de células e para descrever a tendência ao comportamento oscilatório;
- exibe capacidade em predizer somente a tendência ao comportamento oscilatório para a concentração de glicose;
- é capaz de predizer a tendência ao estado estacionário da concentração de etanol, todavia com padrão diferente do experimental em termos de períodos e amplitude.

6.6.1.3.4 Fermentação contínua 07 (FC07)

Na Figura 6.9 são apresentadas as respostas do MHCN para a FC07.

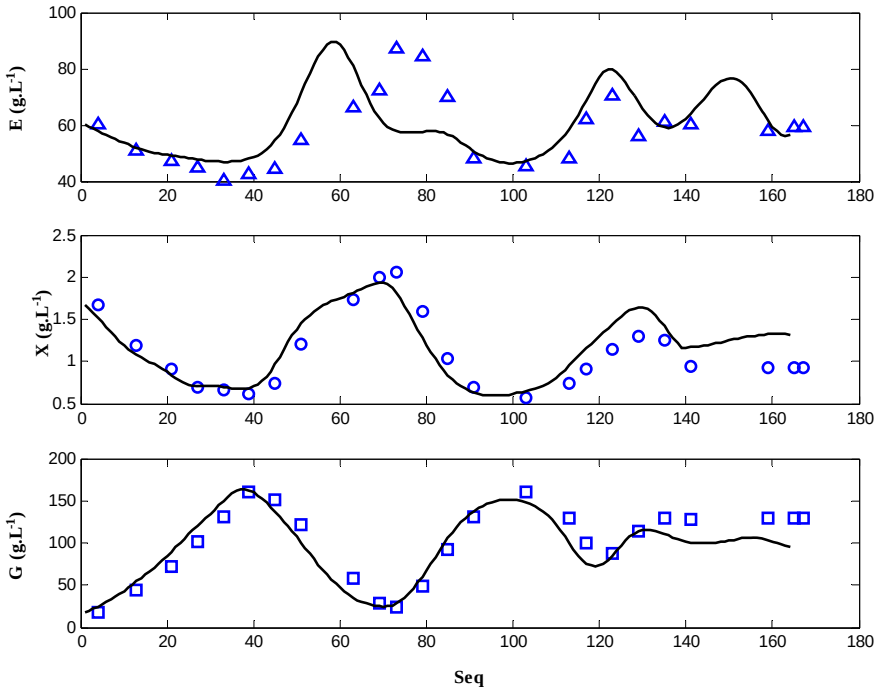


Figura 6.9 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC07 – Teste 4. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

Calcado nos critérios estatísticos dispostos nas Tabelas 6.7, 6.8 e 6.9 e no perfil da Figura 6.9, observa-se para a FC07, na ausência da medição para concentração de etanol, que o MHCN:

- exibe capacidade para predizer somente a tendência ao comportamento oscilatório para as concentrações de células e de glicose;
- é capaz de predizer o comportamento oscilatório da concentração de etanol, no entanto com padrão diferente do experimental em termos de períodos e amplitude.

6.1.1.4 MHCN alimentado com variáveis experimentais (E_{Exp}) e híbridas (X_{Hyb} e G_{Hyb}) - Teste 5

Com a presente condição, a rede neuronal MPL.51 será alimentada pelos valores experimentais interpolados da concentração de etanol (E_{Exp}) e pelos valores híbridos das concentrações de célula e de glicose (X_{Hyb} e G_{Hyb}) simuladas pelo modelo MHCN.

6.6.1.4.1 Análise estatística das simulações (FC05 – FC07)

Nas Tabelas 6.10 a 6.12 estão relacionados os critérios estatísticos referentes à regressão linear da curva resposta dos gráficos dos valores simulados pelo modelo (preditos) versus os valores experimentais interpolados (observados) relativos às concentrações de etanol, células e glicose, respectivamente.

Tabela 6.10 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de etanol – Teste 5

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC05	0,3802	281,5674	0,5600	42,0000
FC06	0,8519	49,7169	0,9300	-0,9900
FC07	0,0092	352.452,1	4,2000	140,0000

Tabela 6.11 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de células – Teste 5

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC05	0,0054	0,9264	0,1200	1,6000
FC06	0,7917	0,1105	0,8000	0,0440
FC07	0,0158	113,7185	-2,5000	11,0000

Tabela 6.12 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de glicose – Teste 5

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC05	0,0636	5.592,5866	0,3100	40,0000
FC06	0,4013	1.710,4712	0,6600	50,0000
FC07	0,0411	9.623,42	0,2800	0,3700

Analisando as Tabelas 6.10, 6.11 e 6.12, sem os dados experimentais das concentrações de células e de glicose, pode-se verificar que o R^2 só tem valor satisfatório para as concentrações de etanol e de células na FC06, no entanto o valor de MSE para a concentração

de etanol muito alto. Desta forma, há indicativo de capacidade preditiva satisfatório do MHCN somente na FC06 para concentração de células.

6.6.1.4.2 Fermentação contínua 05 (FC05)

A Figura 6.10 encerra os resultados das simulações para a FC05.

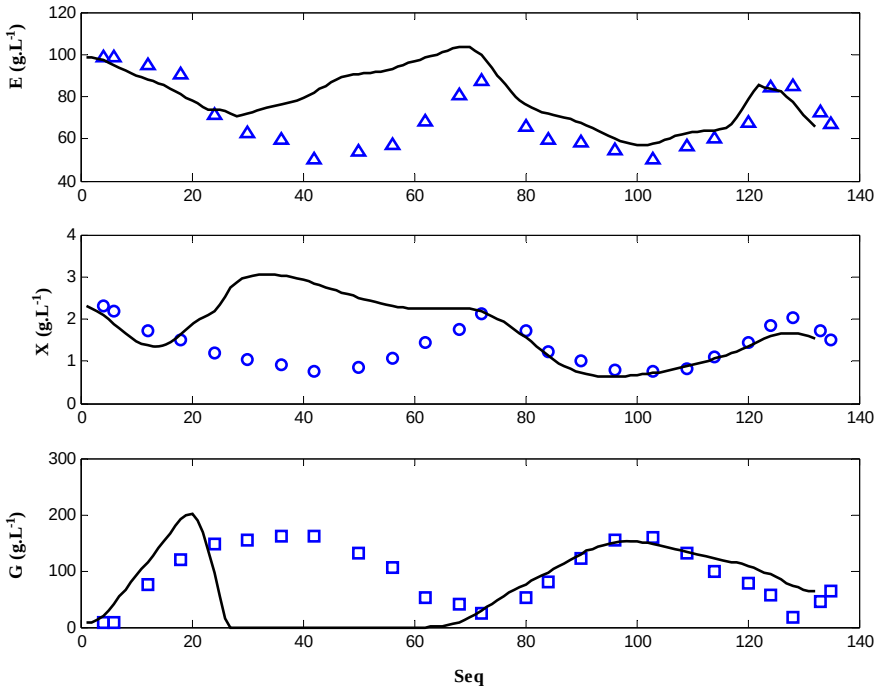


Figura 6.10 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Hyb} e G_{Hyb} para a FC05 – Teste 5. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

Analisando os critérios estatísticos dispostos nas Tabelas 6.10, 6.11 e 6.12 e a Figura 6.10, nota-se a falta de capacidade de predição do MHCN para a FC05, na ausência da medição para concentração de células e de glicose, não reproduzindo os valores experimentais, mas apresentou capacidade na predição da tendência ao comportamento oscilatório, no entanto com períodos e amplitudes diferentes em relação ao comportamento experimental.

6.1.1.4.3 Fermentação contínua 06 (FC06)

Na Figura 6.11 são apresentadas as simulações para a FC06.

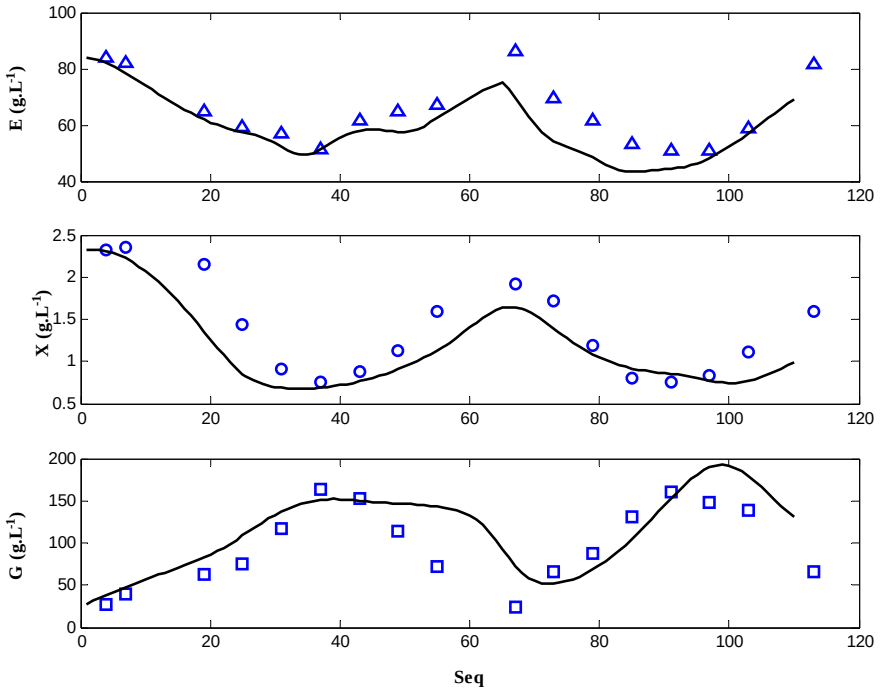


Figura 6.11 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Hyb} e G_{Hyb} para a FC06 – Teste 5. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

A Figura 6.11 mostra as simulações para toda a FC06.

Apreciando os critérios estatísticos das Tabelas 6.10, 6.11 e 6.12 e a Figura 6.11, verifica-se para a FC06, na ausência das medições para as concentrações de células e de glicose, que o MHCN:

- possui capacidade para predizer somente a tendência ao comportamento oscilatório para as concentrações de etanol e de células;

- é capaz de predizer a tendência ao comportamento oscilatório da concentração de glicose, porém com padrão diferente do experimental em termos de períodos e amplitude.

6.1.1.4.4 Fermentação contínua 07 (FC07)

Na Figura 6.12 são apresentadas as respostas do MHCN para a FC07.

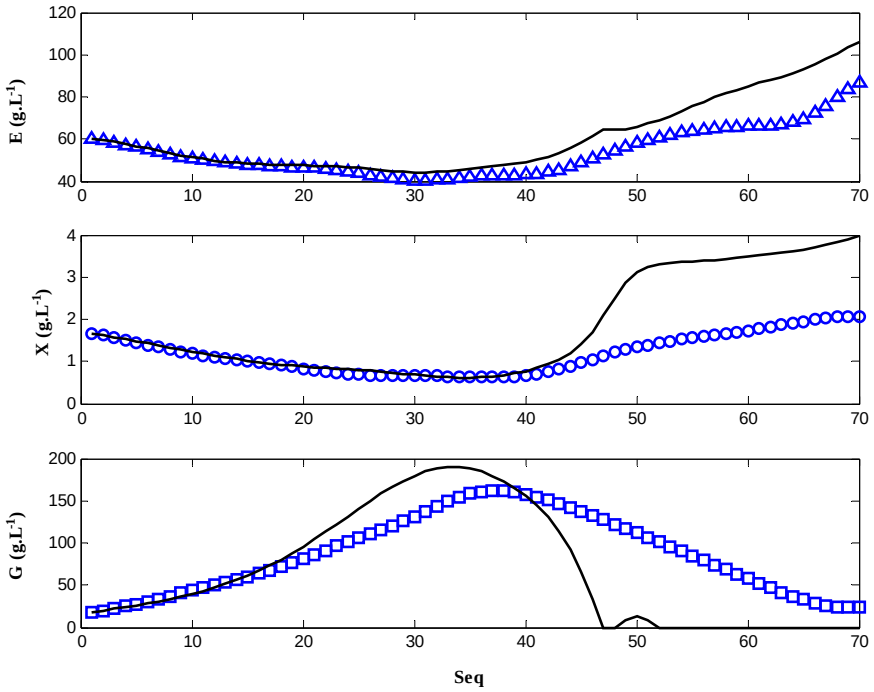


Figura 6.12 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Hyb} e G_{Hyb} para a FC07 – Teste 5. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais interpolados versus sequência de dados simulada até o ponto nº 70, referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

A Figura 6.12 mostra as simulações para FC07 somente até o ponto nº 70 da sequência de dados, pois para a fase seguinte das simulações a resposta do MHCN apresenta grande afastamento em relação aos dados medidos.

Verificando os critérios estatísticos dispostos nas Tabelas 6.10, 6.11 e 6.12 e a Figura 6.12, observa-se a falta de capacidade de predição do MHCN para a FC07, na ausência das medições para as concentrações de células e de glicose.

6.1.1.5 MHCN alimentado com variáveis experimentais (X_{Exp}) e híbridas (E_{Hyb} e G_{Hyb}) -Teste 6

No Teste 6, a rede neuronal MPL.51 será alimentada pelos valores experimentais interpolados da concentração de células (X_{Exp}) e pelos valores híbridos das concentrações de etanol e de glicose (E_{Hyb} e G_{Hyb}) simuladas pelo MHCN.

6.1.1.5.1 Análise estatística das simulações (FC05 – FC07)

Nas Tabelas 6.13 a 6.15 estão relacionados os critérios estatísticos referentes à regressão linear da curva resposta dos gráficos dos valores simulados pelo modelo (preditos) versus os valores experimentais interpolados (observados) relativos às concentrações de etanol, células e glicose, respectivamente.

Tabela 6.13 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de etanol – Teste 6

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC05	0,8093	108,6021	0,7700	7,7000
FC06	0,5405	112,2809	0,7400	9,3000
FC07	0,0110	1.475.881,71	10,0000	9,4000

Tabela 6.14 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de células – Teste 6

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC05	0,8617	0,0699	0,8300	0,0180
FC06	0,9128	0,07604	0,9900	0,2200
FC07	0,0028	602,1382	-3,2000	11,0000

Tabela 6.15 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de glicose – Teste 6

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC05	0,4544	1.803,7311	0,4700	73,0000
FC06	0,6295	941,4690	0,7500	39,0000
FC07	0,0168	1.606.837,32	3,1000	580,0000

Analisando as Tabelas 6.13, 6.14 e 6.15, sem as medições de concentração de etanol e de glicose, pode-se verificar que os valores satisfatórios para R^2 estão presentes somente na FC05 para as concentrações de etanol e de células e na FC06 para a concentração de células.

Entretanto o MSE da concentração de etanol na FC06 é muito alto. Logo, o indício é que somente para a concentração de células nas FC05 e 06 o MHNC prediga adequadamente.

6.1.1.5.2 Fermentação contínua 05 (FC05)

A Figura 6.13 encerra os resultados das simulações para a FC05.

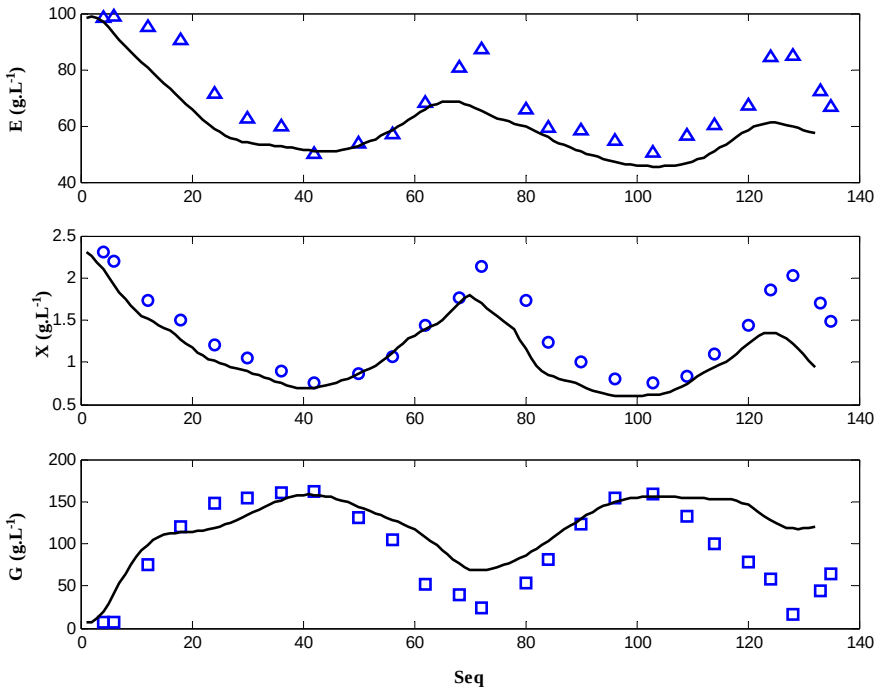


Figura 6.13 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Exp} e G_{Hyb} para a FC05 – Teste 6. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

Com base nos critérios estatísticos dispostos nas Tabelas 6.13, 6.14 e 6.15 e no perfil da Figura 6.13, observa-se para a FC05, na ausência das medições para as concentrações de etanol e de glicose, que o MHCN:

- exibe capacidade para predizer a tendência ao comportamento oscilatório para a concentração de células;

- é capaz de predizer a tendência ao comportamento oscilatório das concentrações de etanol e de glicose, entretanto com padrão distinto do experimental em termos de períodos e amplitude.

6.1.1.5.3 Fermentação contínua 06 (FC06)

Na Figura 6.14 são apresentadas as simulações para a FC06

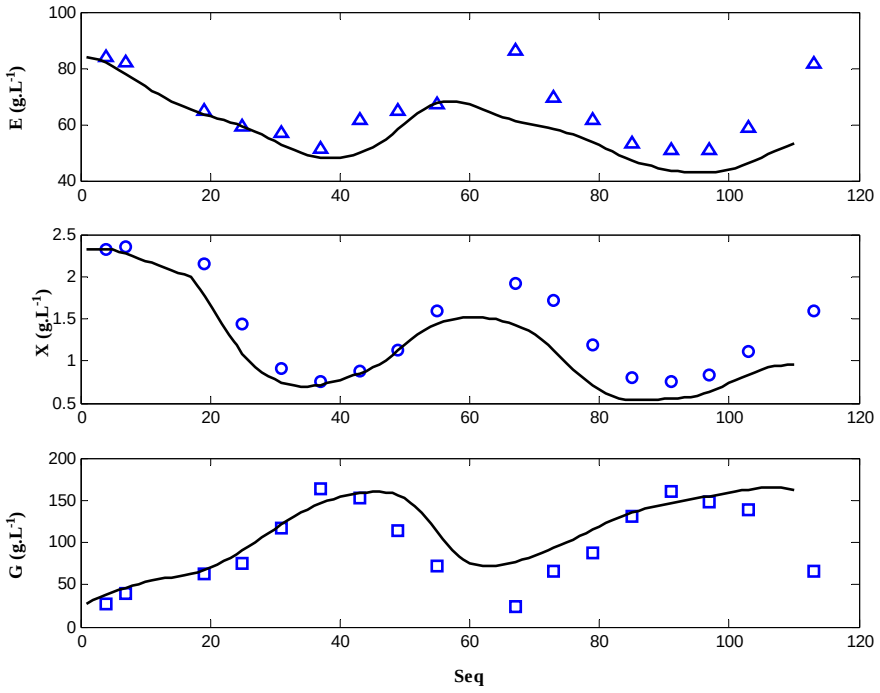


Figura 6.14 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Exp} e G_{Hyb} para a FC06 – Teste 6. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

Visualizando os critérios estatísticos dispostos nas Tabelas 6.13, 6.14 e 6.15 e o perfil da Figura 6.14, verifica-se para a FC06, na ausência das medições para as concentrações de etanol e de glicose, que o MHCN:

- exibe capacidade para predizer a tendência ao comportamento oscilatório para a concentração e de células;
- é capaz de predizer o comportamento oscilatório das concentrações de etanol e de glicose, porém com padrão diferente do experimental em termos de períodos e amplitude.

6.1.1.5.4 Fermentação contínua 07 (FC07)

Na Figura 6.15 são apresentadas as respostas do MHCN para a FC07.

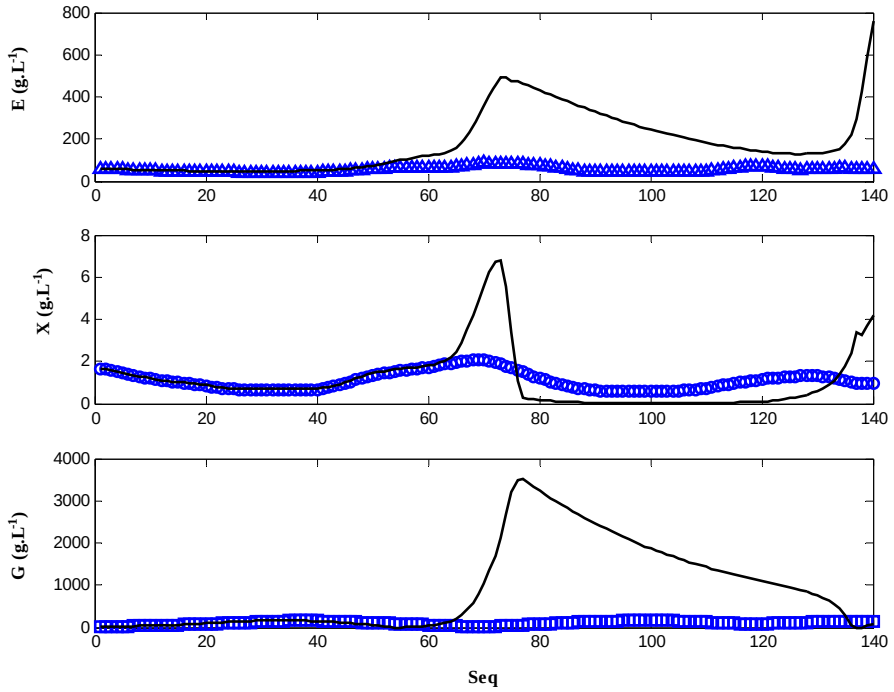


Figura 6.15 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Exp} e G_{Hyb} para a FC07 – Teste 6. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais interpolados versus sequência de dados simulada até o ponto nº 140, referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

A Figura 6.15 mostra as simulações para FC07 somente até o ponto nº 140 da sequência de dados, pois para a fase seguinte das simulações a resposta do MHCN apresenta grande afastamento em relação aos dados medidos.

Dos critérios estatísticos dispostos nas Tabelas 6.13, 6.14 e 6.15 e da Figura 6.15, verifica-se a falta de capacidade de predição do MHCN para a FC07, na ausência das medições para as concentrações de etanol e de glicose, não reproduzindo os valores experimentais e nem a tendência ao comportamento oscilatório.

6.1.1.6 MHCN realimentado com variáveis experimentais (G_{Exp}) e híbridas (E_{Hyb} e X_{Hyb}) - Teste 7

No Teste 7, a rede neuronal MPL.51 será alimentada pelos valores experimentais interpolados da concentração de glicose (G_{Exp}) e pelos valores híbridos das concentrações de etanol e de células (E_{Hyb} e X_{Hyb}) simuladas pelo MHCN.

6.1.1.6.1 Análise estatística das simulações (FC05 – FC07)

Nas Tabelas 6.16 a 6.18 estão relacionados os critérios estatísticos referentes à regressão linear da curva resposta dos gráficos dos valores simulados pelo modelo (preditos) versus os valores experimentais interpolados (observados) relativos às concentrações de etanol, células e glicose, respectivamente.

Tabela 6.16 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de etanol – Teste 7

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC05	0,0005	477,8681	0,0250	62,0000
FC06	0,0014	348,4866	-0,0520	72,0000
FC07	0,1308	292,9949	-0,3000	74,0000

Tabela 6.17 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de células – Teste 7

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC05	0,0020	0,4171	0,047	1,1000
FC06	0,2175	0,3046	0,4800	0,7500
FC07	0,0095	0,2523	0,0840	0,9400

Tabela 6.18 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de glicose – Teste 7

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC05	0,87423	423,1476	0,9800	-6,7000
FC06	0,55354	1.112,06	0,6300	20,0000
FC07	0,97891	39,6034	1,000	-1,9000

Analisando as Tabelas 6.16, 6.17 e 6.18, verifica-se que os R^2 inerentes à concentração de glicose só possuem valores bons e muito bons somente nas FC05 e 07. Não obstane, o MSE na FC05 é muito alto e alto na FC07. Desta forma, não há indício de bom ajuste da curva simulada pelo MHNC.

6.1.1.6.2 Fermentação contínua 05 (FC05)

A Figura 6.16 encerra os resultados das simulações para a FC05.

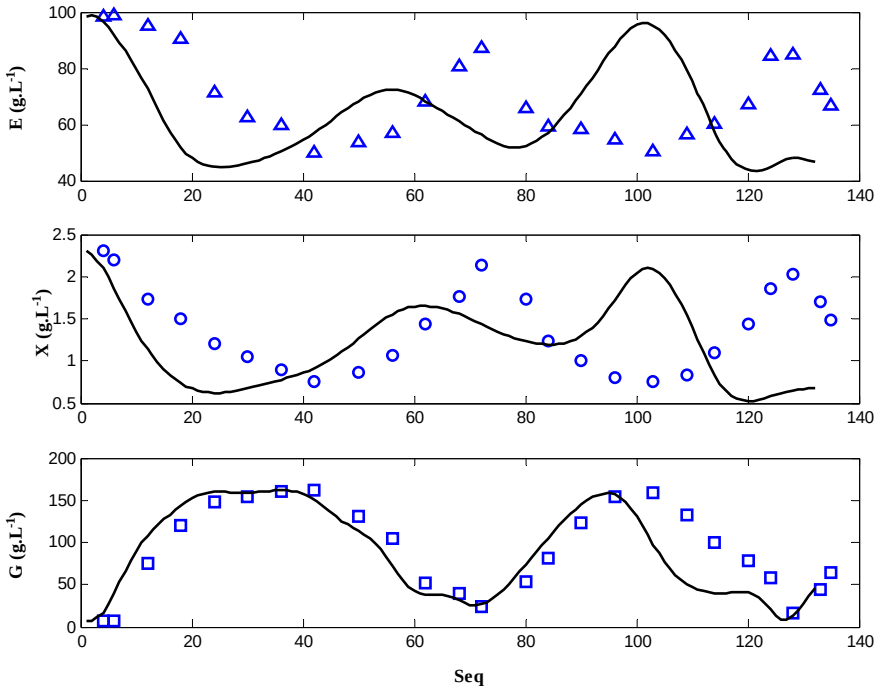


Figura 6.16 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Hyb} e G_{Exp} para a FC05 – Teste 7. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

Visualizando os critérios estatísticos dispostos nas Tabelas 6.16, 6.17 e 6.18 e o perfil da Figura 6.16, tem-se para a FC05, na ausência das medições para as concentrações etanol e de células, que o MHCN:

- exibe capacidade para predizer somente a tendência ao comportamento oscilatório para a concentração de glicose;
- é capaz de predizer o comportamento oscilatório das concentrações de etanol e de células, no entanto com padrão diferente do experimental em termos de períodos e amplitude.

6.6.1.6.3 Fermentação contínua 06 (FC06)

Na Figura 6.17 são apresentadas as simulações para a FC06.

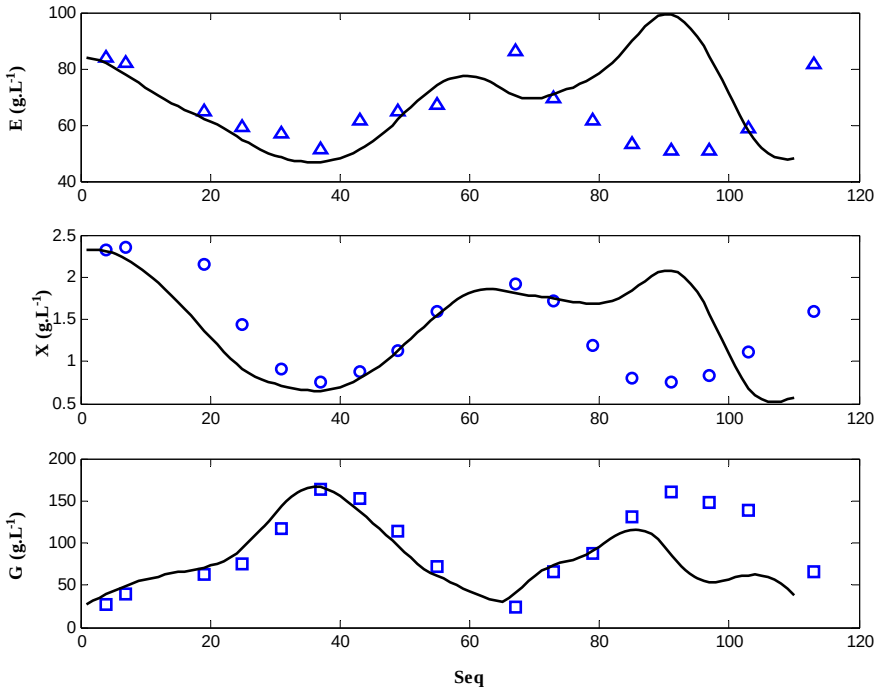


Figura 6.17 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Hyb} e G_{Exp} para a FC06 – Teste 7. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

Com as Tabelas 6.16, 6.17 e 6.18 e a Figura 6.17, observa-se a falta de capacidade de predição do MHCN para a FC06, na ausência das medições para as concentrações de etanol e de células, não reproduzindo os valores experimentais, mas com capacidade de predizer a tendência ao comportamento oscilatório com padrão diferente do experimental em termos de períodos e amplitude.

6.6.1.6.4 Fermentação contínua 07 (FC07)

Na Figura 6.18 são apresentadas as respostas do MHCN para a FC07.

Apreciando os critérios estatísticos das Tabelas 6.16, 6.17 e 6.18 e a Figura 6.18, constata-se para a FC07, na ausência das medições para as concentrações de etanol e de células, que o MHCN:

- possui capacidade para predizer somente a tendência ao comportamento oscilatório para a concentração de glicose;

- é capaz de predizer a tendência ao comportamento oscilatório das concentrações de etanol e de células com padrões de períodos e amplitudes diferentes do experimental.

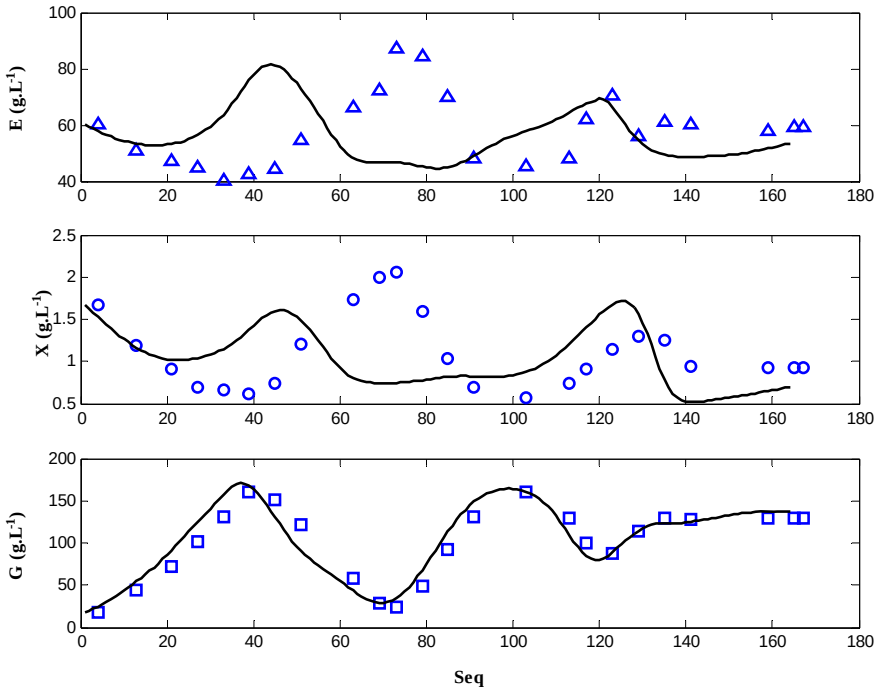


Figura 6.18 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Hyb} e G_{Exp} para a FC07 – Teste 7. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

6.1.2 MHCN alimentado no caso de ausência completa de medições

Havendo ausência completa de medições, poder-se-ia perscrutar a capacidade do MHCN em predizê-las. Assim, neste teste 8, a realimentação será composta exclusivamente pelas variáveis calculadas no próprio modelo, como descrito abaixo.

6.1.2.1 MHCN alimentado com variáveis híbridas (E_{Hyb}, X_{Hyb} e G_{Hyb}) - Teste 8

Nesta sistemática de realimentação do MHCN, a rede neuronal MPL.51 - cuja arquitetura fora descrita nas Tabelas 3.6 e 3.7 da sessão 3.5.1 do Capítulo 3, será alimentada pelos valores híbridos das concentrações de etanol, de células e de glicose (E_{Hyb}, X_{Hyb}, G_{Hyb}), simuladas pelo modelo híbrido explicitando estas concentrações na condição um passo à frente (k+1) nas Equações (4.29), (4.30) e (4.31) definidas no Capítulo 4.

O objetivo específico deste teste foi verificar a capacidade do MHCN em prever a condição de oscilações na ausência absoluta de medições das FC05, 06 e 07.

Aos mesmos moldes do já apresentado para os Testes de 2 a 7, as respostas do MHCN para o Teste 8, serão analisadas pelos critérios estatísticos definidos na sessão 3.8 do Capítulo 3, distribuídos em três tabelas para cada teste. Cada tabela conterá os critérios estatísticos para uma das variáveis de estado.

Assim, empregando a mesma sistemática adotada para o Teste 1, as respostas do MHCN no Teste 8, serão analisadas pelos critérios estatísticos constantes nas tabelas a seguir, associadas aos gráficos de comparação das respostas simuladas pelo modelo com os dados experimentais, os quais estão dispostos nos itens subsequentes. Desta forma, os dados das tabelas serão discutidos juntamente com a análise dos gráficos para cada fermentação contínua em cada teste. Tratando-se de repetição de metodologia já discutida detalhadamente no Teste 1 e, dado a finalidade desta avaliação, a discussão será conduzida de forma qualitativa.

6.1.2.1.1 Análise estatística das simulações (FC05 – FC07)

Nas Tabelas 6.19 a 6.21 estão relacionados os critérios estatísticos referentes à regressão linear da curva resposta dos gráficos dos valores simulados pelo modelo (preditos) versus os valores experimentais interpolados (observados) relativos às concentrações de etanol, células e glicose, respectivamente.

Tabela 6.19 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de etanol – Teste 8

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC05	0,0050	1.284,5020	-0,1400	93,0000
FC06	0,2462	97,1314	0,4300	37,0000
FC07	0,0506	844,1099	-0,4800	81,0000

Tabela 6.20 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de células – Teste 8

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC05	0,0323	0,4136	0,2200	1,0000
FC06	0,5037	0,1410	0,5900	0,5500
FC07	0,0044	0,5445	0,1000	1,2000

Tabela 6.21 – Parâmetros estatísticos para avaliar a capacidade preditiva do MHCN para a variável de concentração de glicose – Teste 8

Fermentação FC	Coeficiente de determinação (R^2)	Erro quadrático médio (MSE)	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)
FC05	0,0154	6.567,4272	0,1700	81,0000
FC06	0,5030	980,2690	0,5700	36,0000
FC07	0,0198	5.851,3394	0,2200	57,0000

Analisando as Tabelas 6.19, 6.20 e 6.21, observa-se que os valores de R^2 e dos coeficientes angulares são ruins para todas as variáveis de concentração. O MSE só é relativamente baixo para a concentração celular, sendo muito alto para as outras duas concentrações. O coeficiente liner é muito alto para as concentrações de etanol e de glicose, sendo normalmente alto para a concentração de células. Assim, o indicativo é da ausência de capacidade de predição para o MHCN.

6.6.2.1.2 Fermentação contínua 05 (FC05)

A Figura 6.19 encerra os resultados das simulações para a FC05.

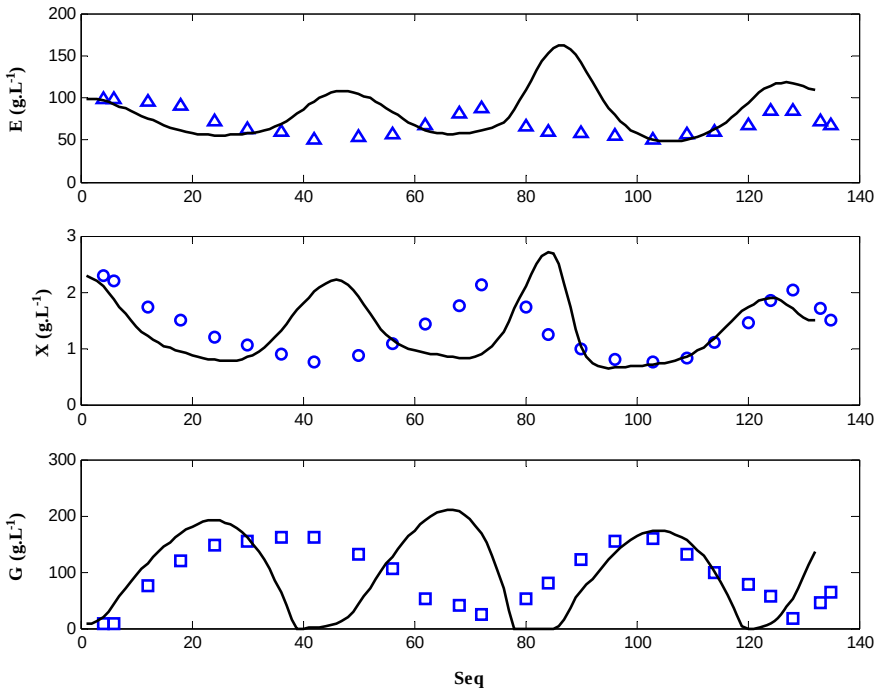


Figura 6.19 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Hyb} e G_{Hyb} para a FC05 – Teste 8. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

Verificando os critérios estatísticos dispostos nas Tabelas 6.19, 6.20 e 6.21 e a Figura 6.19, verifica-se que o MHCN para a FC05, na ausência das medições para as concentrações de etanol, de células e de glicose, prevê o comportamento oscilatório, porém em padrão diferente do experimental em termos de períodos e amplitude.

6.1.2.1.3 Fermentação contínua 06 (FC06)

Na Figura 6.20 são apresentadas as simulações para a FC06.

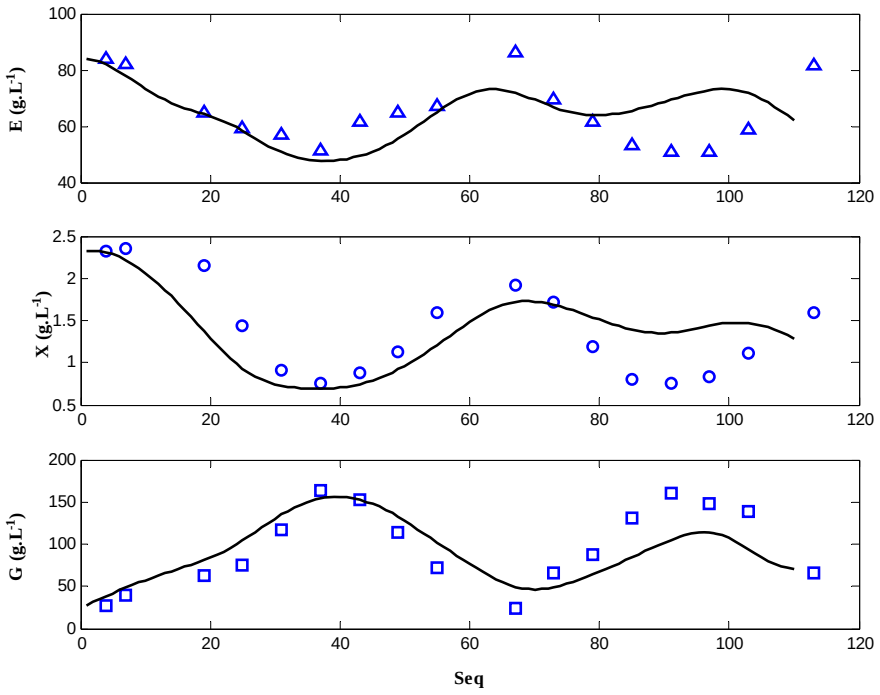


Figura 6.20 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Hyb} e G_{Hyb} para a FC06 – Teste 8. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

Apreciando os critérios estatísticos das Tabelas 6.19, 6.20 e 6.21 e a Figura 6.20, constata-se para a FC06, na ausência das medições para as concentrações de etanol, de células e de glicose, que o MHCN prevê o comportamento oscilatório, todavia com períodos e amplitudes distintas do padrão experimental.

6.1.2.1.4 Fermentação contínua 07 (FC07)

Na Figura 6.21 são apresentadas as respostas do MHCN para a FC07.

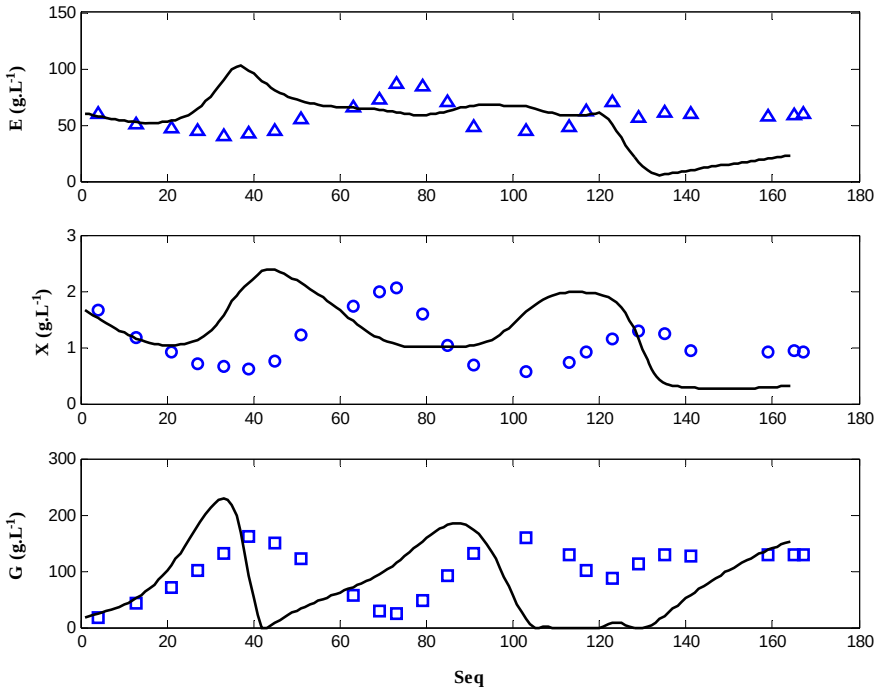


Figura 6.21– Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Hyb}, X_{Hyb} e G_{Hyb} para a FC07 – Teste 8. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

Partindo dos critérios estatísticos dispostos nas Tabelas 6.19, 6.20 e 6.21 e da Figura 6.21, nota-se a capacidade do MHCN em reproduzir o comportamento oscilatório da a FC07, na ausência das medições para as concentrações de etanol, de células e de glicose, muito embora apresente períodos e amplitudes diferentes do experimental.

6.1.3 Comparação dos testes de alimentação do MHCN para cada variável de estado

Para analisar a influência da disponibilidade de medições das variáveis de estado na resposta do MHCN, serão elaboradas tabelas contendo os coeficientes de determinação relativos a cada teste para cada variável. A influência das medições será avaliada no decorrer de toda a fermentação e também considerando somente os 10 e os 20 primeiros pontos da sequência de dados.

A comparação será em relação à condição de realimentação quando há a disponibilidade das três medições, ou seja, medições para as concentrações de etanol, de células e de glicose. Assim, as comparações seguirão a seguinte sistemática quanto ao número de medições disponíveis:

(1) Grupo 1 - com as todas as 3 medições;

(2) Grupo 2 – ausência de 1 medição;

(3) Grupo 3 - ausência de 2 medições;

(4) Grupo 4 - ausência de todas as medições.

6.1.3.1 Comparação dos testes de alimentação do MHCN para cada variável de estado para toda a sequência de dados de cada fermentação

Nesta sessão será verificada a influência da disponibilidade de medição ao longo de toda as fermentações. Para tanto, nas Tabelas 6.22, 6.23 e 6.24 estão dispostos os coeficientes de determinação para as concentrações de etanol, de células e de glicose, respectivamente.

Tabela 6.22 –Coeficiente de determinação (R^2) obtidos para cada teste de alimentação do MHCN para a variável de concentração de etanol dentro de cada fermentação contínua, para toda a sequência de dados – Testes de 1 a 8

FC	TESTE							
	Grupo 1	Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4
	1	2	3	4	5	6	7	8
	$(E, X, G)_{Exp}$	$(E, X)_{Exp}$, $(G)_{Hyb}$	$(E, G)_{Exp}$, $(X)_{Hyb}$	$(X, G)_{Exp}$, $(E)_{Hyb}$	$(E)_{Exp}$, $(X, G)_{Hyb}$	$(X)_{Exp}$, $(E, G)_{Hyb}$	$(G)_{Exp}$, $(E, X)_{Hyb}$	$(E, X, G)_{Hyb}$
FC05	0,9866	0,9793	0,9502	0,8378	0,3802	0,8093	0,0005	0,0050
FC06	0,8690	0,8196	0,9231	0,6395	0,8519	0,5405	0,0014	0,2462
FC07	0,9247	0,1377	0,9608	0,3059	0,0092	0,0110	0,1308	0,0506

Analisando os valores de R^2 referentes à concentração de etanol da Tabela 6.22 verifica-se que:

- para a FC05 são muito baixos nos Testes 5, 7 e 8, quando a ausência da medida da concentração celular está associada às variáveis híbridas da concentração de glicose e de etanol, respectivamente. Também é muito baixa no Teste 8;

- na FC06 são muito baixos nos Testes 7 e 8 e baixo no Teste 6, onde a falta da variável experimental da concentração de etanol está associada às variáveis híbridas das outras concentrações;

- na FC07 são muito baixos nos Testes 2, 4, 5, 6, 7 e 8.

Assim, com base nas observações acima, os valores muito baixos de R^2 destacados acima, são indícios da falta de capacidade de predição do MHCN para a concentração de etanol.

Tabela 6.23 –Coeficiente de determinação (R^2) obtidos para cada teste de realimentação do MHCN para a variável de concentração de células dentro de cada fermentação contínua, para toda a sequência de dados – Testes de 1 a 8

FC	TESTE							
	Grupo 1	Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4
	1	2	3	4	5	6	7	8
	$(E, X, G)_{Exp}$	$(E, X)_{Exp}$, $(G)_{Hyb}$	$(E, G)_{Exp}$, $(X)_{Hyb}$	$(X, G)_{Exp}$, $(E)_{Hyb}$	$(E)_{Exp}$, $(X, G)_{Hyb}$	$(X)_{Exp}$, $(E, G)_{Hyb}$	$(G)_{Exp}$, $(E, X)_{Hyb}$	$(E, X, G)_{Hyb}$
FC05	0,9972	0,9754	0,9460	0,9813	0,0054	0,8617	0,0020	0,0323
FC06	0,9825	0,9616	0,7751	0,9906	0,7917	0,9128	0,2175	0,5037
FC07	0,9543	0,1588	0,8323	0,8830	0,0158	0,0028	0,0095	0,0044

Na Tabela 6.23 os valores de R^2 para a concentração de células:

- são muito baixos para os Testes 5, 7 e 8 na FC05, situação na qual ausência da variável medida da concentração celular está associada aos valores híbridos das outras variáveis;

- é muito baixo para o Teste 7 e baixo para os Testes 3, 5 e 8 na FC06;

- são muito baixos na FC07 quando dos Testes 2, 5, 6, 7 e 8;

Desta forma, há indício da perda da capacidade preditiva do MHCN para a concentração de células nos testes onde constam valores muito baixos de R^2.

Tabela 6.24 –Coeficiente de determinação (R^2) obtidos para cada teste de realimentação do MHCN para a variável de concentração de glicose dentro de cada fermentação contínua, para toda a sequência de dados – Testes de 1 a 8

FC	TESTE							
	Grupo 1	Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4
	1	2	3	4	5	6	7	8
	$(E, X, G)_{Exp}$	$(E, X)_{Exp}$, $(G)_{Hyb}$	$(E, G)_{Exp}$, $(X)_{Hyb}$	$(X, G)_{Exp}$, $(E)_{Hyb}$	$(E)_{Exp}$, $(X, G)_{Hyb}$	$(X)_{Exp}$, $(E, G)_{Hyb}$	$(G)_{Exp}$, $(E, X)_{Hyb}$	$(E, X, G)_{Hyb}$
FC05	0,9970	0,7593	0,9938	0,9938	0,0636	0,4544	0,87423	0,0154
FC06	0,9859	0,7453	0,9813	0,9910	0,4013	0,6295	0,55354	0,5030
FC07	0,9510	0,1203	0,9928	0,9458	0,0411	0,0168	0,97891	0,0198

Na Tabela 6.24 os valores de R^2 para a concentração de glicose:

- são muito baixos para os Testes 5, 6 e 8 na FC05, situação na qual a ausência da variável medida da concentração de glicose está correlacionada ao valor híbrido de outra variável;

- é muito baixo para o Teste 5 e baixo para os Testes 2, 6 e 8 na FC06, na condição de ausência da variável concentração de glicose e de outras variáveis experimentais. Todavia,

também é baixo no Teste 7 onde o valor experimental da concentração de glicose está presente;

- são muito baixos na FC07 nos Testes 2, 5, 6 e 8, quando há a ausência da medição para glicose.

Desta forma, há indicativo da perda da capacidade preditiva do MHCN para a concentração de glicose nos testes onde constam valores muito baixos de R^2.

Quando as medições são substituídas pelas variáveis híbridas os valores de R^2 decaem da seguinte forma comparando os grupos: grupo com 3 medições > grupo com 2 medições > grupo com 1 medição > grupo sem medições. O menor valor para R^2 é observado na FC05 do Teste 7 para concentração de etanol.

6.1.3.2 Comparação dos testes de realimentação do MHCN para cada variável de estado até o ponto nº 20 da sequência de dados de cada fermentação

Na presente sessão será verificada a influência da disponibilidade de medição ao longo dos 20 primeiros pontos da sequência dados. Para tanto, as Tabelas 6.25, 6.26 e 6.27 estão dispostos os coeficientes de determinação para as concentrações de etanol, de células e de glicose, respectivamente.

Tabela 6.25 – Coeficiente de determinação (R^2) obtidos para cada teste de realimentação do MHCN para a variável de concentração de etanol dentro de cada fermentação contínua, até o ponto nº 20 da sequência de dados – Testes de 1 a 8

FC	TESTE							
	Grupo 1	Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4
	1	2	3	4	5	6	7	8
	$(E, X, G)_{Exp}$	$(E, X)_{Exp}$, $(G)_{Hyb}$	$(E, G)_{Exp}$, $(X)_{Hyb}$	$(X, G)_{Exp}$, $(E)_{Hyb}$	$(E)_{Exp}$, $(X, G)_{Hyb}$	$(X)_{Exp}$, $(E, G)_{Hyb}$	$(G)_{Exp}$, $(E, X)_{Hyb}$	$(E, X, G)_{Hyb}$
FC05	0,9777	0,9759	0,9667	0,7527	0,8656	0,8261	0,8416	0,8149
FC06	0,9994	0,9992	0,9996	0,9932	0,9994	0,9904	0,9958	0,9857
FC07	0,9992	0,9990	0,9994	0,9896	0,9992	0,9870	0,9813	0,9761

Na Tabela 6.25 os coeficentes de determinação possuem valores de bons a excelentes. Portanto, é grande a probabilidade de boa capacidade preditiva do MHCN para a concentração de etanol quando simuladas para 20 pontos da sequência de dados.

Tabela 6.26 – Coeficiente de determinação (R^2) obtidos para cada teste de realimentação do MHCN para a variável de concentração de células dentro de cada fermentação contínua, até o ponto nº 20 da sequência de dados – Testes de 1 a 8

FC	TESTE							
	Grupo 1	Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4
	1	2	3	4	5	6	7	8
	$(E, X, G)_{Exp}$	$(E, X)_{Exp}$, $(G)_{Hyb}$	$(E, G)_{Exp}$, $(X)_{Hyb}$	$(X, G)_{Exp}$, $(E)_{Hyb}$	$(E)_{Exp}$, $(X, G)_{Hyb}$	$(X)_{Exp}$, $(E, G)_{Hyb}$	$(G)_{Exp}$, $(E, X)_{Hyb}$	$(E, X, G)_{Hyb}$
FC05	0,9980	0,9982	0,9612	0,9970	0,5676	0,9988	0,9880	0,9868
FC06	0,9618	0,9629	0,8748	0,9596	0,8800	0,9602	0,8668	0,8656
FC07	0,9990	0,9990	0,9934	0,9990	0,9948	0,9990	0,9958	0,9930

Observando os valores de R^2 na Tabela 6.26, verificam-se indícios da boa capacidade preditiva do MHCN para a concentração de células para simulações em 20 pontos da sequência de dados, posto que os valores em questão variam de bons a excelentes.

Tabela 6.27 – Coeficiente de determinação (R^2) obtidos para cada teste de realimentação do MHCN para a variável de concentração de glicose dentro de cada fermentação contínua, até o ponto nº 20 da sequência de dados – Testes de 1 a 8

FC	TESTE							
	Grupo 1	Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4
	1	2	3	4	5	6	7	8
	$(E, X, G)_{Exp}$	$(E, X)_{Exp}$, $(G)_{Hyb}$	$(E, G)_{Exp}$, $(X)_{Hyb}$	$(X, G)_{Exp}$, $(E)_{Hyb}$	$(E)_{Exp}$, $(X, G)_{Hyb}$	$(X)_{Exp}$, $(E, G)_{Hyb}$	$(G)_{Exp}$, $(E, X)_{Hyb}$	$(E, X, G)_{Hyb}$
FC05	0,9996	0,9992	0,9982	0,9984	0,9765	0,9748	0,9996	0,9958
FC06	0,9958	0,9803	0,9906	0,9968	0,9393	0,9855	0,9918	0,9518
FC07	0,9986	0,9746	0,9988	0,9990	0,9759	0,9785	0,9992	0,9732

Analogamente ao observado para as concentrações de etanol e de células, o indicativo da capacidade de predição do MHCN para a concentração de glicose nas simulações em 20 pontos da sequência de dados é corroborada pelos valores excelentes ou muito bons do coeficiente de determinação, vide Tabela 6.27.

6.1.3.3 Comparação dos testes de realimentação do MHCN para cada variável de estado até o ponto nº 10 da sequência de dados de cada fermentação

Neste item será verificada a influência da disponibilidade de medição ao longo dos 10 primeiros pontos da sequência dados. Para tanto, as Tabelas 6.28, 6.29 e 6.30 estão dispostos os coeficientes de determinação para as concentrações de etanol, de células e de glicose, respectivamente.

Tabela 6.28 – Coeficiente de determinação (R^2) obtidos para cada teste de realimentação do MHCN para a variável de concentração de etanol dentro de cada fermentação contínua, até o ponto nº 10 da sequência de dados – Testes de 1 a 8

FC	TESTE							
	Grupo 1	Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4
	1 $(E, X, G)_{Exp}$	2 $(E, X)_{Exp}$, $(G)_{Hyb}$	3 $(E, G)_{Exp}$, $(X)_{Hyb}$	4 $(X, G)_{Exp}$, $(E)_{Hyb}$	5 $(E)_{Exp}$, $(X, G)_{Hyb}$	6 $(X)_{Exp}$, $(E, G)_{Hyb}$	7 $(G)_{Exp}$, $(E, X)_{Hyb}$	8 $(E, X, G)_{Hyb}$
FC05	0,9756	0,9815	0,9819	0,9870	0,9835	0,9876	0,9849	0,9866
FC06	0,9996	0,9994	0,9996	0,9992	0,9992	0,9988	0,9990	0,9982
FC07	0,9992	0,9988	0,9994	0,9950	0,9992	0,9972	0,9870	0,9930

Tabela 6.29 – Coeficiente de determinação (R^2) obtidos para cada teste de realimentação do MHCN para a variável de concentração de células dentro de cada fermentação contínua, até o ponto nº 10 da sequência de dados – Testes de 1 a 8

FC	TESTE							
	Grupo 1	Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4
	1 $(E, X, G)_{Exp}$	2 $(E, X)_{Exp}$, $(G)_{Hyb}$	3 $(E, G)_{Exp}$, $(X)_{Hyb}$	4 $(X, G)_{Exp}$, $(E)_{Hyb}$	5 $(E)_{Exp}$, $(X, G)_{Hyb}$	6 $(X)_{Exp}$, $(E, G)_{Hyb}$	7 $(G)_{Exp}$, $(E, X)_{Hyb}$	8 $(E, X, G)_{Hyb}$
FC05	0,9998	1,0000	0,9972	0,9998	0,9976	1,0000	0,9922	0,9944
FC06	0,9497	0,9491	0,9279	0,9489	0,9276	0,9481	0,9279	0,9276
FC07	0,9994	0,9994	0,9994	0,9996	0,9994	0,9996	0,9988	0,9992

Tabela 6.30 – Coeficiente de determinação (R^2) obtidos para cada teste de realimentação do MHCN para a variável de concentração de glicose dentro de cada fermentação contínua, até o ponto nº 10 da sequência de dados – Testes de 1 a 8

FC	TESTE							
	Grupo 1	Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4
	1 $(E, X, G)_{Exp}$	2 $(E, X)_{Exp}$, $(G)_{Hyb}$	3 $(E, G)_{Exp}$, $(X)_{Hyb}$	4 $(X, G)_{Exp}$, $(E)_{Hyb}$	5 $(E)_{Exp}$, $(X, G)_{Hyb}$	6 $(X)_{Exp}$, $(E, G)_{Hyb}$	7 $(G)_{Exp}$, $(E, X)_{Hyb}$	8 $(E, X, G)_{Hyb}$
FC05	0,9986	0,9964	0,9986	0,9986	0,9978	0,9960	0,9988	0,9980
FC06	0,9992	0,9976	0,9974	0,9992	0,9910	0,9974	0,9972	0,9900
FC11	0,9736	0,9892	0,9872	0,9569	0,9819	0,9866	0,9643	0,9761

Estudando os valores de R^2 para a simulação do MHCN nos 10 primeios pontos da sequência de dados nas Tabelas 6.28, 6.29 e 6.30, verifica-se que são excelentes. Neste caso, os valores de R^2 para as simulações nos 10 primeiros pontos das sequência de dados são um pouco melhores em comparação com os obtidos para as simulações nos 20 primeiros pontos.

Logo, é razoável presumir a boa capacidade de predição do MHCN para as concentrações de etanol, de células e de glicose para 10 pontos simulados na sequência de dados.

Portanto, os bons resultados obtidos para as simulações em janelas de 20 e 10 pontos da sequência de dados são indicativos da possibilidade de uso do MHCN para predição em janelas menores do processo fermentativo. Assim, sendo o intervalo de tempo dos dados de 0,5 h, o MHCN possui capacidade de simulações até 10 h de processo com boa capacidade de predição, sem a necessidade de inserção da correção do erro de predição.

6.1.3.4 Comparação da capacidade preditiva do MHCN para cada FC nos teste de substituição das variáveis medidas (experimentais) pelas variáveis simuladas na alimentação da RNA MLP.51 do MHCN

A Tabela 6.31 sintetiza a metodologia empregada para analisar a resposta do MHCN do Teste 1 em relação aos dados medidos, descritas e discutidas nas sessões 5.3.1.5, 5.3.1.6 e D.1.2. As simulações analisadas nesta tabela foram realizadas em toda a extensão da sequência de dados relativos a etapa operada em modo contínuo sem adição de etanol.

Tabela 6.31 – Comparação da capacidade preditiva do MHCN para cada FC nos teste de substituição das variáveis medidas (experimentais) pelas variáveis simuladas na alimentação da RNA MLP.51 do MHCN

FC	Var	TESTES POR GRUPO							
		Grupo 1	Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4
		1 $(E, X, G)_{Exp}$	2 $(E, X)_{Exp}$, $(G)_{Hyb}$	3 $(E, G)_{Exp}$, $(X)_{Hyb}$	4 $(X, G)_{Exp}$, $(E)_{Hyb}$	5 $(E)_{Exp}$, $(X, G)_{Hyb}$	6 $(X)_{Exp}$, $(E, G)_{Hyb}$	7 $(G)_{Exp}$, $(E, X)_{Hyb}$	8 $(E, X, G)_{Hyb}$
	E	2	1	1	1	1	1	1	1
FC05	X	2	1	1	2	1	1	1	1
	G	2	1	1	1	1	1	1	1
	E	1	1	1	1	1	1	1	1
FC06	X	2	1	1	2	1	1	1	1
	G	1	1	1	1	1	0	1	1
	E	1	0	2	1	0	0	1	1
FC07	X	2	0	2	1	0	0	1	1
	G	1	0	1	1	0	0	1	1

Legenda:

0 ≡ não prediz o valor experimental e nem a tendência ao estado estacionário ou comportamento oscilatório

1 ≡ prediz somente a tendência ao estado estacionário ou comportamento oscilatório;

2 ≡ prediz o valor experimental e a tendência ao estado estacionário ou ao comportamento oscilatório.

Na Tabela 6.31 verifica-se a melhor capacidade de predição do MHCN para o grupo com 3 medições em relação aos outros grupos onde as medições são sucessivamente substituídas pelos valores híbridos. Observa-se também que a capacidade de predição do modelo híbrido decai do grupo com 2 medições para o grupo com 1 medição e deste para o grupo onde há ausência total de medições. Verifica-se ainda que o decaimento da qualidade preditiva do modelo híbrido é mais acentuada na FC07 quando inserida nos grupos com 2 e 1 medições.

A Tabela 5.43 esboça o comportamento de redução da capacidade de predição do MHCN a medida que as variáveis medidas vão sendo substituídas pelas variáveis simuladas pelo MHCN. A substituição ocorre da esquerda para direita. Desta forma, a melhor capacidade de predição está relacionado à condição de alimentação onde todas as variáveis de estado medidas são empregadas (Teste 1).

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES, CONTRIBUIÇÕES E SUGESTÕES

7.1 CONCLUSÕES

Com base na literatura científica, um modelo cibernético específico para o sistema produtivo em estudo foi concebido.

Contudo, Camêlo (2009), ao desenvolver o processo contínuo de fermentação alcoólica empregando *Zymomonas mobilis*, mediu analiticamente somente as variáveis de estado referentes às concentrações de etanol, de células e de glicose, as quais apresentaram dinâmica complexa envolvendo comportamento oscilatório na fase contínua de processo sob determinadas condições. Além disso, a estequiometria proposta por Lehninger et al. (2007) apresenta como co-produto do processo a formação de lactato (Eq 4.8). Desta forma, para contornar a falta de dados experimentais referentes à concentração de lactato, foi treinada uma rede neuronal (RNA) híbrida com saídas cibernéticas deduzidas a partir das equações do balanço material do modelo cibernético para etanol (Eq 4.39), células (Eq 4.40) e glicose (Eq 4.41). No treinamento da RNA híbrida foram testadas redes do tipo "*Perceptron*" multicamadas (MLP), função de bases radiais (RBF) e lineares.

A RNA híbrida foi integrada ao modelo cibernético e, assim, concebido o modelo híbrido cibernético / neuronal (MHCN). Oito testes de realimentação (teste 1 ao teste 8) da RNA MLP do modelo híbrido foram levados a termo para fermentações contínuas estudadas (FC01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 10 e 11). Os testes consideraram a realimentação exclusiva da RNA MLP híbrida com as variáveis de estado medidas (concentração de etanol, de células e de glicose um passo a frente) – teste 1 e teste 1 com correção do erro de predição, substituindo-as sucessivamente pelos correspondentes valores calculados pelo MHCN um passo à frente até ser totalmente realimentada pelos valores híbridos – teste 8. Os testes foram avaliados graficamente e por estatísticas apropriadas (Capítulos 5 e 6).

Ademais, o MHCN realimentado totalmente com os dados históricos (teste 1 com correção do erro de predição) foi comparado com uma RNA autônoma (saídas contendo a concentração de etanol, de células e de glicose um passo a frente) e com o modelo fenomenológico proposto por Daugulis et al. (1997) e implementado por Camêlo (2009).

Por fim, com base nos procedimentos e investigações realizadas no presente trabalho para a proposição de modelo matemático inserido no conceito cibernético e de inteligência artificial para o processo fermentativo contínuo para a produção de etanol, tendo como agente biotransformador as bactérias *Zymomonas mobilis*, pode-se concluir que:

(1) as RNA do tipo MLP com saídas cibernéticas mostraram-se mais eficientes na predição do processo fermentativo quando comparadas com as lineares e RBF;

(2) o MHCN exibiu melhor capacidade de predição das variáveis de estado para dinâmica altamente complexa da fermentação alcoólica estudada por Camêlo (2009) na condição de alimentação onde todas as variáveis medidas estão presentes (Teste 1), sendo melhorada ainda mais quando é inserida a correção do erro de predição (Teste 1 com correção do erro de predição);

(3) o MHCN teve sua capacidade de predição diminuída à medida que as variáveis mensuradas foram substituídas pelas correlatas variáveis simuladas pelo MHCN (na sequência do Teste 1 para o Teste 8);

(4) recorrentemente o MHCN exibiu pior capacidade em reproduzir o comportamento experimental da concentração de glicose, como discutido no item 5.3.1.7, tendo por base a composição da Equação 4.30, exceto quando fora inserido a correção do erro de predição;

(5) o MHCN apresenta melhor capacidade de predição quando simulado até 20 e 10 pontos na sequência de dados. Todavia, não se pode inferir sobre possível melhora de predição entre as simulações feitas até o ponto número 20 e até o ponto número 10. Os valores de R^2 para as simulações nos 10 primeiros pontos da sequência de dados são um pouco melhores em comparação com os obtidos para as simulações nos 20 primeiros pontos;

(6) o MHCN exibiu melhor predição para os dados experimentais da concentração de células;

(7) o MHCN mostrou melhor desempenho na representação da dinâmica complexa das FC05, 06 e 07, onde há comportamento oscilatório na fase contínua do processo;

(8) quando comparado com a RNA autônoma e com o modelo fenomenológico de Daugulis et al. (1997) - nas condições implementadas por Camêlo (2009), o MHCN com correção do erro de predição (Teste 1 com correção do erro de predição) exibiu capacidade de

predição semelhante a da RNA autônoma e muito melhor em relação ao modelo fenomenológico para as FC01, 02, 03, 04, 05 e 06 testadas por Camêlo (2009);

(9) o MHCN permite estimar a concentração de lactato não medido experimentalmente por Camêlo (2009), substituindo a variável cibernética de saída referente à rota metabólica de fermentação lática (Z_3) calculada na Equação (4.41) na equação de taxa de lactato (Eq 4.32);

(10) o MHCN também possibilita a simulação e determinação das concentrações das enzimas chaves das rotas metabólicas da fermentação alcoólica, crescimento celular e fermentação lática. Desta forma é possível obter os valores iniciais dos referidos catalisadores bioquímicos, permitindo sua utilização para inicialização das equações diferenciais do modelo cibernético concebido no Capítulo 4;

(11) o tempo de resposta das simulações do MHCN foi de menos de um minuto, considerando inclusive a geração dos gráficos e arquivos de dados simulados para cada variável de estado, além do cálculo dos critérios estatísticos utilizados para as análises (coeficiente de determinação e erro quadrático médio).

7.2 CONTRIBUIÇÃO DO TRABALHO

Dentro do escopo delineado para o trabalho, podem-se vislumbrar como contribuições mais relevantes os seguintes pontos:

(1) aplicação de abordagem híbrida cibernética / neuronal em processo de fermentação alcoólica de dinâmica altamente complexa, empregando bactérias *Zymomonas mobilis*, não encontrada na literatura científica até o momento;

(2) compreender as rotas metabólicas preponderantes de *Zymomonas mobilis* na fermentação alcoólica, baseado na abordagem da estrutura de modelagem cibernética. A partir dessa compreensão, estabelecer as enzimas chaves, propor as equações cinéticas de taxas instantâneas e estabelecer o balanço de massa;

(3) permitir estimar variáveis não medidas experimentalmente, tais como as concentrações de lactato e de enzimas chaves das três rotas metabólicas, além de outros metabólitos intracelulares de determinação experimental difícil;

(4) apresentar potencial para emprego com sensor virtual (*soft-sensor*) em processos de fermentação alcoólica biotransformado por *Zymomonas mobilis*;

(5) o arcabouço computacional do MHCN apresenta potencial para emprego em outros sistemas biológicos;

(6) possibilidade de uso do MHCN desenvolvido em esquemas de monitoramento.

7.3 SUGESTÕES

Como sugestões para prosseguimento desta pesquisa registra-se:

(1) realizar novos experimentos incluindo a dosagem da concentração de lactato e, assim, verificar a qualidade de estimativa de lactato propiciada pelo MHNC proposto;

(2) inserido no conceito de modelagem cibernética, conduzir novos experimentos medindo as concentrações de etanol, de células, de glicose e também as referentes às concentrações de glicerol e vinhoto, visto que a literatura científica relata a existência desta rota metabólica e deste resíduo no processo de produção de bioetanol combustível;

(3) com as variáveis de estado do item anterior obtidas, propor estequiometria para o catabolismo da glicose. A partir desta desenvolver modelo cibernético, neuronal autônomo e híbrido cibernético / neuronal, comparando os desempenhos;

(4) estimar os parâmetros do modelo cibernético proposto para a sua aplicação na representação do processo em estudo;

(5) medir experimentalmente as condições iniciais de concentração das enzimas chaves para utilização na inicialização das equações de taxa do modelo cibernético;

(6) a partir da concentração inicial das enzimas chaves (estimadas ou medidas), inserir as equações referentes a estas enzimas no MHCN, tornando-o capaz em representar o perfil enzimático da fermentação;

- re-estimar os parâmetros do modelo fenomenológico proposto por Daugulis et al. (1997).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIBA, S.; SHODA, M.; NAGATANI, M. **Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation.** Biotechnol. Bioeng. 10, 845–864, 1968.

AN, H. J., SCOPES R. K., RODRIGUEZ M. **Gel electrophoretic Analysis of *Zymomonas mobilis* Glycolytic and Fermentative Enzymes - Identification of Alcohol Dehydrogenase-II as a Stress Protein**. Journal of Bacteriology, v.19, 173, 5975-5982, 1991.

ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. **Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda**. MultiCiência: Construindo a História dos Produtos Naturais, 7, 1-16, outubro, 2006.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**, 2nd ed., McGraw-Hill, New York, 1986.

BAKSHI, B. R.; STEPHANOPOULOS, G. **Weve-net: a multiresolution, hierarchical neural network with localized learning**. AIChE Journal, 39, 1, 1993.

BANDYOPADHYAY, B.; HUMPHREY, A. E.; TAGUCHI, H. **Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems.** Biotech. Bioeng., 9, 533–544, 1967.

BAUGHMAN, D. R.; LIU, Y. A. **Neural networks in bioprocessing and chemical engineering**, Blacksburg, VA, Virginia Polytechnic Institute and State University, 1995, 171p.

BELLGARDT, K.-H. **A new approach for structured growth models.** In Proceedings of the 4th International Conference on Computer Applications in Fermentation Technology (N. M. Fish and R. I. Fox, Eds.), pp. 79-92, Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, 1988.

BELLGARDT, K.-H. **Cell Models.** In Biotechnology (K. H. Schügerl Ed.), Vol. 4, pp. 269-298, Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 1991.

BOARETO, A. J. M. **Modelagem híbrido-neuronal da produção de lipase por *Candida rugosa***. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2005, 271p.

BOARETO, A. J. M.; DE SOUZA JR, M. B.; VALERO, F. B.; VALDMAN, B. **Predição de atividade lipolítica por redes neuronais no processo de produção por *Candida rugosa***. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ), 16., 2006, Santos, Resumos do XVI Congresso Brasileiro de Engenharia Química. – Santos, SP,EEL – Lorena e UNICAMP - Campinas: 2006. Trabalho nº 1369-QM4. ISBN 978-85-60328-00-0.

BOARETO, A. J. M.; DE SOUZA JR, M. B.; VALERO, F. B.; VALDMAN, B. **A hybrid neural model (HNM) for on-line monitoring of lipase production by *Candida rugos***. Journal of Chemical Technology and Biotecnology, 82, 319–327, 2007.

BOARETO, A. J. M.; VALDMAN, B.; DE SOUZA JR., M. B. **Uma revisão de modelagem matemática em bioprocessos. Parte I: Fundamentos básicos e classificação**. RMCT: Revista Militar de Ciência e Tecnologia, v. XVIII, p. 40-58, 3º Trimestre 2011(a). Disponível em: < http://rmct.ime.eb.br/edicoes.html>. Acessado em 10 Ago 2012.

BOARETO, A. J. M.; VALDMAN, B.; DE SOUZA JR., M. B. **Uma revisão de modelagem matemática em bioprocessos. Parte II: Modelos mecanicistas e redes neuronais artificiais**. RMCT: Revista Militar de Ciência e Tecnologia, v. XVIII, p. 60-84, 3º Trimestre 2011(b). Disponível em: < http://rmct.ime.eb.br/edicoes.html>. Acessado em 10 Ago 2012.

BOARETO, A. J. M.; VALDMAN, B.; DE SOUZA JR., M. B. **Uma revisão de modelagem matemática em bioprocessos. Parte III: Modelos cibernéticos e modelos híbridos**. RMCT: Revista Militar de Ciência e Tecnologia, submetido.

BRUCE, L. J.; AXFORD, D. B.; CISZEK, B.; DAUGULIS, A. J. **Extractive fermentation by *Zymomonas mobilis* and the control of oscillatory behaviour**. Biotechnology Letters, 13, 291–296, 1991.

BURDEM, R. L.; FAIRES, J. D. **Análise Numérica**, Pioneira Thomson Learning, Brasil, 2003, 736p.

CAMÊLO, A. C. R. **Investigação do Comportamento Dinâmico na Produção Contínua de Etanol por *Zymomonas mobilis***. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, Brasil, 2009, 177p.

CHANG, D.-M.; WANG, T.-H.; CHIEN, I-L.; HWANG, W.-S. **Improved operating policy utilizing aerobic operation for fermentation process to produce bio-ethanol**. Biochemical Engineering Journal, 68, 178–189, 2012.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimática**. Rio de Janeiro, RJ, Brasil, FAPERJ e Petrópolis, RJ, EPUB, 2008, 288p.

COELHO, M. A. Z. **Biossistemas e Biorreações: Engenharia Metabólica a partir da perspectiva Cibernética**. Notas de aula, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2009, 21p. Disponível em: <http://www.eq.ufrj.br/biose/nukleo/aulas/Biossistemas/Biossistemas_aula04.pdf>. Acessado em 15 Set 2009.

COELHO, A. P. A. **Modelagem matemática e estudo de estratégias de alimentação de um processo de produção de lipase por *Penicillium restrictum***. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2001, 99p.

CORTEZ, L. A. B.; BROSSARD PÉREZ, L. E. **Experiences on vinasse disposal Part III: combustion of vinasse-# 6 fuel oil emulsions**. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 14, 1, 1997. Disponível em: <http:// http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-66321997000100002&script=sci_arttext>. Acessado em 20 Mar 2010.

COSTA, A. O. S.; DE SOUZA JR, M. B.; BISCAIA JR, E. C.; LIMA, E. L. **Redes neurais de base radial (RBF)**. Tappi Journal, 4, 4, 2005.

CRUZ, A. J. G.; ARAUJO, M. L. G. C.; GIORDANO, R. C.; HOKKA, C. O. **Phenomenological and neural-network modeling of cephalosporin C production bioprocess**. Applied Biochemistry and Biotechnology, 70-72, 579-592, 1998.

DAUGULIS, A. J.; McLELLAN, P. J.; LI, J. **Experimental Investigation and Modeling of Oscillatory Behavior in the Continuous Culture of *Zymomonas mobilis***. Biotechnology and Bioengineering, 56, 1, 99 – 105, 1997.

DE SOUZA JR, M. B. **Redes neuronais multicamadas aplicadas a modelagem e controle de processos químicos**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 1993, 124p.

DE SOUZA JR, M. B. **Redes neurais artificiais na engenharia química**. Rio de Janeiro, RJ, 2001, 35p.

DE SOUZA JR, M. B. **Redes neurais com Statistica**. Curso de treinamento para a versão 6. Escola de Química, UFRJ, 2003, 39p.

DIEGUEZ, J. P. P. **Métodos Numéricos Computacionais para a Engenharia**, Âmbito Cultural Edições Ltda, Brasil, 1992, 301p.

DOEDEL, E.; CHAMPNEYS, A. R.; FAIRGRIEVE, T. F.; KUZNETSOV, Y. A.; SANDSTEDE, B. e WANG, X. (1997), AUTO97: **Continuation and bifurcation software for ordinary differential equations**, User's Guide, Montreal, Concordia University, 1997, 164p.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. ***Zymomonas mobilis:* um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 30, n. 2, p. 361-380, abr./jun. 2009.

FELL, D. A. **Increasing the flux in metabolic pathways: A metabolic control analysis perspective.** Biotechnology and Bioengineering, 58, 2-3, 121-124, 1998.

FERREIRA, A. B. O. **Novo Dicionário Aurélio**, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Editora Nova Fronteira S.A., 1ª Ed, 15ª impressão, 1975, 1499p.

FONSECA, R. F.; ALVES, T. L. M.; LIMA, E. L.; DE SOUZA JR, M. B. **A hybrid neural model for the production of sorbitol and gluconic acid using immobilized *Zymomonas mobilis* cells**. Latin American Applied Research, 34, 187-193, 2004.

FREIRE, D. M. G.; SANT'ANNA JR, G. L.; ALVES, T. L. M. **Mathematical modeling of lipase and protease production by *Penicillium restrictum* in a batch fermenter**. Applied Biochemistry and Biotechnology, 77-79, 845-855, 1999.

FU, N.; PEIRIS, P.; MARKHAM, J; BAVOR, J. **A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/xylose mixtures**. Enzyme and Microbial Technology, 45, 210-217, 2009.

GHOMMIDH, C.; VAIJA, J.; BOLARINWA, S.; NAVARRO, J. M. **Oscillatory behaviour of *Zymomonas* in continuous cultures: A simple stochastic model**. Biotechnology Letters, II, 9, 659–664, 1989.

GANDELMAN, R. A. **Predição da ROP e Otimização em Tempo Real de Parâmetros Operacionais na Perfuração de Poços de Petróleo Offshore**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2012, 195p.

GIBBS, M.; DEMOSS, R. D. **Anaerobic dissimilation of C14, lapelled glucose and fructose by Pseudomonas lindneri.** Journal of Biology Chemistry, Bethesda, v. 207, 689-694, 1954.

GIUSEPPIN, A. L. F.; van RIEL, N. A. W. **Metabolic modeling of *Saccharomycies cerevisiae* using the optimal control of homeostasis: A cybernetic model definition**. Metabolic Engineering, 2, 14 – 33, 2000.

GLASSEY, J.; MONTAGUE, G. A.; WARD, A. C.; KARA, B. V. **Enhanced supervision of recombinant *E. coli* fermentation via artificial neural networks.** Process Biochemistry, 29, 387-398, 1994.

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. **Microbial Biotechnology.** 2ª ed. New York, NY, USA, Cambridge University Press, 2007, 577 p.

GOMBERT, A. K.; NIELSEN, J. **Mathematical modeling of metabolism.** Current Opinion in Biotechnology, 11, 180-186, 2000.

GORDILLO, M. A. **Estratègies d'operació em "fed-batch": aplicació a la producció de lípases per *Candida rugosa***. D. Sc. Thesis, Universitat Autônoma de Barcelona, Barcelona, Espanha, 1996, 242p.

HAYKIN, S. **Neural networks. A comprehensive foundation**. 2nd ed. Hamilton, Ontario, Canada, McMaster University, 1999, 842p.

HANNA, O. T.; SANDALL, O. C. **Computational methods in chemical engineering**. Upper Saddle River, NJ, USA, 1995

HENRIQUE, H. H.; LIMA, E. L.; SEBORG, D. E. **Model structure determination in neural network models**. Chemical Engineering Science, 55, 5457-5469, 2000.

HENRIQUES, A. W. S.; COSTA, A. C.; ALVES, T. L. M.; LIMA, E. L. **Optimization of fed-batch processes: challenges and solutions**. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 16, 2, 1999(a).

HENRIQUES, A. W. S.; COSTA, A. C.; ALVES, T. L. M.; LIMA, E. L. **A hybrid neural model of ethanol production by *Zymomonas mobilis***. Applied Biochemistry and Biotechnology, 77-79, 277-291, 1999(b).

HIMMELBLAU, D. M. **Process Analysis by Statistical Methods.** New York, NY, USA, John Wiley & Sons, Inc, 1970, 463p.

HUSSAIN, M. A. **Review of the applications of neural networks in chemical process control – simulation and online implementation**. Artificial Intelligence in Engineering, 13, 55-68, 1999.

JARZEBSKI, A. B. **Modelling of oscillatory behaviour in continuous ethanol fermentation**. Biotechnology Letters, 14, 2, 137–142, 1992.

JÖBSES, I. M. L.; EGBERTS, G. T. C.; LUYBEN, K. C. A. M.; ROELS, J. A. **Fermentation kinetics of *Zymomonas mobilis* at high ethanol concentrations: oscillations in continuous cultures**. Biotechnology and Bioengineering, 28, 868–877, 1986.

JONES, K. D. **Cybernetic** m**odeling of Spontaneous oscillations in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*.** M. S. Thesis, University of Colorado, Boulder, CO, 1995.

JONES, K. D.; KOMPALA, D. S. **Cybernetic model of the growth dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and continuous cultures**. Journal Biotechnology, 71, 105–131, 1999.

JORGENSEN, H.; NIELSEN, J.; VILLADSEN, J.; MOLGAARD, H. **Metabolic flux distributions in Penicillium chrysogenum during fed-batch cultivations.** Biotechnology and Bioengineering, 46, 117-131, 1995.

KANNAN, T. R.; SANGILIYANDI, G.; GUNASEKARAN, P. **Improved ethanol production from sucrose by a mutant of *Zymomonas mobilis* lacking sucrases in immobilized cell fermentation**. Enzyme and Microbial Technology, New York, 22, 179-184, 1998.

KARIM, M. N.; YOSHIDA, T.; RIVERA, S. L.; SAUCEDO, V. M.; EIKENS, B.; OH, G. S. **Global and local neural network models in biotechnology: application to different cultivation processes**. Journal of Fermentation and Bioengineering, 83, 1, 1-11, 1997.

KATZ, S. H. **Food to fuel and the world food crisis**. Anthropol Today, 24, 1–3, 2008.

KELL, D. B.; WESTERHOFF, H. V. **Metabolic control theory: its role in microbiology and biotechnology.** FEMS Microbiology Letters. Rev. 39, 4, 305-320, 1986.

KO, J.; SUN, W.-J.; CHIEN, I-L.; CHANG D.-M.; CHOU S.-H.; ZHAN, R.-Y. **Dynamic modeling and analyses of simultaneous saccharification and fermentation process to produce bio-ethanol from rice straw**. Bioprocess Bosyst Eng, 33, 195–205, 2010.

KOMIVES, C.; PARKER, R. S. **Bioreactor state estimation and control**. Current Opinion in Biotechnology, 14, 468-474, 2003.

KOMPALA, D. S., 1982. **Cybernetic Modeling of Microbial Growth on Multiple Substrates**. M.S. Thesis. Purdue University, W. Lafayette, IN.

KOMPALA, D. S.; RAMKRISHNA, D.; TSAO, G. T. **Cybernetic modeling of microbial growth on multiple substrates**. Biotechnology and Bioengineering, 26, 1272–1281, 1984.

KOMPALA, D. S.; RAMKRISHNA, D.; JANSEN, N. B.;TSAO, G. T. **Investigation of bacterial growth on mixed substrate: Experimental evaluation of cybernetic models**. Biotechnology and Bioengineering, 28, 1044–1055, 1986.

KOSKO, B.; *Neural Networks and Fuzzy Systems*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., 1991.

KRISHNAN, M. S.; BLANCO, M.; SHATTUCK, C. K.; NGHIEM, N. P.; DAVISON, B. H. **Ethanol production from glucose and xylose by immobilized *Zymomonas mobilis* CP4(pZB5)**. Applied Biochemistry and Biotechnology, 84-86, 525-541, 2000.

LEE, K. J.; SKOTNICKI, M. L.; TRIBE, D. E.; ROGERS, P. L. **Kinetic studies on a highly productive strain of *Zymomonas mobilis*.** Biotechnology Letters, 2, 339–344, 1980.

LEE, K. J., ROGERS, P. L. **The fermentation kinetics of ethanol production by *Zymomonas mobilis***. Chemical. Engineering. Journal, 27, B31–B38, 1983.

LEE, W.-C.; HUANG, C.-T. **Modeling of ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 grown on the media containing glucose and fructose**. Biochemical Engineering Journal, 4, 217–227, 2000.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**, 4ª ed., Savier, São Paulo, Brasil, 2007, 1024p.

LENNOX, B.; HIDEN, H. G.; MONTAGUE, G. A.; KORNFELD, P. R.; GOULDING, P. R. **Application of multivariate statistical process control to batch operations**. Computers and Chemical Engineering, 24, 291–296, 2000.

LENNOX, B.; MONTAGUE, G. A.; FRITH, A. M.; GENT, C.; BEVAN, V. **Industrial application of neural networks – an investigation**. Journal of Process Control, 11, 497-507, 2001.

LI, J. **Experimental Investigation and Mathematic Modelling of oscillatory Behaviour in the Ethanol Fermentation by Zymomonas mobilis**. Ph.D dissertation, Queen´s University, Kingston, Ontário, Canadá, 1995.

LI, J.; McLELLAN, P. J.; DAUGULIS, A. J. **Inhibition effects of ethanol concentration history and ethanol concentration change rate on *Zymomonas mobilis***. Biotechnology Letters 17: 321–326, 1995.

LINKO, P.; ZHU, Y. **Neural network modelling for real-time variable estimation and prediction in the control of glucoamylase fermentation**. Process Biochemistry, 27, 275-283, 1992.

LIAO, J. C.; DELGADO, J. **Flux calculation using metabolic control constrains.** Biotechnol. Prog. 14, 554-560, 1998.

LOOS, H.; KRAMER, R.; SAHM, H.; SPRENGER, G. A. **Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in high sugar-content environments: evidence for a physiological function of glucose-fructose oxidoreductase in osmoprotection.** J. Bacterial. 176, 7688-7693, 1994.

LUONG, J. H**. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation**. Biotechnol. Bioeng. 25: 280–285, 1985.

MANGESH, M. G.; JANA, A. K. **A comparison of three sets of DSP algorithms for monitoring the production of ethanol in fed-batch baker's yeast fermenter**. Measurement, 41, 970–985, 2008.

MathWorks, Inc. (2000). MATLAB® versão 6.0 (The Language of Technical Computing).

McCLELLAND, J. L.; RUMELHART, D. E. **Exploration in parallel distributed processing, a handbook of models, programs, and exercises**. The MIT Press, Cambridge, MA, 1988.

MONTAGUE, G. A.; LENNOX, B. M**ultivariate statistical process control hones a batch**. InTech, 42–44, 2000, Disponível em: <www.isa.org>.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. **Estatística Aplicada e Probabilidade para Engenheiros**, LTC Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Brasil, 2003, 463p.

MURTHY, G. S.; JOHNSTON, D. B.; RAUSCH, K. D.; TUMBLESON, M. E.; SINGH, V. **A simultaneous saccharification and fermentation model for dynamic growth environments**. Bioprocess Biosyst Eng, 35, 519–534, 2012.

NAMJOSHI, A. A.; RAMKRISHNA, D. **A cybernetic modeling framework for analysis of metabolic systems**. Computers and Chemical Engineering, 29, 487–498, 2005.

NAMJOSHI, A. A., KIENLE, A.; RAMKRISHNA, D. **Steady-state multiplicity in bioreactors: Bifurcation analysis of cybernetic models**. Chemical Engineering Science, ISCRE-17, 58, 793–800, 2003.

NASCIMENTO, S. S. **Simulação de Fermentação Alcoólica a partir do Melaço**. Dissertação de mestrado, Departamento de Engenharia Bioquímica, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ, Brasil, 1983, x, 109p.

NAVARRO, A. R; SEPÚLVEDA, M. del C.; RUBIO, M. C. **Bio-concentration of vinasse from the alcoholic fermentation of sugar cane molasses**. Waste Management, 20, 581-585, 2000.

NIELSEN, J.; VILLADSEN, J.; LIDÉN, G. **Bioreaction engineering principles.** 2ª ed, New York, NY, USA, Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2003, 525p.

OLIVEIRA, R. **Combining first principles modelling and artificial neural networks: a general framework**. Computers and Chemical Engineering, 28, 755-766, 2004.

OCHOA, S; YOO, A.; REPKE, J.-U.; WOZNY, G; YANG, D. R. **Modeling and identification of the bio-ethanol production process from starch: cybernetic vs. unstructured modeling**. In: 18th European Symposium on Computer Aided Process Engineering (ESCAPE18). Computer Aided Chemical Engineering, 25, 707–712, 2008.

OSORIO, D; PÉREZ-CORREA, J. R.; AGOSIN, E.; CABRERA, M. **Soft-sensor for on-line estimation of ethanol concentrations in wine stills**. Journal of Food Engineering, 87, 571-577, 2008.

PALHA, M. A. P. F. **Emprego do Método Simplex no Estudo Cinético da fermentação Alcoólica Contínua por Zymomonas mobilis.** Dissertação de mestrado, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil, 1987.

PALHA, M. A. P. F.; LOPES, C. E.; LIMA, M. A. G. A.; PEREIRA JR., N. **The influence of centrifugation on *Zymomonas mobilis* aggregation.** Electronic Journal of Biotechnology, 5, 3, 272-278, 2002.

PANEK, A. **Synthesis of trehalose by baker's yeast (*Saccharomyces cere*6*isiae*).** Arch. Biochem. Biophys. 98, 349–355, 1962.

PANEK, A. **Function of trehalose in baker's yeast (*Saccharomyces cere*6*isiae*).** Arch. Biochem. Biophys. 100, 422–425, 1963.

PARKER, C.; PEEKHAUS, N.; ZHANG, X.; CONWAY, T. **Kinetics of sugar transport and phosphorylation influence glucose and fructose cometabolism by *Zymomonas mobilis***. Applied and Environmental Microbiology, 63, 9, 3519–3525, 1997.

PATNAIK, P. R. **Are microbes intelligent beings?: An assessment of cybernetic modeling**. Biotechnology Advances, 18, 267-288, 2000.

PATNAIK, P. R. **An integrated hybrid neural system for noise filtering, simulation and control of a fed-batch recombinant fermentation**. Biochemical Engineering Journal, 15, 165-175, 2003.

PATNAIK, P. R. **A hybrid simulator for improved filtering of noise from oscillating microbial fermentations**. Biochemical Engineering Journal, 39, 389 – 396, 2008.

PATNAIK, P. R. **Intelligent models of the quantitative behavior of microbial systems**. Food Bioprocess Technology, 2, 122 – 137, 2009a.

PATNAIK, P. R. **Cognitive optimization of microbial PHB production in an optimally dispersed bioreactor by single and mixed cultures**. Bioprocess Biosyst Eng, 32, 557 – 568, 2009b.

PEREIRA Jr., N. **Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery**. *In. series on biotechnology.* Ed. Nei Pereira Jr. Amiga Digital. Escola de Química/UFRJ. ISBN 978- 85-903967-3-4, 2008.

PINHEIRO, I. O.; CAMÊLO, A. C. R.; SOUTO-MAIOR, A. M.; LOPES, C. E. **Oscillatory Behavior of *Zymomonas mobilis* in Continuous Stirred Tank Bioreactor**. In: 2º Congresso Mercosul de Engenharia Química and 4º Congresso Mercosul de Engenharia de Sistemas e Processos (ENPROMER 2005), 4., 2005, Rio de Janeiro. Anais eletrônicos do 2º Congresso

Mercosul de Engenharia Química e 4º Congresso Mercosul de Engenharia de Sistemas e Processos. Rio de Janeiro: 2005. Trabalho nº 0528. Disponível em: <http://www.enpromer2005.eq.ufrj.br/lng/pt/listar_trabalhos.php?idioma=pt>. Acesso em: 10 ago. 2009.

PORTO, L. M. **Modelagem de Processo Industrial de Fermentação Alcoólica Contínua com Reatores de Mistura Ligados em Série**. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2005, 139p.

PSICHOGIOS, D. C.; UNGAR, L.H. **A hybrid neural network-first principles approach to process modeling**. AIChE Journal, 38, 10, 1499-1511, 1992.

RAMKRISHNA, D., 1982. **A cybernetic perspective of microbial growth**. In: Papoutsakis, E., Stephanopoulos, G.N., Blanch, H.W. (Eds.), Foundations of Biochemical Engineering: Kinetics and Thermodynamics in Biological Systems. Americal Chemical Society, Washington, DC.

RAMKRISHNA, D.; KOMPALA, D. S., TSAO, D. T. **Cybernetic modeling of microbial population. Growth on mixed substrate.** In Frontiers in Chemical Reaction Engineering, vol I, Wiley Eastern Ltda, New Delhi, 241 – 261, 1984.

RAMKRISHNA, D.; KOMPALA, D. S.; TSAO, G. T. **Are microbes optimal strategists?** Biotechnology Progress , 3, 121-126, 1987.

RAMKRISHNA, D. **On modeling of bioreactors for control**. Journal of Process Control, 13, 581–589, 2003.

RANZAN, C.; DIEHL, F. C.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M. M.; TRIERWEILER, J. O. **Comparação entre os Modelos de Jöbses e Daugulis para a Fermentação Contínua de Glicose Utilizando a Bactéria *Zymomonas mobilis***. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM), 17., 2009, Natal, Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. – Natal, RN,UFRN: 2009. Trabalho nº 0454. ISBN 978-85-98130-02-8 - EAN 9788598130026.

RIVERA, E. C.; COSTA, A. C.; ATALA, D. I. P.; MAUGERI, F.; MACIEL, M. R. W.; FILHO, R. M. **Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: Application to ethanol fermentation considering the effect of temperature**. Process Biochemistry, 41, 1682-1687, 2006.

ROGERS, P. L.; LEE, K. J.; SKOTNICKI, M. L.; TRIBE, D. E. **Ethanol production by *Zymomonas mobilis***. Advances Biochemical Engineering, 23, 37–84, 1982.

SANTOS, D.; CAMÊLO, A. C.; SCHIMER, L.; SANTOS, D.; PEREIRA Jr, N. **Análise preliminar da produção de etanol do bagaço de cana-de-açúcar pela bactéria *Zymomonas mobilis* CP4, empregando o processo SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*)**. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM), 17., 2009, Natal. Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos. – Natal, RN,UFRN: 2009. Trabalho nº 0646. ISBN 978-85-98130-02-8 - EAN 9788598130026.

SARACENO, A.; CURCIO, S.; CAÇABRÒ, V.; IORIO, G. **A hybrid neural approach to model fermentation of "ricotta cheese whey" to ethanol**. Computers and Chemical Engineeging, 34, 1590-1596, 2010.

SCHULZE, U. **Anaerobic Physiology of Saccharomyces cerevisiae**. Ph.D. thesis, Technical University of Denmark, 1995.

SCHWAAB, M.; PINTO, J. C. **Análise de Dados Experimentais I: Fundamentos de Estatística e Estimação de Parâmetros.** Rio de Janeiro, RJ, Brasil, E-papers Serviços Editoriais, 2007, 462p.

SIMÕES, C. L. N.; SENA, M. E. R.; CAMPOS, R. **Estudo da viabilidade econômica da concentração de vinhoto através de osmose inversa**. In: XXIV Encontro Nacional de Engenharia de Produção, 2004, Florianópolis, Associação Brasileira de Engenharia de Produção (ABEPRO) 2004. Disponível em <http://www.abepro.org.br/biblioteca/ENEGEP2004_Enegep1004_1360.pdf>. Acessado em 20 Jul 2011.

SONG, H.-S.; MORGAN, J. A.; RAMKRISHNA, D. **Systematic development of hybrid cybernetic models: application to recombinant yeast co-consuming glucose and xylose**. Biotechnology and Bioengineering, 103, 5, 984-1002, 2009.

SONG, H.-S.; RAMKRISHNA, D. **Issues with increasing bioethanol productivity: a model directed study**. Korean J. Chem. Eng., 27, 2, 576-586, 2010.

SPRENGER, G. A. **Carbohydate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes**. FEMS Microbiology Letters, Amsterdam, 145, 301-307, 1996.

StatSoft, Inc. (1984-2007). STATISTICA V. 8 (data analysis software system), <www.statsoft.com>.

STRAIGHT, J. V.; RAMKRISHNA, D. **Cybernetic modeling and regulation of metabolic pathways: Growth on complementary nutrients.** Biotechnol. Prog. 10, 574-587, 1994.

SWINGS, J.; DELEY, J. **The Biology of *Zymomonas***. Bacteriological Reviews, Baltimore, 41, 1-46, 1977.

TAO, F.; MIAO, J. Y.; SHI, G. Y.; ZHANG, K. C. **Ethanol fermentation by an acid-tolerant *Zymomonas mobilis* under non-sterilized condition**. Process Biochemistry, 40, 183–187, 2005.

TENENBAUM, D. J. **Food vs. fuel: diversion of crops could cause more hunger**. Environmental Health Perspectives, 116, 6, A254–A257, 2008.

THATIPAMALA, R.; ROHANI, S.; HILL, G. A. **Effects of high product and substrate inhibitions on the kinetics and biomass and products yields during ethanol batch fermentation**. Biotechnology and Bioengineering, 40, 2, 289–297, 1992.

TOMA, M. M.; KALNENIEKS, U.; BERZINS, A.; VIGANTS, A.; RIKMANIS, M.; VIESTURS, U. **The effect of mixing on glucose fermentation by *Zymomonas mobilis* continuous culture**. Process Biochemistry, London, 38, 1347-1350, 2003.

TRINDER, P. **Determination of glucose in blood using glucose oxidase with na alternative oxygen acceptor**. *Ann. Clin. Biochem.*, v. 6, pp. 24-27, 1969.

TURNER, B. G.; RAMKRISHNA, D. **Revised enzyme synthesis rate expression in cybernetic models of bacterial growth.** Biotech. Bioeng., 31, 41–43, 1988.

VALDMAN, B.; FOLLY, R.; SALGADO, A. **Dinâmica, controle e instrumentação de processos.** Rio de Janeiro, RJ, Brasil, Editora UFRJ, 2008, 400p.

van HAANDEL, A. **Aproveitamento dos subprodutos de destilarias de álcool para proteger o meio ambiente e aumentar a rentabilidade**. In: XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2000, Porto Alegre, Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental – Região Rio Grande do Sul (ABES/RS) 2000. Disponível em <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/impactos/vi-004.pdf>. Acessado em 20 Jul 2011.

van MARIS, A. J. A.; ABBOTT, D. A.; BELLISSIMI, E.; van den BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, M. A. H.; WISSELINK, H. W.; SCHEFFERS, W. A.; van DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. **Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status**. Antonie Leeuwenhoek, 90, 391–418, 2006.

VARNER, J.; RAMKRISHNA, D. **Mathematical models of metabolic pathways**. Current Opinion in Biotechnology, 10, 146–150, 1999.

VEERAMALLU, U.; AGRAWAL, P. **A structured kinetic model for *Zymomonas mobilis* ATCC10988.** Biotechnol. Bioeng. 36, 694–704, 1990.

VENKATASUBRAMANIAN, V.; RENGASWAMY, R.; YIN, K ; KAVURI, S. **N. A review of process fault detection and diagnosis Part I: Quantitative model-based methods**. Computers and Chemical Engineering, 27, 293 – 311, 2003.

VLASSIDES, S.; FERRIER, J.G.; BLOCK, D. **Using historical data for bioprocess optimization: modeling wine characteristics using artificial neural networks and archived process information**. Biotechnology and Bioengineering, 73, 1, 55-68, 2001.

von MEYENBURG, H.K. **Katabolit-Repression under Sprossungszklus von *Saccharomyces cerevisiae*.** Dissertation No. 4279, Eidg. Techn. Hochschule, Zurich, 1969.

WEN-CHIEN, L.; CHENG-TA, H. **Enhancement of ethanol production from sucrose by *Zymomonas mobilis* by the addition of immobilized invertase**. Enzyme and Microbial Technology, 17, 1, 79-84, 1995.

WIENER, N. (1948). **Cybernetics, or Control and Communication in the Animal and the Machine**. Cambridge MIT press, MA.

WONG, W. C.; SONG, H.-S.; LEE, J. H.; RAMKRISHNA, D. **Hybrid cybernetic model-based simulation of continuous production of lignocellulosic ethanol: rejecting abruptly changing feed conditions**. Control Engineering Practice, 18, 177-189, 2010.

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

APÊNDICE A

MODELO FENOMENOLÓGICO – DAUGULIS et al. (1997) / CAMÊLO (2009)

A.1 MODELO FENOMENOLÓGICO

A.1.1 Equações do modelo fenomenológico

O modelo fenomenológico de Daugulis et al. (1997) foi selecionado para uso neste trabalho para promover a comparação com as respostas do modelo híbrido cibernético / neuronal proposto. Além disso, mostrou-se satisfatório em diversas condições de comportamento dinâmico (Camêlo, 2009) e por, mesmo sendo não estruturado, considerou o retardo da resposta metabólica em função da alteração do meio reacional.

Daugulis et al. (1997) sugeriram um modelo fenomenológico não estruturado, baseado nas variáveis macroscópicas de processo, tais como concentração celular, consumo de substrato e formação de etanol.

Analisando prévios trabalhos com *Zymomonas mobilis* de Li et al. (1995), Daugulis et al. (1997) verificaram que o efeito inibitório histórico da concentração de etanol é insignificante, enquanto o efeito de inibição provocado por uma taxa ascendente de variação na concentração de etanol é bastante intenso. Desta forma, ao reconhecer que as células são incapazes de responder instantaneamente às mudanças no seu ambiente, os autores postularam a existência de um "atraso" a ser considerado entre o momento em que as células sofrem uma mudança em seu ambiente reacional e sua resposta metabólica efetiva. Desta forma, o "tempo de atraso" do efeito inibitório foi modelado como sendo o efeito da média ponderada de segunda ordem da taxa histórica de variação da concentração de etanol, $Z(t)$:

Média ponderada da taxa histórica de mudança da concentração de etanol de 2ª ordem

$$Z(t) = \int_{-\infty}^{t} dP/dt\big|_{\tau} . \psi_z(\tau) d\tau \text{ .....[g L}^{-1}\text{ h}^{-1}] \qquad \text{(A.1)}$$

O tempo histórico (τ):

$$\tau = t - \frac{1}{\beta} .....[h] \qquad (A.2)$$

onde $\frac{1}{\beta}$.....[h] é tempo no passado quando ocorre a mudança na concentração de etanol, a qual causa a mais significativa influência na performance da célula (h) no tempo atual "t" (h).

Ainda na equação (A.1), o peso para a taxa histórica de variação da concentração de etanol $\psi_z(\tau)$ é dada por:

Peso para a taxa histórica de mudança da concentração de etanol

$$\psi_z(\tau) = \beta^2 (t-\tau).e^{-\beta.(t-\tau)} .....(h^{-1}) \qquad (A.3)$$

onde τ é o tempo na história e t é o tempo atual. Então, o máximo de $\psi_z(\tau)$ ocorre em $\frac{1}{\beta}$ h antes do tempo atual t. Isto significa que a taxa de variação na concentração de etanol ocorrida em $\frac{1}{\beta}$ h antes tem influência mais significativa na performance corrente da célula. Assim, o parâmetro β indica a magnitude do "tempo Lag" (fase Lag) para o tempo de inibição atrasado. Como observado, fica evidente que o efeito do "tempo de atraso" reconhece que a célula não responde instantaneamente às mudanças em seu ambiente, mas requer um período de tempo para produzir uma resposta metabólica.

Com $Z(t)$ definido na Equação (A.1), Daugulis et al. (1997) assumiram como hipótese a inibição do crescimento das células no momento "t" em função da média ponderada da taxa histórica de variação da concentração de etanol $Z(t)$:

$$Se: Z(t) > 0 \Rightarrow ocorre\, inibição\, do\, crescimento\, celular;$$
$$Z(t) \leq 0 \Rightarrow não\, ocorre\, inibição\, do\, crescimento\, celular.$$

Obviamente, tal hipótese sobre o efeito de $Z(t)$ leva a uma função "*piecewise*", sendo $Z(t) = 0$ o ponto de chaveamento do modelo. Normalmente, uma função contínua "*piecewise*" não é desejada em procedimentos de estimação de parâmetro por não ser adequadamente diferenciável em todo o seu domínio. A fim de facilitar o procedimento de estimação de parâmetro, uma função hiperbólica continuamente diferenciável, $f_\mu(Z(t))$, foi introduzido para aproximar o efeito de $Z(t)$ sobre o crescimento celular:

Função hiperbólica continuamente diferenciável, para aproximar o efeito de $Z(t)$ sobre o crescimento celular

$$f_{\mu}(Z(t)) = \frac{1}{2}.\left(1 - \frac{e^{\lambda.Z(t)-\delta} - e^{-\lambda.Z(t)+\delta}}{e^{\lambda.Z(t)-\delta} + e^{-\lambda.Z(t)+\delta}}\right) .....[\text{adimensional}] \qquad (A.4)$$

onde "λ" e "δ" são parâmetros a serem estimados a partir dos dados experimentais, os quais representam a intensidade do efeito de inibição de $Z(t)$.

A função $f_{\mu}(Z(t))$ possui a propriedade seguinte:

$$f_{\mu}(Z(t)) \in (0,1) \;\; para \;\; Z(t) \in (-\infty, +\infty) \qquad (A.5)$$

A função $f_{\mu}(Z(t))$ é o fator de inibição e é usada para definir a taxa dinâmica específica de crescimento $\mu(S(t), P(t), Z(t))$ em termos da convencional ou instantânea taxa específica de crescimento $\mu(S(t), P(t))$:

Taxa dinâmica específica de crescimento relacionada à taxa instantânea específica de crescimento pelo fator de inibição

$$\mu(S(t), P(t), Z(t)) = \mu(S(t), P(t)).f_{u}(Z(t)) .....[h^{-1}] \qquad (A.6)$$

A taxa instantânea específica de crescimento $\mu(S(t), P(t))$ refere-se à clássica representação da taxa específica de crescimento já bem estabelecida em livros didáticos ou na literatura (Aiba et al., 1968; Bailey e Ollis, 1986 apud Daugulis et al., 1997). $\mu(S(t), P(t))$ é instantânea por ser estritamente função dos valores atuais de $S(t)$ e $P(t)$. Por outro lado, a taxa dinâmica específica de crescimento $\mu(S(t), P(t), Z(t))$ é proposta para incluir o efeito inibitório da média ponderada da taxa histórica de variação da concentração de etanol [$Z(t)$] vivenciada pelas células. A natureza dinâmica desta taxa específica de crescimento decorre do fato que μ depende de $Z(t)$ e está associada com a evolução da taxa histórica de variação da concentração de etanol sentida pelas células.

Estando $f_{\mu}(Z(t))$ situado no intervalo (0; 1), a Equação (A.6) estipula que a taxa dinâmica específica de crescimento $\mu(S(t), P(t), Z(t))$ assume um valor no intervalo entre 0 e $\mu(S(t), P(t))$, dependendo do valor de $f_{\mu}(Z(t))$. Desta forma, quando a média ponderada da taxa histórica de variação da concentração de etanol é negativa ou nula [$Z(t) \leq 0$] – implicando em tendência descendente sustentada da taxa histórica de variação da concentração de etanol ou na tendência desta permanecer constante - a taxa dinâmica

específica de crescimento $\mu(S(t),P(t),Z(t))$ alcançará um valor idêntico ao da taxa instantânea específica de crescimento $\mu(S(t),P(t))$. Contudo, se Z (t)> 0 – correspondendo a uma tendência ascendente da taxa histórica de variação da concentração de etanol - a taxa dinâmica específica de crescimento $\mu(S(t),P(t),Z(t))$ só será capaz de atingir uma fração $f_{\mu}(Z(t))$ da taxa instantânea específica de crescimento $\mu(S(t),P(t))$.

A taxa instantânea específica de crescimento $\mu(S(t),P(t))$ na equação (A.6) é modelada utilizando a fórmula de inibição pelo produto e pelo substrato proposta por Veeramallu e Agrawal (1990 apud Daugulis et al., 1997):

Velocidade específica de crescimento celular, com inibição pelo produto e pelo substrato (Veeramallu e Agrawal, 1990 apud Daugulis et al., 1997)

$$\mu(S,P)=\frac{\mu_{\max}S\left[1-\left(\frac{P}{P_{ma}}\right)^{a}\right]\left[1-\left(\frac{P-P_{ob}}{P_{mb}-P_{ob}}\right)^{b}\right]}{k_s+S+\frac{S(S-S_i)}{K_i-S_i}}\ .....[\mathrm{h}^{-1}] \qquad (A.7)$$

onde:

$$\frac{P-P_{ob}}{P_{mb}-P_{ob}}=0 \quad \text{se} \quad \mathrm{P}\le P_{ob}$$

$$S-S_i=0 \quad se \quad S\le S_i$$

$$\frac{P-P_{ob}}{P_{mb}-P_{ob}}=1 \quad \text{se} \quad P>P_{mb}$$

A taxa específica de produção Q_P é modelado usando a fórmula da literatura (Lee e Rogers, 1983; Luong, 1985 apud Daugulis et al., 1997):

A taxa específica de produção

$$Q_P=\frac{Q_{P\max}.S}{k_{mP}+S}.\left(1-\left(\frac{P}{P_{me}}\right)^{\alpha}\right).....[\mathrm{g\ g^{-1}\ h^{-1}}] \qquad (A.8)$$

Para possibilitar a modelagem do processo fermentativo em batelada e contínuo, foi formulado o modelo de equações diferenciais para a cultura de *Zymomonas mobilis*:

Taxa de crescimento celular

$$\frac{\mathrm{dX}}{\mathrm{dt}}=[\mu(\mathrm{S,P,Z})-\mathrm{D}-\sigma(\mathrm{t})\mathrm{D}_e].\mathrm{X}\ .....[\mathrm{g\ L^{-1}\ h^{-1}}] \qquad (A.9)$$

Taxa de consumo de substrato

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{P/S}} Q_P X + D.\left(S_f - S\right) - \sigma(t) D_e S \text{ .....[g L}^{-1}\text{ h}^{-1}] \quad (A.10)$$

Taxa de formação de produto

$$\frac{dP}{dt} = Q_P.X - D.P + \sigma(t) D_e \left(P_e - P\right) \text{.....[g L}^{-1}\text{ h}^{-1}] \quad (A.11)$$

Derivada da média ponderada da taxa de mudança de concentração de etanol de 2ª ordem

$$\frac{dZ}{dt} = \beta.\left(W - Z\right) \text{.....[g L}^{-1}\text{ h}^{-1}] \quad (A.12)$$

Derivada da média ponderada da taxa de mudança de concentração de etanol de 1ª ordem

$$\frac{dW}{dt} = \beta.\left[Q_P.X - D.P - W + \sigma(t) D_e \left(P_e - P\right)\right] \text{.....[g L}^{-1}\text{ h}^{-1}] \quad (A.13)$$

Para modelar os experimentos de oscilações forçadas descritas posteriormente, etanol é adicionado a uma taxa de diluição D_e e a uma concentração P_e. Desta maneira, a variável $\sigma(t)$ terá seu valor definido em função da adição ou não do etanol exógeno. Então:

$\sigma(t) = 0$ se etanol exógenos não é adicionado
(bomba de alimentação de etanol desligada)

$\sigma(t) = 1$ se etanol exógenos é adicionado
(bomba de alimentação de etanol ligada)

No modelo supramencionado as três primeiras equações (Eq A.9 a A.11) são estabelecidas a partir do balanço de massa, considerando o biorreator operado em modo contínuo. Já as demais – Eq. A.12 e A.13 – resultam da diferenciação de $Z(t)$ em relação a t, onde $W(t)$ uma variável intermediária, sendo também uma média ponderada da prévia taxa de variação da concentração de etanol com peso $\psi_w(\tau)$. Logo:

Média ponderada da prévia taxa de variação da concentração de etanol de 1ª ordem

$$W(t) = \int_{-\infty}^{t} \left.\frac{dP}{dt}\right|_{\tau} \psi_W(\tau) d\tau \text{ .....[g L}^{-1}\text{ h}^{-1}] \quad (A.14)$$

Peso para a taxa histórica de mudança da concentração de etanol de 1ª ordem

$$\psi_W(\tau) = \beta \cdot e^{-\beta.(t-\tau)} .....[h^{-1}] \quad (A.15)$$

O modelo preconizado com as equações acima (Eq A.9 a A.15) foi usado pelos autores para simular operações de fermentação em batelada e contínuas com oscilações forçadas. As referidas equações também foram empregadas para simular um exemplo de fermentação de oscilação sustentada obtida na literatura.

A.1.2 Parâmetros do modelo fenomenológico

No esforço de modelagem em seu trabalho, Camêlo (2009) implementou o modelo fenomenológico de Daugulis et al. (1997) para representar o comportamento oscilatório exibido no processo de produção de etanol quando do emprego de *Zymomonas mobilis*. A autora relatou dificuldade em estimar parâmetros, mesmo pelo emprego de diferentes técnicas. Nesta condição, sugeriu uma determinação mais precisa dos fatores que desencadeiam as oscilações, levando em conta a rota bioquímica das bactérias *Zymomonas mobilis* e, assim, redefinir os parâmetros mais importantes.

Desta forma, Camêlo (2009) estimou os parâmetros α, β, λ, δ, a, b, Q_{Pmax} e $Y_{P/S}$ - por tentativa e erro. No entanto, os valores dos parâmetros cinéticos intrínsecos para *Zymomonas mobilis* P_{ob}, P_{ma}, P_{mb}, P_{me}, K_s, K_i, S_i, K_{mp}, e μ_{max} foram os mesmos obtidos por Daugulis et al. (1997) da literatura (Veeramallu e Agrawal, 1990 e Lee e Rogers, 1983 apud Daugulis et al., 1997).

Camêlo (2009) estimou os parâmetros para dois conjuntos de fermentações contínuas (FC), incluindo as fases em batelada em contínuo. A descrição completa de cada FC pode ser visualizada na Tabela 3.4 do Capítulo 3. Os conjuntos de fermentações estão descritos a seguir:

a) FC05 e FC06: fermentações apresentam comportamento oscilatório. A autora não conseguiu obter um único conjunto de parâmetros para representar a etapa em batelada e contínua com oscilação simultaneamente;

b) FC01 a FC04: fermentações tendem ao estado estacionário. A autora estimou um único conjunto de parâmetros para processo operado em batelada e contínuo concomitantemente.

As Tabelas A.1 e A.2 apresentam os parâmetros para o modelo de Daugulis et al. (1997) descritos acima.

Tabela A.1 – Parâmetros obtidos na literatura por Daugulis et al. (1997). Utilizados nas FC01 a FC04 e FC05 - FC06 de Camêlo (2009)

Parâmetros	Batelada e contínuo
μ_{max}	0,41
P_{ob}	59
P_{ma}	217
P_{mb}	108
P_{me}	120
S_i	80
K_i	200
K_s	0,5
K_{mp}	0,2
S_f	200

Fonte: Camêlo (2009).

A Tabela A.1 reporta os valores dos parâmetros obtidos por Daugulis et al. (1997) na literatura. Esses valores foram utilizados no modelo de Daugulis et al. (1997), na etapa operada em batelada e contínuo, das FC01, 02, 03, 04, 05 e 06 de Camêlo (2009).

Na Tabela A.2 estão os valores dos parâmetros estimados por Camêlo (2009) para uso no modelo proposto por Daugulis et al. (1997). A estimação foi feita nas FC01 a FC04 simultaneamente para operação em batelada / contínuo e nas FC05 e 06 separadamente para etapa em batelada e para o modo contínuo.

Tabela A.2 – Parâmetros estimados por Camêlo (2009) para uso nas FC01 a FC04 e FC05 - FC06

Parâmetros	FC01 a FC04	FC05 e FC06	
	Batelada e contínuo	Batelada	Contínuo
a	2,687	0,410	0,310
b	0,051	1,70	2,10
α	3,32	1,3	10,8
β	1,0	0,06	0,100
λ	1,0	3,8	21,05
δ	0,568	7,53	0,53
$Q_{P,\max}$	4,9	7,6	2,5
$Y_{p/s}$	0,232	0,486	0,495

Fonte: Camêlo (2009).

APÊNDICE B

MODELO CIBERNÉTICO - Jones e Kompala (1999)

B.1 MODELO CIBERNÉTICO

B.1.1 Equações do modelo cibernético

Jones e Kompala (1999) propuseram um modelo estruturado e não segregado para representar o crescimento dinâmico e comportamento diáuxico de levedura, desenvolvido a partir da estrutura de modelagem cibernética. No processo utilizaram *Saccharomyces cerevisiae* em meio contendo glicose em cultura aeróbica operada em batelada e contínuo.

A estrutura de modelagem cibernética baseia-se na hipótese de que os microorganismos otimizam a utilização do substrato disponível para maximizar sua taxa de crescimento durante todo o tempo (Jones e Kompala, 1999).

Desta forma, para desenvolver um detalhado modelo metabólico sem usar a observação experimental que os micro-organismos crescem em sua maior taxa de crescimento possível, seria necessário incorporar todas as informações sobre os percursos metabólicos individuais disponíveis para o organismo. Entretanto, seria árdua a tarefa de modelar muitas etapas enzimáticas individuais, juntamente com os processos celulares de regulação da repressão e a inibição da enzima. Invocando o ponto de vista cibernético, onde o resultado líquido de todos os processos celulares de regulação é destinado a otimizar a taxa de crescimento instantânea, Kompala et al. (1984) desenvolveram uma estrutura de modelagem geral. Essa estrutura de modelagem cibernética substitui a modelagem detalhada dos processos de regulação, onde as variáveis cibernéticas de controle $\mathbf{u_i}$ e $\mathbf{v_i}$ representam as estratégias ideais para a síntese e para a atividade da enzima, respectivamente. Para os valores da taxa de crescimento instantânea $\mathbf{r_i}$ ao longo das rotas metabólicas disponíveis, as estratégias ideais para $\mathbf{u_i}$ e $\mathbf{v_i}$ foram propostas como (Kompala et al., 1984 e 1986), como descrito abaixo:

Variável de controle cibernético da síntese enzimática na i-ésima rota

$$\mathbf{u_i} = \frac{\mathbf{r_i}}{\sum_j \mathbf{r_j}} \text{.....[adimensional]} \qquad \text{(B.1)}$$

Variável de controle cibernético da atividade enzimática na i-ésima rota

$$\mathbf{v_i} = \frac{\mathbf{r_i}}{\mathbf{max_j\, r_j}} \text{.....[adimensional]} \qquad \text{(B.2)}$$

sendo: $\mathbf{u_i}$ - variável de controle cibernético da síntese enzimática na i-ésima rota (adimensional); $\mathbf{v_i}$ - variável de controle cibernético da atividade enzimática na i-ésima rota (adimensional); $\mathbf{r_i}$ - taxa de crescimento na i-ésima rota (h^{-1}); $\mathbf{max_j\, r_j}$ - máxima taxa de crescimento para todas as rotas em algum instante (h^{-1}).

Então, se a taxa de crescimento $\mathbf{r_i}$ ao longo de uma rota metabólica individual é alta, as variáveis cibernéticas de síntese $\mathbf{u_i}$ e de atividade $\mathbf{v_i}$ da enzima catalítica chave ao longo desse caminho metabólico serão elevadas. Inversamente, se a taxa de crescimento $\mathbf{r_i}$ relativa a uma via metabólica é baixa, as variáveis cibernéticas de síntese $\mathbf{u_i}$ e de atividade $\mathbf{v_i}$ da enzima catalítica principal ao longo dessa rota metabólico serão baixas (Jones e Kompala, 1999).

Os valores das taxas de crescimento $\mathbf{r_i}$ ao longo de cada rota são modelados de acordo com a equação de taxa de Monod com uma modificação simples. Essa modificação estabelece que cada taxa de crescimento $\mathbf{r_i}$ é proporcional à concentração intracelular $\mathbf{e_i}$ de uma enzima chave, a qual controla cada via. Assim, para o processo fermentativo com *Saccharomyces cerevisiae* as três rotas viáveis disponíveis são descritas por (Jones e Kompala, 1999):

Taxa instantânea de crescimento na rota de fermentação da glicose

$$\mathbf{r_1 = \mu_1 e_1 \frac{G}{K_1 + G}} \text{.....}[g_{enzima1}\ g^{-1}_{célula}\ h^{-1}] \equiv h^{-1} \qquad \text{(B.3)}$$

Taxa instantânea de crescimento na rota de oxidação do etanol

$$\mathbf{r_2 = \mu_2 e_2 \frac{E}{K_2 + E}\ \frac{O}{K_{O_2} + O}} \text{.....}[g_{enzima2}\ g^{-1}_{célula}\ h^{-1}] \equiv h^{-1} \qquad \text{(B.4)}$$

Taxa instantânea de crescimento na rota de oxidação da glicose

$$\mathbf{r_3 = \mu_3 e_3 \frac{G}{K_3 + G}\ \frac{O}{K_{O_3} + O}} \text{.....}[g_{enzima3}\ g^{-1}_{célula}\ h^{-1}] \equiv h^{-1} \qquad \text{(B.5)}$$

onde G – concentração de glicose ($g\ L^{-1}$); E - concentração de etanol ($g\ L^{-1}$); O – concentração de oxigênio dissolvido ($g\ L^{-1}$); $\mathbf{\mu_i}$ - taxa específica de crescimento modificada da i-ésima rota (h^{-1}); $\mathbf{K_i}$ - constante de saturação para substrato de carbono da i-ésima rota

($g\ L^{-1}$); K_{O_i} - constante de saturação para oxigênio dissolvido da i-ésima rota ($g\ L^{-1}$). As constantes de saturação são específicas para cada rota metabólica.

No modelo cibernético original para *S. cerevisiae*, Kompala (1982 *apud* Jones e Kompala, 1999) considerou somente condições de cultura rica em oxigênio, mas Jones e Kompala (1999) incluíram termos de saturação de oxigênio para simular o efeito que a variação da concentração de oxigênio dissolvido tem na indução ou na inibição da síntese enzimática das vias oxidativas. Para as duas rotas oxidativas - expressas pelas Equações (B.4) e (B.5), o oxigênio dissolvido é considerado como um segundo substrato, sendo incluído nessas equações como um segundo termo de saturação.

Com essas equações de taxa de crescimento – Eq. (B.3), (B.4) e (B.5), as equações de balanço para culturas em batelada (taxa de diluição, D = 0) e operadas continuamente (taxa de diluição, D ≠ 0) podem ser escritas como segue:

Taxa de crescimento celular

$$\frac{dX}{dt} = \left(\sum_i r_i \upsilon_i - D\right) X \text{ .....}[g\ L^{-1}\ h^{-1}] \tag{B.6}$$

Taxa de consumo de substrato

$$\frac{dG}{dt} = (G_0 - G) D - \left(\frac{r_1 \upsilon_1}{Y_1} + \frac{r_2 \upsilon_2}{Y_2}\right) X - \varnothing_4 \left(C \frac{dX}{dt} + \frac{dC}{dt}\right) \text{ .....}[g\ L^{-1}\ h^{-1}] \tag{B.7}$$

Taxa de formação de produto

$$\frac{dE}{dt} = -DE + \left(\varnothing_1 \frac{r_1 \upsilon_1}{Y_1} - \frac{r_2 \upsilon_2}{Y_2}\right) X \text{ .....}[g\ L^{-1}\ h^{-1}] \tag{B.8}$$

Taxa de consumo de oxigênio dissolvido:

$$\frac{dO}{dt} = K_{La}\left(O^* - O\right) - \left(\varnothing_2 \frac{r_2 \upsilon_2}{Y_2} + \varnothing_3 \frac{r_3 \upsilon_3}{Y_3}\right) X \text{ .....}[g\ L^{-1}\ h^{-1}] \tag{B.9}$$

Taxa de formação das três enzimas intracelulares:

$$\frac{de_i}{dt} = \alpha u_i \frac{S_i}{K_i + S_i} - \left(\sum_j \left(r_j \upsilon_j\right) + \beta\right) e_i + \alpha^* \text{ .....}[g_{\text{enzima i}}\ g^{-1}{}_{\text{célula}}\ h^{-1}] \equiv h^{-1} \tag{B.10}$$

Taxa de armazenamento de carboidrato intracelular:

$$\frac{dC}{dt} = \gamma_3 r_3 \upsilon_3 - \left(\gamma_1 r_1 \upsilon_1 + \gamma_2 r_2 \upsilon_2\right) C - \sum_i \left(r_i \upsilon_i\right) C \text{ .....}[h^{-1}] \tag{B.11}$$

onde X – concentração mássica de célula ($g\ L^{-1}$); D – taxa de diluição (h^{-1}); C – fração mássica de armazenamento intracelular de carboidrato ($g_{\text{carboidrato}}\ g^{-1}{}_{\text{célula}}$); G_o – concentração de glicose na alimentação ($g\ L^{-1}$ - para culturas em contínuo); K_{La} – coeficiente de transferência de oxigênio em massa (h^{-1}); O^* - limite de solubilidade do oxigênio dissolvido

($g\ L^{-1}$); Y – coeficiente de rendimento ($g_{célula}\ g^{-1}_{substrato}$); $\varnothing_i$ – parâmetro estequiométrico para diferentes substratos ($g\ g^{-1}$); e_i – concentração de enzima da i-ésima rota metabólica ($g_{enzima}\ g^{-1}_{célula}$); S_i – concentração de substrato de carbono para a i-ésima rota metabólica ($g\ L^{-1}$); γ_i – parâmetro estequiométrico para armazenamento intracelular da síntese e do consumo de carboidrato ($g\ g^{-1}$); α - taxa específica de síntese enzimática (h^{-1}); β - taxa específica de decomposição enzimática (h^{-1}).

A variável cibernética $\mathbf{v_i}$, representando o mecanismo de regulação intracelular de ativação / inibição da enzima, modula a taxa metabólica $\mathbf{r_i}$ para cada percurso e, portanto, aparece em conjunto em todas as equações de equilíbrio.

A variável cibernética $\mathbf{u_i}$, que representa o mecanismo de regulação intracelular de síntese / repressão enzimática, aparece apenas na Eq. (B.10) para as três enzimas intracelulares.

Além das equações de balanço de massa da célula, da glicose, do etanol, do oxigênio dissolvido e das enzimas intracelulares principais, foi incluída uma equação de equilíbrio adicional para armazenamento e uso de carboidrato (Eq. B.11). Panek (1962 e 1963 *apud* Jones e Kompala, 1999) mostrou que há rápido acúmulo dos carboidratos próximo ao final da fase de crescimento celular em meio contendo glicose, sendo estes rapidamente consumidos quando o rápido consumo de etanol começa. A síntese intracelular de carboidratos e os termos de consumo são baseados nesses dados cinéticos. O último termo dessa equação (Eq. B.11) representa a diluição desse elemento intracelular, devido ao crescimento celular. Os dois últimos termos na equação de equilíbrio para a glicose (Eq. B.7) representam a síntese e consumo de carboidrato armazenado intracelularmente, respectivamente. O efeito desses dois termos da equação de balanço de glicose (Eq. B.7) nas simulações da cultura em batelada é mínima e, na ausência de algum dado comparativo sobre o armazenamento intracelular de carboidratos, pode ser ignorado juntamente com a equação de equilíbrio geral para carboidratos (Eq. B.11), sem qualquer efeito significativo sobre o resto do modelo.

Turner e Ramkrishna (1988 *apud* Jones e Kompala, 1999) demonstraram que a inclusão de um pequeno termo constitutivo de síntese para todas as enzimas $\boldsymbol{\alpha}^*$ (h^{-1}) é importante na previsão da indução enzimática. Com a inclusão da concentração intracelular da principal enzima em cada equação de taxa (Eq. B.3 - B.5), a taxa de crescimento específico constante $\boldsymbol{\mu_i}$ (h^{-1}) nestas equações está relacionada à taxa específica de crescimento máxima $\boldsymbol{\mu_{i,max}}$ (h^{-1}). $\boldsymbol{\mu_{i,max}}$ é determinada experimentalmente. A equação para $\boldsymbol{\mu_i}$ é expressa como:

Taxa específica de crescimento na i-ésima rota

$$\mu_i = \mu_{i,max} \frac{\mu_{i,max} + \beta}{\alpha + \alpha^*} .....[h^{-1}] \quad (B.12)$$

A taxa específica de produção de dióxido de carbono q_{CO_2} (h^{-1}), a taxa específica de consumo de oxigênio q_{O_2} (h^{-1}) e o quociente respiratório **RQ** (adimensional) foram calculados a partir de coeficientes estequiométricos conhecidos de acordo com estas equações:

Taxa específica de produção de dióxido de carbono:

$$q_{CO_2} = \sum_i \frac{\varnothing_i r_i \upsilon_i}{Y_i} .....[h^{-1}] \quad (B.13)$$

Taxa específica de consumo de oxigênio:

$$q_{O_2} = \sum_{i=2,3} \frac{\varnothing_i r_i}{Y_i} .....[h^{-1}] \quad (B.14)$$

Quociente respiratório:

$$RQ = \frac{q_{CO_2}}{q_{O_2}} .....[\text{adimensional}] \quad (B.15)$$

Esse modelo cibernético é uma expansão do modelo proposto por Kompala (1982 *apud* Jones e Kompala, 1999) para as culturas de leveduras. Ele permite simular a dinâmica de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em batelada e em processos contínuos, também em condições limitantes de oxigênio.

B.1.2 Condições de processo: modelo cibernértico

As condições iniciais utilizadas por Jones e Kompala (1999) para as simulações do modelo foram obtidas dos gráficos do artigo, utilizando o programa PEGA PONTO (Oliveira et al., 2006), como especificado a seguir:

a) dados experimentais para concentrações iniciais de célula (X), consumo de glicose (G) e formação de etanol (E): retirados dos pontos experimentais da figura de simulação e dados experimentais de von Meyenburg (1969 *apud* Jones e Kompala, 1999) para concentrações de células, glicose e etanol em cultura aeróbica em batelada de *Saccharomyces cerevisiae*;

b) dados das concentrações iniciais das enzimas chave da fermentação da glicose (e_1), da oxidação do etanol (e_2) e da oxidação da glicose (e_3): obtidas das curvas simuladas da figura das simulações do modelo cibernético para as concentrações das enzimas das três

principais rotas metabólicas disponíveis para *Saccharomyces cerevisiae* em cultura aeróbica em batelada;

c) dados das condições iniciais para as concentrações de oxigênio dissolvido (O) e de carboidrato intracelular: foram obtidas dos gráficos da figura das predições do modelo cibernético de oscilações estáveis em culturas contínuas de *Saccharomyces cerevisiae* observadas em massa celular / oxigênio dissolvido e em concentrações de glicose / etanol, bem como de carboidrato armazenado intracelularmente.

As condições iniciais descritas acima estão relacionadas na Tabela B.1.

Tabela B.1 - Condições iniciais das variáveis de processo para simulações do modelo cibernético proposto por Jones e Kompala (1999)

Nº	**Variáveis processo**	**Descrição**	**Valores**	**Unidades**
1	X(0)	Concentração celular	0,046	$g\ L^{-1}$
2	G(0)	Concentração de glicose	9,0	$g\ L^{-1}$
3	E(0)	Concentração de etanol	0,0	$g\ L^{-1}$
4	O(0)	Concentração de oxigênio dissolvido	1,5642	$mg\ L^{-1}$
5	$e_1(0)$	Concentração intracelular da enzima-chave da rota metabólica de fermentação da glicose	0,021552	$g_{enzima}\ g^{-1}_{célula}$
6	$e_2(0)$	Concentração intracelular da enzima-chave da rota metabólica de oxidação do etanol	0,021552	$g_{enzima}\ g^{-1}_{célula}$
7	$e_3(0)$	Concentração intracelular da enzima-chave da rota metabólica de oxidação da glicose	0,20518	$g_{enzima}\ g^{-1}_{célula}$
8	C(0)	Fração mássica de armazenamento intracelular de carboidrato	0,0001	$g_{substrato}\ g^{-1}_{celula}$

Para o processo em contínuo os demais parâmetros de operação são apresentados na Tabela B.2.

Tabela B.2-Condições de processo para simulações do modelo cibernético proposto por Jones e Kompala (1999)

Parâmetro do modelo	Valores			Descrição	Unidade
	Cultura em batelada	Cultura em contínuo			
D	0,0	0,16		Taxa de diluição	h^{-1}
G_0	0,0	28,0		Concentração de glicose na alimentação	$g\ L^{-1}$

B.1.3 Parâmetros do modelo cibernértico

Jones e Kompala (1999) propuseram os conjuntos de parâmetros apresentados na Tabela B.3. Nessa Tabela também foram relacionados as origens de cada parâmetro empregado pelo autores.

Os autores fazem considerações quanto às simulações e quanto às características dos conjuntos de parâmetros empregados:

(1) as simulações do modelo cibernético foram realizadas empregando os valores dos parâmetros obtidos para a cultura contínua com oscilação. Contudo, consideram a possibilidade deste não ser o melhor conjunto de valores de parâmetros para a exata comparação com os dados experimentais em todas as diferentes observações de oscilações em levedura;

(2) no entanto, usaram esse conjunto único de valores de parâmetros para demonstrar as características qualitativas da literatura experimental;

(3) os parâmetros obtidos para a simulação da cultura contínua com oscilação são similares aos valores determinados para a simulação das culturas em batelada e em contínuo (contínua sem oscilação). Explicam, ainda, que a única razão para as pequenas diferenças em alguns valores foi a realização das simulações da cultura contínua com oscilações com dupla precisão (Jones, 1995 *apud* Jones e Kompala, 1999), antes que as curvas de ajuste para as culturas em batelada e em contínuo fossem feitas. Afirmam também que a referida constatação foi confirmada.

Tabela B.3 - Parâmetros do modelo usados para simulação das operações de batelada e contínuas, com as origens de cada parâmetro (Jones e Kompala, 1999)

Parâmetro do modelo	Valores			Descrição	Unidade	Origem
	Cultura em batelada	Cultura em contínuo	Cultura contínua com oscilações			
α	1,0	1,0	0,3	Taxa de síntese enzimática	h^{-1}	Modelo cibernético de Kompala et al (1984)
β	0,2	0,2	0,7	Taxa de degradação enzimática	h^{-1}	
$\mu_{1,\,max}$	0,45	0,44	0,44	Taxa específica de crescimento máxima para a rota de fermentação da glicose	h^{-1}	Determinado experimentalmente por métodos padrão
$\mu_{2,\,max}$	0,2	0,32	0,19	Taxa específica de crescimento máxima para a rota de oxidação do etanol	h^{-1}	
$\mu_{3,\,max}$	0,33	0,31	0,36	Taxa específica de crescimento máxima para a rota de oxidação da glicose	h^{-1}	Não é determinado diretamente a partir dos dados de von Meyenburg (1969 *apud* Jones e Kompala, 1999), tendo em vista a dificuldade em função da incerteza do papel metabólico da glicose durante operação em batelada e em contínuo. Os dados experimentais indicam que a oxidação da glicose no processo em batelada não é significativa, contudo na operação contínua à baixas taxas de diluição ($D < 0{,}24\ h^{-1}$) torna-se predominante. Não obstante, as evidências são claras ao indicar que a mudança metabólica ocorre por volta de $0{,}24\ h^{-1}$, mas exatamente qual o papel a oxidação da glicose desempenha em taxas de diluição maiores que $0{,}24\ h^{-1}$, não é facilmente determinado
Y_1	0,15	0,16	0,16	Coeficiente de rendimento da rota de fermentação da glicose	$g_{célula}\ g^{-1}_{glicose}$	Determinado experimentalmente por métodos padrão
Y_2	0,74	0,74	0,75	Coeficiente de rendimento da rota de oxidação do etanol	$g_{célula}\ g^{-1}_{etanol}$	
Y_3	0,5	0,5	0,60	Coeficiente de rendimento da rota de oxidação da glicose	$g_{célula}\ g^{-1}_{glicose}$	

Continuação da **Tabela B.3**

Parâmetro do modelo	Valores			Descrição	Unidade	Origem
	Cultura em batelada	Cultura em contínuo	Cultura contínua com oscilações			
K_1	0,1	0,1	0,05	Constante de saturação para via de fermentação da glicose	$g\ L^{-1}$	- Não pode ser determinado diretamente dos dados experimentais presentes na literatura; - K_1: valor apropriado pode ser obtido das simulações dos modelos cibernéticos; - K_2: sem comentários dos autores; - $K_3 = 10^{-2}K_1$ (valor escolhido pelos autores porque K_3 da oxidação da glicose deve ser menor que o K_1 da fermentação da glicose)
K_2	0,02	0,02	0,01	Constante de saturação para via de oxidação do etanol	$g\ L^{-1}$	
K_3	0,001	0,001	0,001	Constante de saturação para via de oxidação da glicose	$g\ L^{-1}$	
$\varnothing_1$	0,41	0,27	0,403	Parâmetro estequiométrico para substrato glicose (fermentação)	$g\ g^{-1}$	Podem ser determinados: - pelo proposição das relações estequiométricas adequadas para as equações de reação da via metabólica; ou - a partir de experimentos apresentados na literatura
$\varnothing_2$	1,067	1,067	2000	Parâmetro estequiométrico para substrato etanol (oxidação)	$g\ g^{-1}$	
$\varnothing_3$	2,087	2,087	1000	Parâmetro estequiométrico para substrato glicose (oxidação)	$g\ g^{-1}$	
$\varnothing_4$	0,95	0,95	0,95	Parâmetro estequiométrico para carboidrado intracelular	$g\ g^{-1}$	
K_La	350,0	1200,0	225,0(2)	Coeficiente de transferência de massa de oxigênio dissolvido	h^{-1}	Retirados de Bandyopadhyay et al. (1967 *apud* Jones e Kompala, 1999). Tab 1 Jones e Kompala (1999)
O^*	7,5(1)	7,5(1)	7,5	Limite de solubilidade de oxigênio dissolvido	$mg\ L^{-1}$	Retirados de Bandyopadhyay et al. (1967 *apud* Jones e Kompala, 1999). Item 2.4 pág 118 Jones e Kompala 1999
K_{O2}	0,0001	0,0001	0,01	Constantes de saturação de oxigênio para a rota de oxidação do etanol	$mg\ L^{-1}$	- Desconhecido; - Escolhido pequeno o suficiente para não inibir o crescimento simulado em glicose em cultura suficientemente aeradas

Continuação da **Tabela B.3**

Parâmetro do modelo	Valores			Descrição	Unidade	Origem
	Cultura em batelada	Cultura em contínuo	Cultura contínua com oscilações			
K_{O3}	0,0001	0,0001	2,2	Constantes de saturação de oxigênio para a rota de oxidação da glicose	mg L^{-1}	- Desconhecido; - NÃO tem grande importância para as simulações em batelada porque o modelo cibernético não prediz metabolismo de oxidação da glicose significante nesta fase de crescimento
γ_1	10,0	6,0	10,0	Parâmetro estequiométrico para armazenamento intracelular da síntese e do consumo de carboidrato (fermentação de glicose)	g g^{-1}	Podem ser determinados: - pelo encontro das relações estequiométricas adequadas para as equações de reação da via metabólica; ou - a partir de experimentos apresentados na literatura
γ_2	10,0	6,0	10,0	Parâmetro estequiométrico para armazenamento intracelular da síntese e do consumo de carboidrato (oxidação de etanol)	g g^{-1}	
γ_3	0,1	0,3	0,8	Parâmetro estequiométrico para armazenamento intracelular da síntese e do consumo de carboidrato (oxidação de glicose)	g g^{-1}	
α^*	0,1	0,1	0,0001(3)	Síntese de enzima constitutiva	h^{-1}	Retirado de Turner e Ramkrishna (1988 *apud* Jones e Kompala, 1999)

APÊNDICE C

DADOS EXPERIMENTAIS DE CAMÊLO (2009)

Este apêndice apresenta as figuras contendo os dados experimentais referentes às concentrações de células, glicose e de etanol das fermentações contínuas FC02, 03, 04, 06, 07, 08, 09, 10 e 11. As FC01 e 05 são exibidas no Capítulo 3 para exemplificar as dinâmicas observadas no processo fermentativo.

Como pode ser observado na Tabela 3.3 e nas figuras abaixo, os dados experimentais correspondentes às fermentações contínuas (FC) realizadas por Camêlo (2009) apresentam dois comportamentos dinâmicos característicos na fase contínua de operação, quais sejam, tendência ao estado estacionário ou ao comportamento oscilatório. Neste contexto, as FC estão distribuídas da seguinte forma:

a) FC02, 03, 04, 08, 09, 10 e 11: tendem ao estado estacionário;

b) FC06 e 07: tendem ao comportamento oscilatório.

A Figura C.1 apresenta dos dados experimentais referentes à FC02.

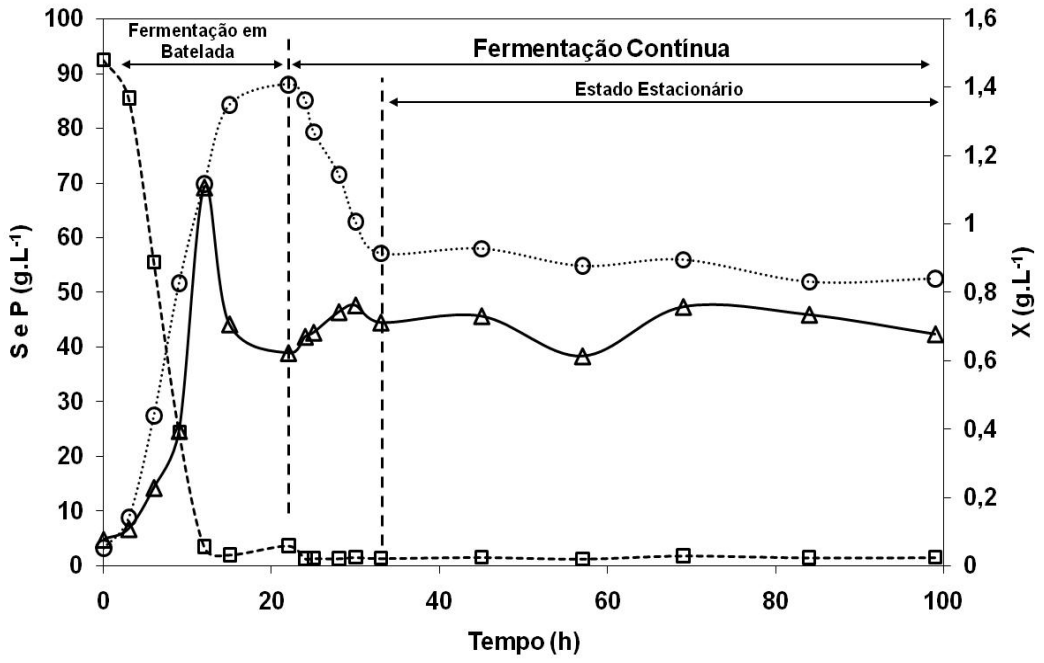


Figura C.1 – Fermentação Contínua (FC02) – (⊙) Células (X), (-□-) Glicose (S), (-△-) Etanol (P) (Camêlo, 2009)

A Figura C.2 apresenta dos dados experimentais da FC03.

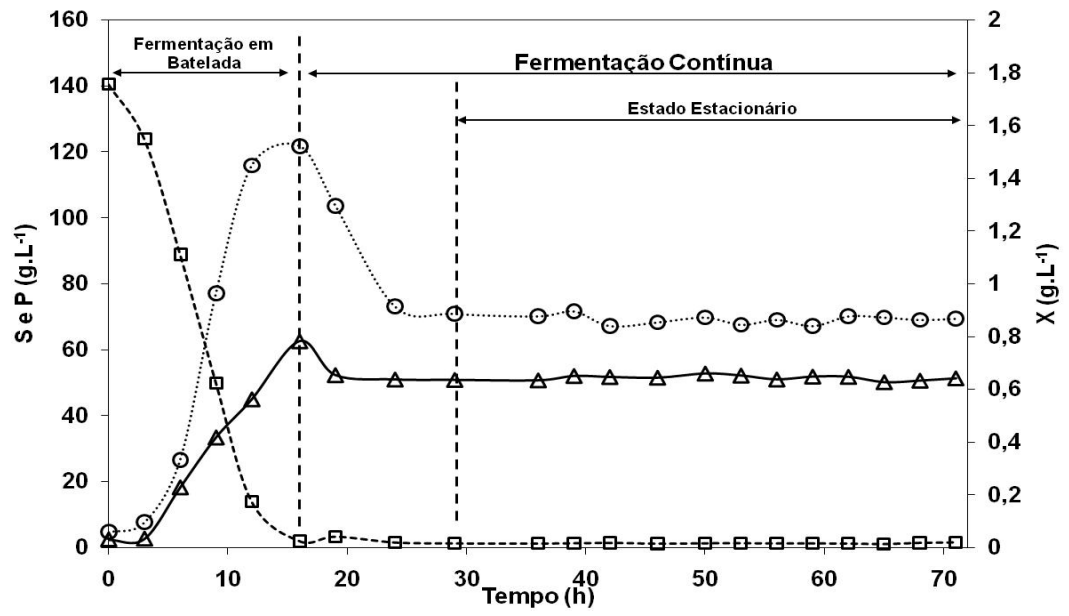


Figura C.2 - Fermentação Contínua (FC03) – (⊙) Células (X), (-⊡-) Glicose (S), (△) Etanol (P) (Camêlo, 2009)

A Figura C.3 apresenta dos dados experimentais relativos à FC04.

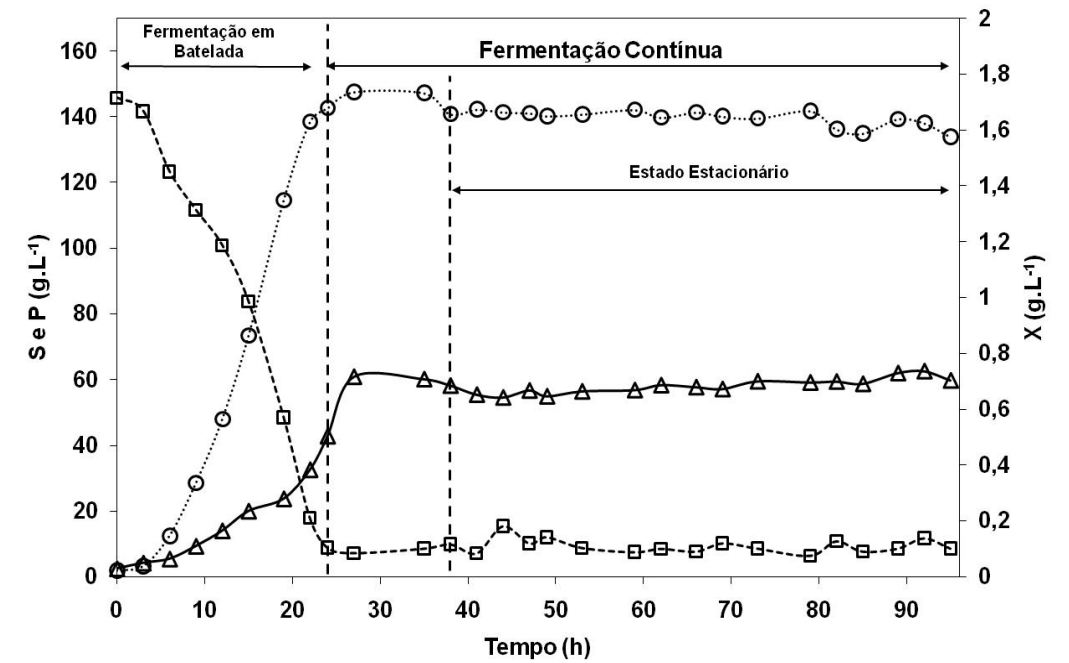


Figura C.3 – Fermentação Contínua (FC04) – (⊙) Células (X), (-⊡-) Glicose (S), (△) Etanol (P) (Camêlo, 2009)

A Figura C.4 apresenta dos dados experimentais da FC06.

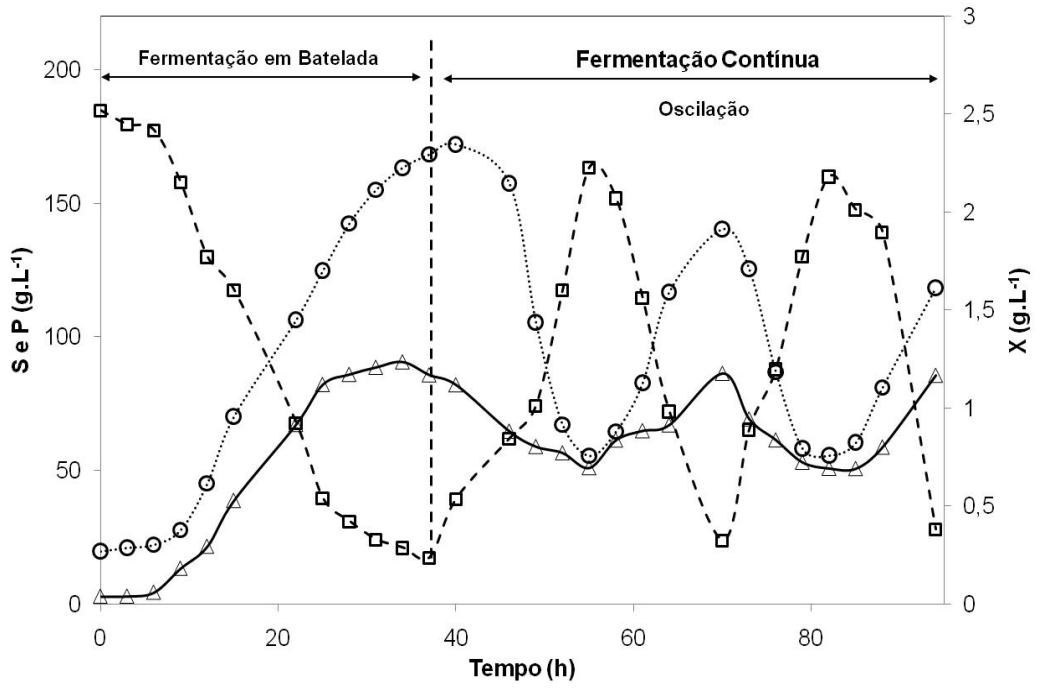


Figura C.4 – Fermentação Contínua (FC06) – (⊙) Células (X), (-□-) Glicose (S), (△) Etanol (P) (Camêlo, 2009)

A Figura C.5 apresenta dos dados experimentais relativos à FC07.

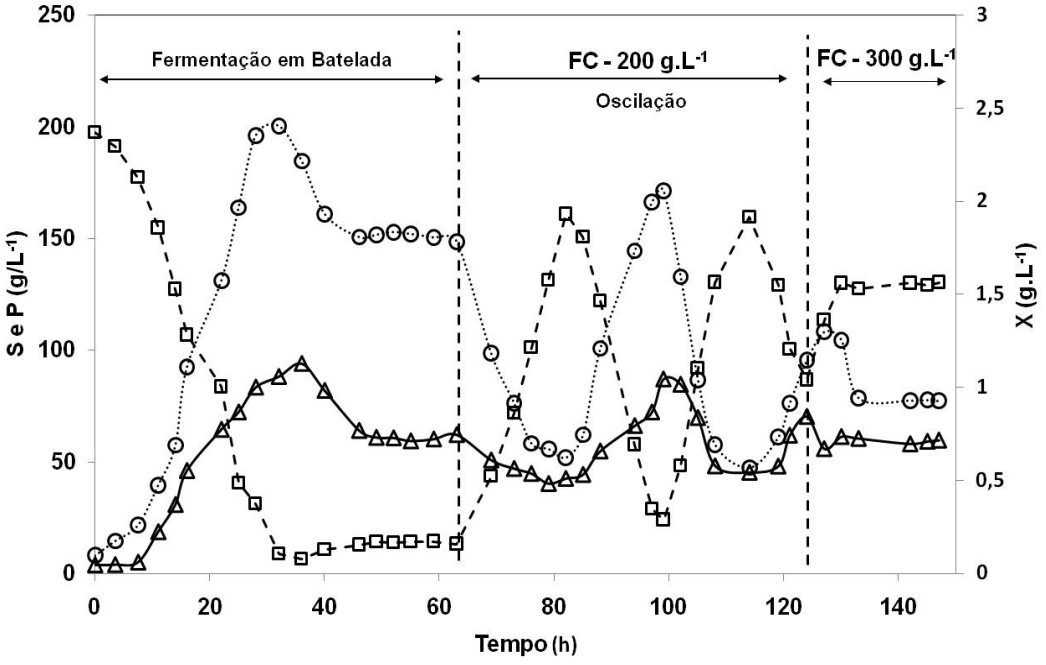


Figura C.5 – Fermentação Contínua (FC07) – (⊙) Células (X), (-□-) Glicose (S), (△) Etanol (P) (Camêlo, 2009)

A Figura C.6 apresenta dos dados experimentais referentes à FC08.

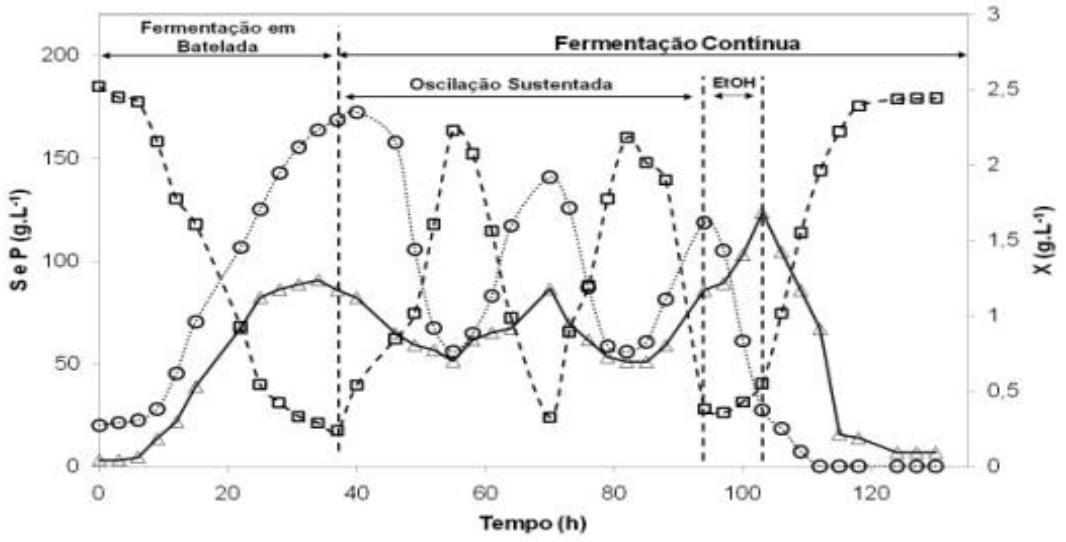


Figura C.6 – Fermentação Contínua (FC08) – (○) Células (X), (-□-) Glicose (S), (△) Etanol (P) (Camêlo, 2009). A FC08 é continuação da FC06, iniciando-se em t = 94 h com adicção de etanol exógeno (EtOH)

A Figura C.7 apresenta dos dados experimentais da FC09.

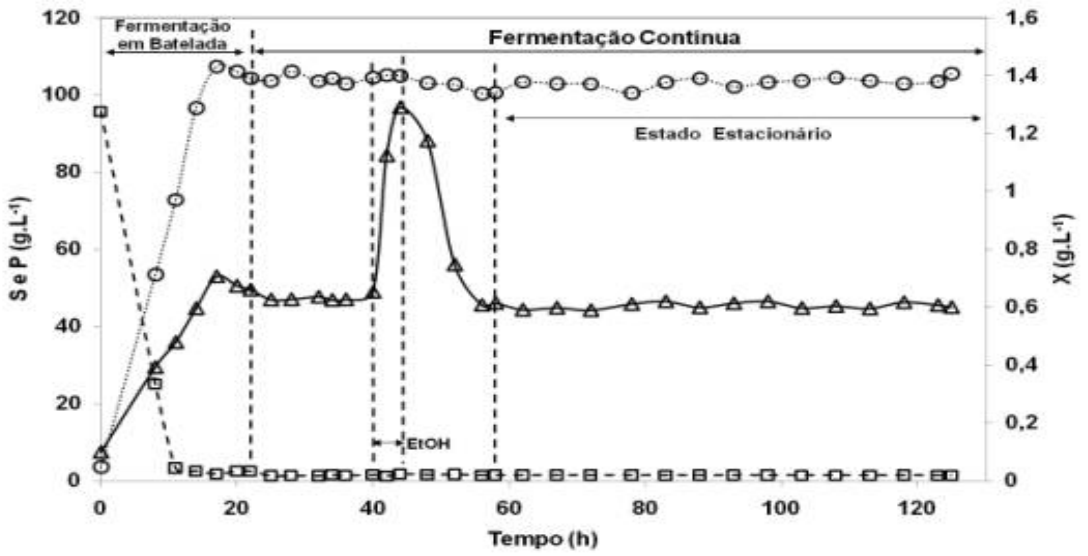


Figura C.7 – Fermentação Contínua (FC09) – (○) Células (X), (-□-) Glicose (S), (△) Etanol (P) (Camêlo, 2009)

A Figura C.8 apresenta dos dados experimentais relativos à FC10.

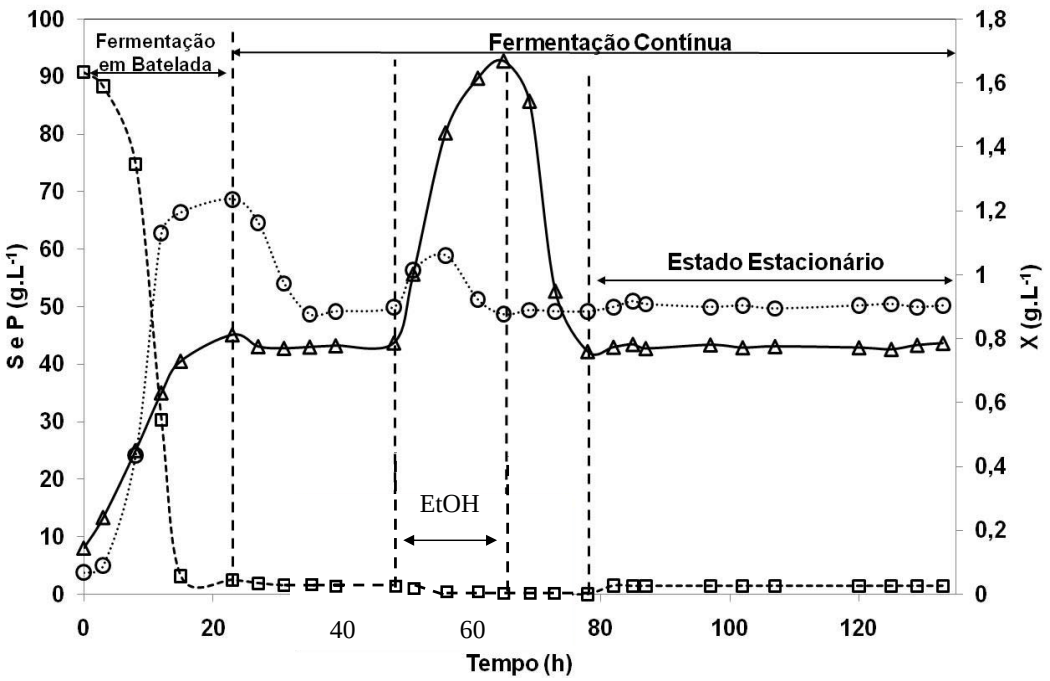


Figura C.8 – Fermentação Contínua (FC10) – (○) Células (X), (-□-) Glicose (S), (△) Etanol (P) (Camêlo, 2009)

A Figura C.9 apresenta dos dados experimentais referentes à FC11.

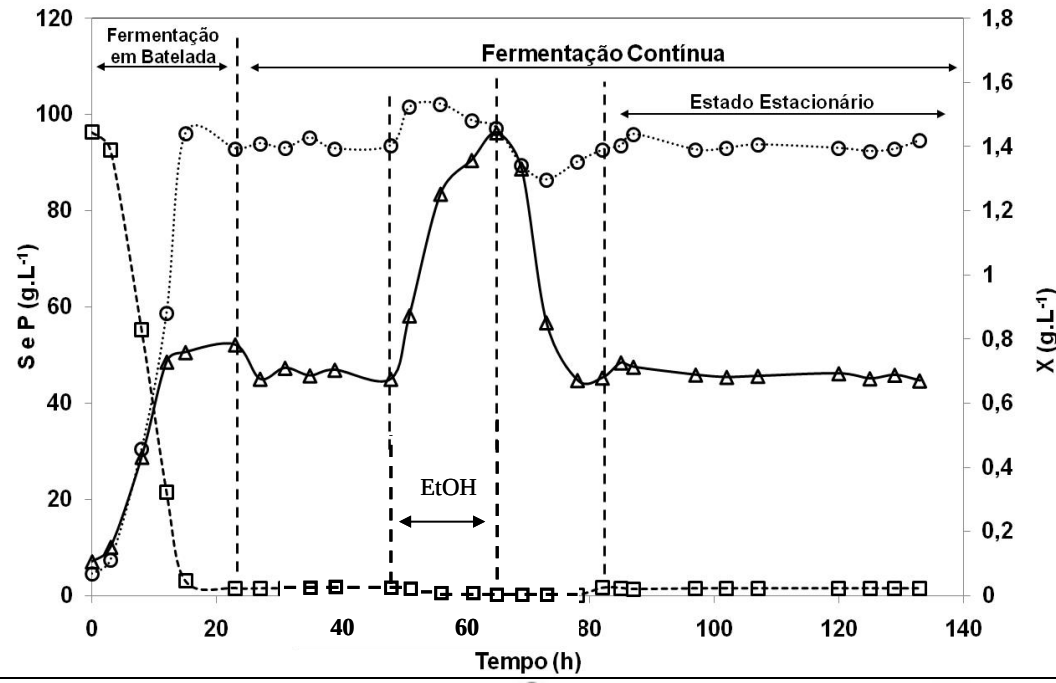


Figura C.9 – Fermentação Contínua (FC11) – (○) Células (X), (-□-) Glicose (S), (△) Etanol (P) (Camêlo, 2009)

APÊNDICE D

MODELO HÍBRIDO CIBERNÉTICO/NEURONAL (MHCN) – TESTE 1

Este apêndice apresenta as figuras contendo as respostas do MHCN referentes às concentrações de células, glicose e de etanol das fermentações contínuas cujo comportamento da curva simulada em relação aos dados experimentais é semelhante ao da figura apresentada na sessão 5.3 do Capítulo 5 para o Teste 1 e Teste 1 com correção do erro de predição.

D.1 MHCN alimentado com variáveis experimentais (E_{Exp} X_{Exp} e G_{Exp}) - Teste 1

Como descrito no Capítulo 5, o presente teste investigará a capacidade de predição do comportamento dinâmico complexo do processo de produção de etanol pelo MHCN quando da disponibilidade completa das medições a cada tempo de amostragem. Nesta condição de teste do MHCN, a rede neuronal MPL.51 será realimentada pelos valores experimentais interpolados a partir dos dados experimentais das concentrações de etanol, de células e de glicose (E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp}).

As fermentações contínuas FC01, 02, 04, 05 e 06, bem como as Tabelas 5.6, 5.7 e 5.8 com os critérios estatísticos correspondentes, estão dispostos na sessão 5.3.1 do Capítulo 5.

D.1.1 Fermentação contínua 03 (FC03)

As simulações para a FC03 são apresentadas na Figura D.1.

A regressão linear para concentração de etanol, constante da Tabela 5.6, mostra coeficiente de determinação bom, erro quadrático médio não muito elevado, coeficiente angular tendendo à unidade e o coeficiente linear alto. Logo, na Figura D.1 pode-se considerar que a respectiva curva simulada pelo MHCN não sobrepõe os dados experimentais, pois se afasta dos mesmos a partir do ponto nº 40 da sequência de dados. No entanto, representa a tendência do comportamento de estado estacionário da FC03.

Para a concentração de células, a regressão linear mostrada na Tabela 5.7 revelou coeficiente de determinação excelente, erro quadrático médio baixíssimo, coeficiente angular próximo à unidade e coeficiente linear tendendo a zero. Consequentemente, verifica-se na

Figura D.1 ser razoável assumir que a correspondente curva simulada pelo MHCN sobrepõe os dados experimentais, com um leve afastamento na fase inicial e prediz a tendência do comportamento de estado estacionário.

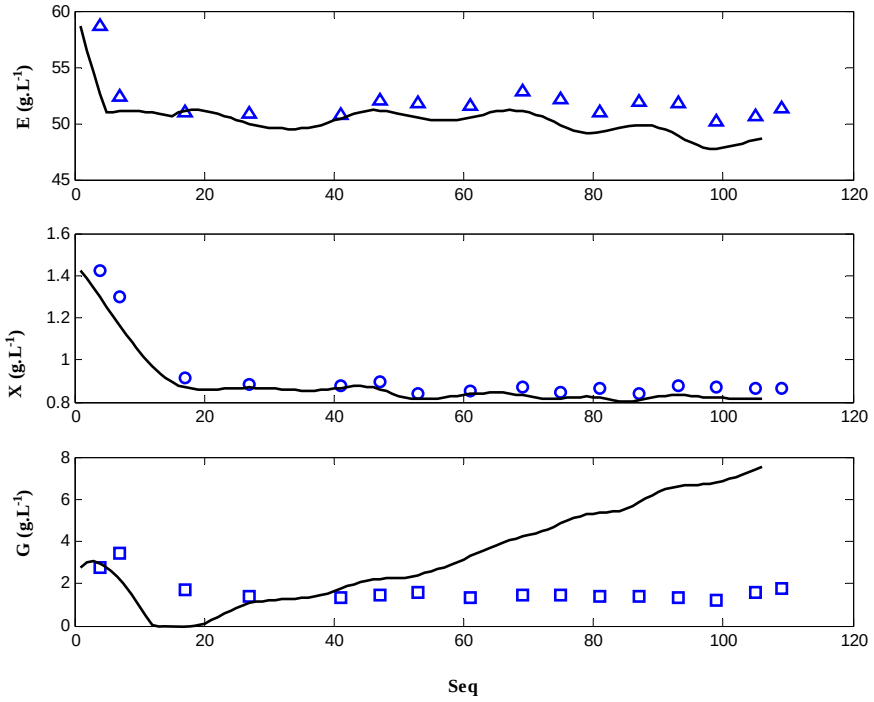


Figura D.1 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC03 – Teste 1. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

Na Tabela 5.8 é apresentada a regressão linear para concentração de glicose tendo coeficiente de determinação muito baixo, erro quadrático médio não muito alto, coeficiente angular não tendendo à unidade e coeficiente linear alto. Portanto, na Figura D.1 tem-se que a correlata curva simulada pelo MHCN não é capaz de predizer comportamento de estado estacionário e também não reproduz o valor dos dados experimentais.

D.1.2 Fermentação contínua 07 (FC07)

Na Figura D.2 são apresentadas as respostas do MHCN para a FC07.

Verificando a regressão linear para concentração de etanol, exibida na Tabela 5.6, observa-se coeficiente de determinação muito bom, erro quadrático médio alto, coeficiente angular igual a um e coeficiente linear alto. Deste modo, na Figura D.2 não é conveniente considerar que a respectiva curva simulada pelo MHCN prediga com boa aproximação os valores dos dados experimentais, visto as condições dos parâmetros estatísticos e da

aproximação gráfica. Todavia, o MHCN mostra-se capaz em representar o comportamento oscilatório da curva de dados experimentais.

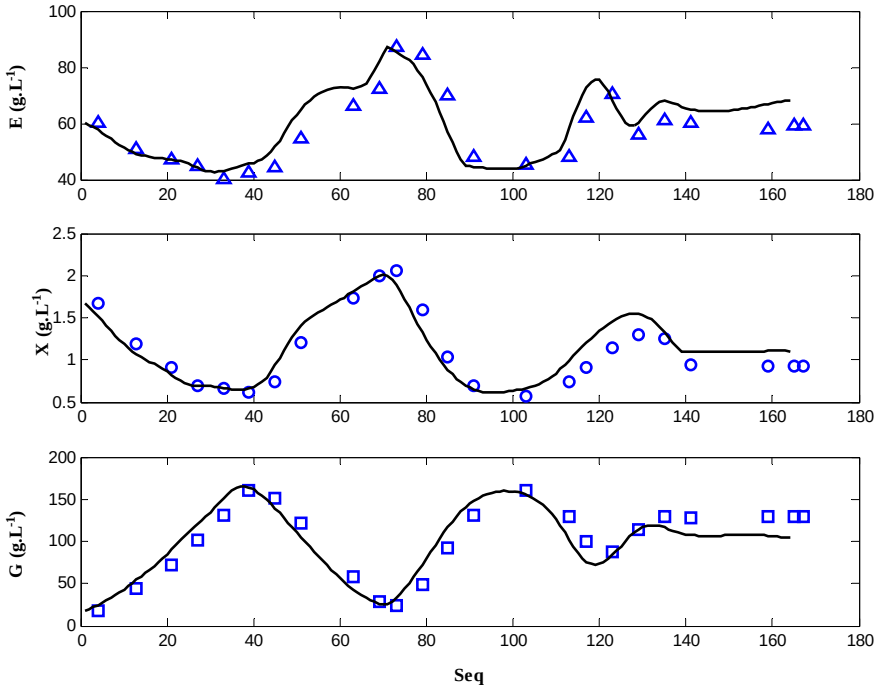


Figura D.2 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC07 – Teste 1. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

Para a concentração de células, a regressão linear mostrada na Tabela 5.7 apresenta coeficiente de determinação muito bom, erro quadrático médio baixíssimo, coeficiente angular muito próximo à unidade e coeficiente linear tendendo a zero. Muito embora a curva simulada pelo MHCN da Figura D.2 para a concentração celular apresente alguns pequenos desvios em relação aos dados experimentais, associando a análise gráfica à avaliação dos critérios estatísticos, é possível considerar a capacidade do modelo em predizer com aproximação suficiente os valores dos dados experimentais. Nesta mesma condição, o comportamento oscilatório da fermentação é representado convenientemente.

Da regressão linear mostrada na Tabela 5.8 para a concentração de glicose observa-se coeficiente de determinação muito bom, erro quadrático médio muito alto, coeficiente angular muito próximo à unidade e coeficiente linear alto. Nestas condições, em função dos critérios estatísticos, não se pode assumir que a correspondente curva simulada pelo MHCN na Figura D.2 comprove sua capacidade para a predição dos valores experimentais pois, apesar da boa proximidade da curva no gráfico, principalmente o erro quadrático médio inviabiliza tal

consideração. Entretanto, pode se afirmar que o MHCN prediz o comportamento oscilatório da FC07 com muito boa aproximação.

D.1.3 Fermentação contínua 10 (FC10)

Na Figura D.3 encontram-se as simulações para a FC10.

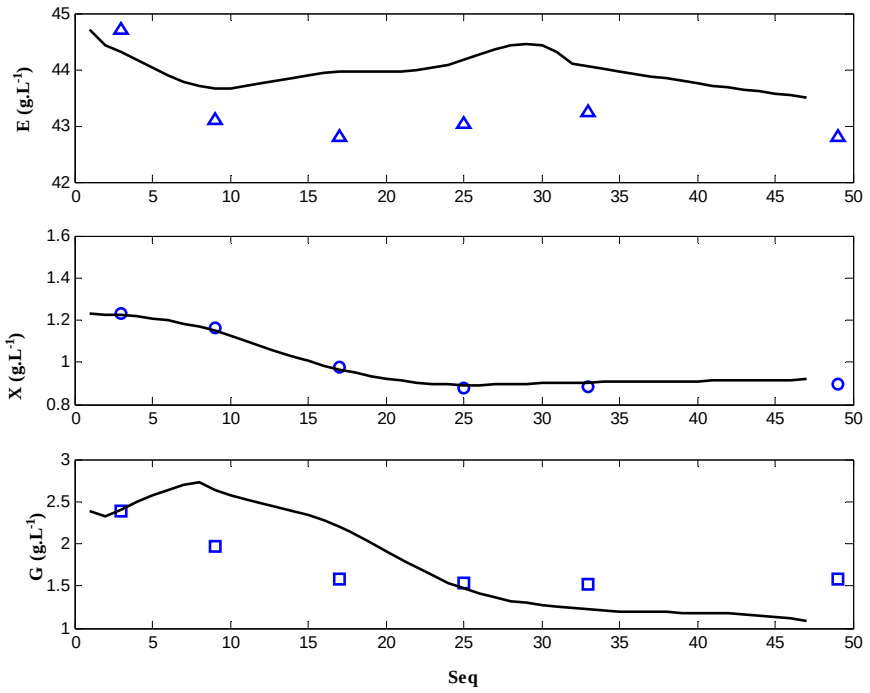


Figura D.3 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC10 – Teste 1. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

A regressão linear para concentração de etanol, apresentada da Tabela 5.6, esboça coeficiente de determinação bom, erro quadrático médio relativamente baixo, coeficiente angular não tendendo à unidade e coeficiente linear muito alto. Logo, na Figura D.3 verifica-se que a respectiva curva simulada pelo MHCN não sobrepõe os dados experimentais, no entanto não esboça afastamento acentuado em relação aos mesmos. Pode-se considerar que segue a tendência do comportamento de estado estacionário apresentado pela FC10.

Na regressão linear registrada na Tabela 5.7, referente à concentração de células, são revelados o coeficiente de determinação excelente, erro quadrático médio baixíssimo, coeficiente angular muito próximo da unidade e coeficiente linear tendendo a zero. Deste modo, observa-se na Figura D.3 que a correspondente curva simulada pelo MHCN exibe

capacidade preditiva dos dados experimentais. O comportamento de estado estacionário da fermentação é representado adequadamente.

A Tabela 5.8 encerra regressão linear relativa à concentração de glicose, tendo coeficiente de determinação muito baixo, erro quadrático médio relativamente baixo, coeficiente angular não tendendo à unidade e coeficiente linear tendendo a zero. Neste panorama, na Figura D.3 tem-se que a correlata curva simulada pelo MHCN não é capaz de predizer os valores dos dados experimentais, além de não predizer o comportamento de estado estacionário da FC10.

D.1.4 Fermentação contínua 11 (FC11)

As respostas do MHCN para a FC11 estão na Figura D.4.

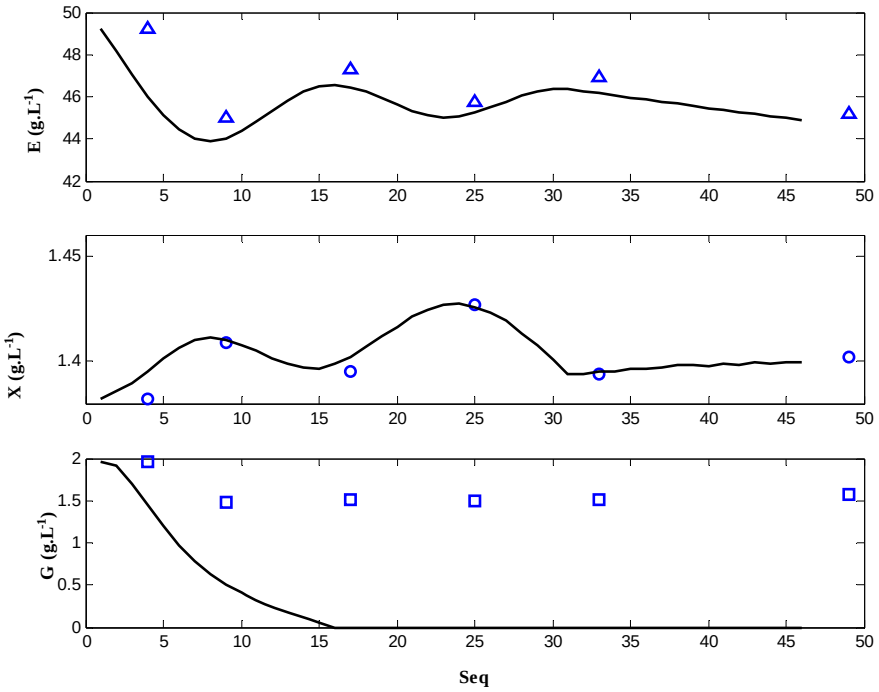


Figura D.4 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC11 – Teste 1. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

A regressão linear para concentração de etanol, apresentada na Tabela 5.6, mostra coeficiente de determinação bom, erro quadrático médio relativamente baixo, coeficiente angular muito próximo à unidade e coeficiente linear alto. Desta forma, na Figura D.4 verifica-se que a respectiva curva simulada pelo MHCN não sobrepõe os dados experimentais, muito embora esteja muito próxima destes valores. Todavia reproduz a tendência ao estado estacionário da FC11.

Para a concentração de células, a regressão linear mostrada na Tabela 5.7 revela coeficiente de determinação muito bom, erro quadrático médio baixíssimo, coeficiente angular muito próximo à unidade e coeficiente linear tendendo a zero. Porquanto, observa-se na Figura D.4 que a correspondente curva simulada pelo MHCN sobrepõe os dados experimentais, com um leve afastamento na fase inicial. Verifica-se também adequada representação da tendência a estado estacionário da fermentação.

A Tabela 5.8 exibe a regressão linear para concentração de glicose, onde se observa coeficiente de determinação muito baixo, erro quadrático médio não muito alto, coeficiente angular muito afastado da unidade e coeficiente linear alto. Por conseguinte, na Figura D.4 tem-se que a correlata curva simulada pelo MHCN não é capaz de predizer comportamento dos dados experimentais. O comportamento de tendência ao estado estacionário da curva experimental não é reproduzido pelo MHCN.

D.2 MHCN alimentado com variáveis experimentais (E_{Exp} X_{Exp} e G_{Exp}) - Teste 1 com correção do erro de predição

Na Tabela 5.8 e nas Figuras 5.13 a 5.18 e D.1 a D.4 verificou-se que o MHCN simulado nas condições do Teste 1 só demonstrou capacidade de predição satisfatória para a concentração de glicose nas fermentações contínuas FC05, 06 (FC05 e 06 – Capítulo 5) e 07 , sendo ineficiente nas demais fermentações.

Frente a tal situação foi planejada a repetição das mesmas condições de alimentação do Teste 1, contudo inserindo a correção do erro de predição nas equações de taxa das variáveis de concentração de etanol, de células e de glicose. Mesmo tendo a predição do MHCN sido satisfatória para as concentrações de etanol e de células, a correção também foi inserida de forma a verificar possível melhora. Assim, o erro de predição para cada variável de estado foi calculado, conforme descrito na sessão 5.3.2 do Capítulo 5.

As fermentações contínuas FC01, 05 e 11, bem como as Tabelas 5.10, 5.11 e 5.12 com os critérios estatísticos correspondentes, estão dispostos na sessão 5.3.2 do Capítulo 5.

D.2.1 Fermentação contínua 02 (FC02)

Na Figura D.5 são apresentadas as simulações para a FC02.

Com base nos critérios estatíticos das Tabelas 5.10 a 5.12 e na Figura D.5, observa-se a boa capacidade de predição do MHCN para os valores experimentais e na descrição da

tendência ao estado estacionário da FC02. Para a concentração de glicose têm-se pequenos desvios na fase inicial.

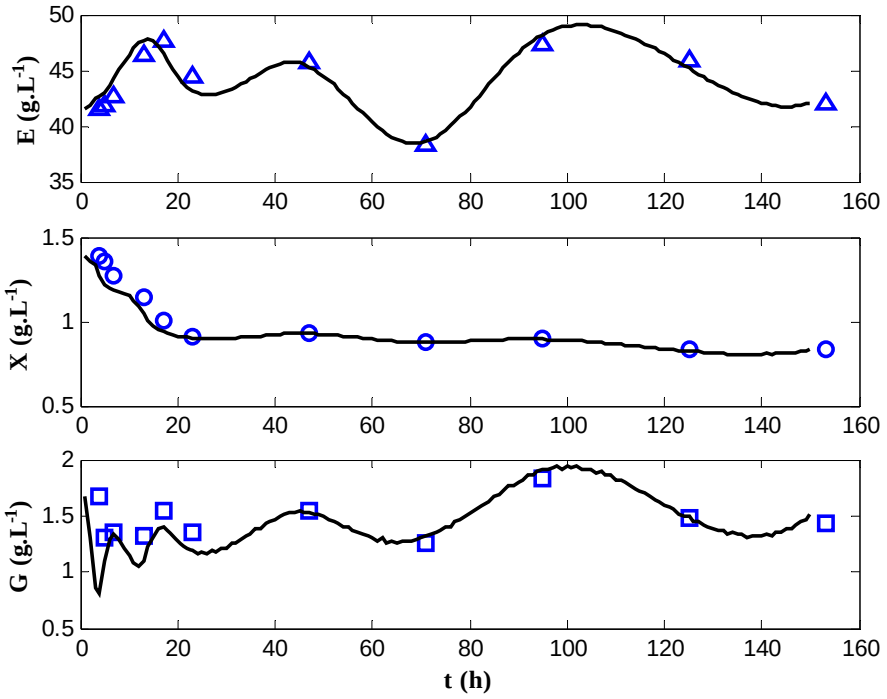


Figura D.5 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC02 – Teste 1 com correção do erro de predição. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

D.2.2 Fermentação contínua 03 (FC03)

As simulações para a FC03 são apresentadas na Figura D.6.

Reportando aos critérios estatíticos das Tabelas 5.10 a 5.12 e observando Figura D.6, constata-se a boa capacidade de predição do MHCN para os valores experimentais e na descrição da tendência ao estado estacionário da FC03. Para a concentração de etanol é evidenciado pequeno desvio na fase inicial.

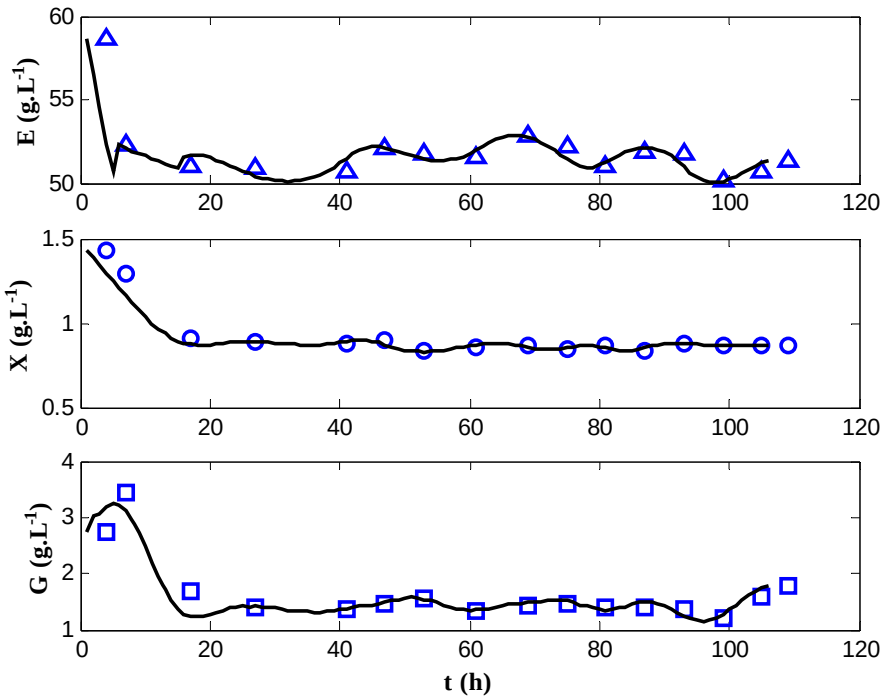


Figura D.6 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC03 – Teste 1 com correção do erro de predição. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

D.2.3 Fermentação contínua 04 (FC04)

Na Figura D.7 são apresentadas as simulações para a FC04.

Em consonância com os critérios estatíticos das Tabelas 5.10 a 5.12 e pautado na Figura D.7, observa-se a boa capacidade de predição do MHCN para os valores experimentais e na descrição da tendência ao estado estacionário da FC04. Para a concentração de etanol percebe-se pequeno desvio junto ao segundo ponto experimental.

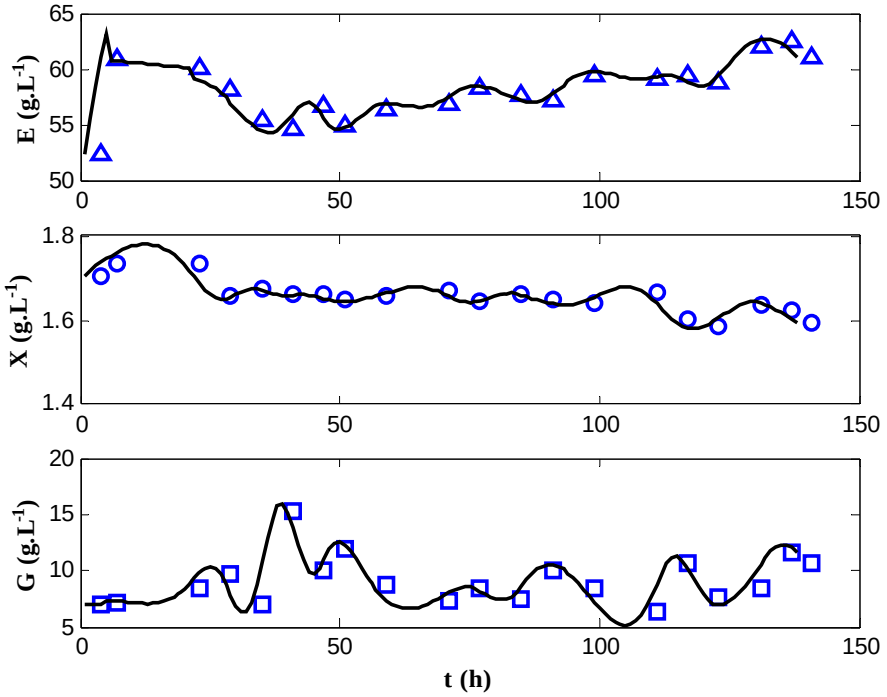


Figura D.7 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC04 – Teste 1 com correção do erro de predição. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

D.2.4 Fermentação contínua 06 (FC06)

Na Figura D.8 são apresentadas as simulações para a FC06.

Baseado nos critérios estatíticos das Tabelas 5.10 a 5.12 e nos perfis da Figura D.8, a muito boa capacidade de predição do MHCN para os valores experimentais e na descrição da tendência ao comportamento oscilatório da FC06 é observado.

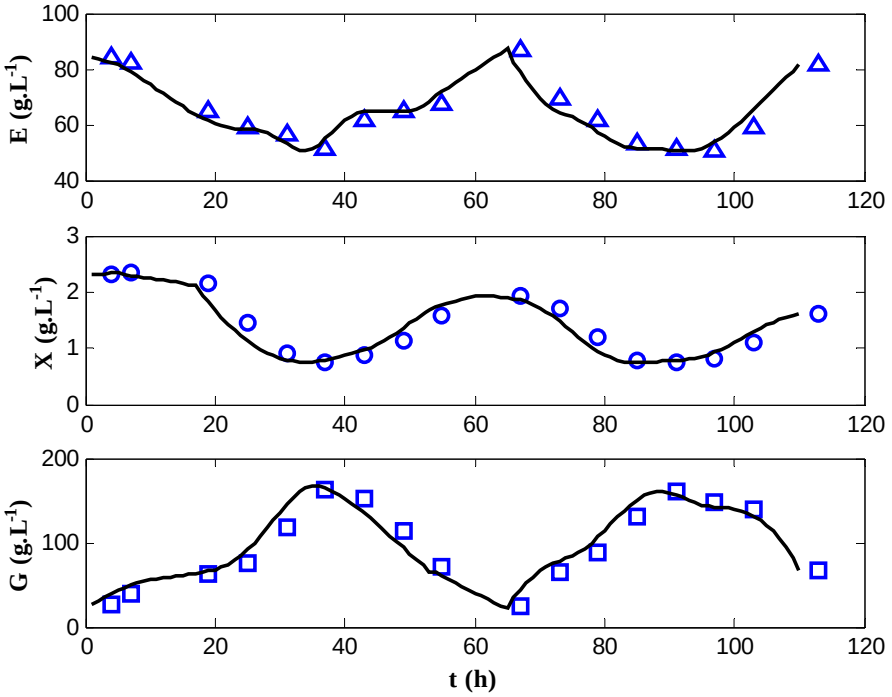


Figura D.8 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC06 – Teste 1 com correção do erro de predição. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

D.2.5 Fermentação contínua 07 (FC07)

Na Figura D.9 são apresentadas as respostas do MHCN para a FC07.

Em função dos critérios estatíticos das Tabelas 5.10 a 5.12 e dos perfis da Figura D.9, verifica-se a muito boa capacidade de predição do MHCN para os valores experimentais e na descrição da tendência ao comportamento oscilatório da FC07.

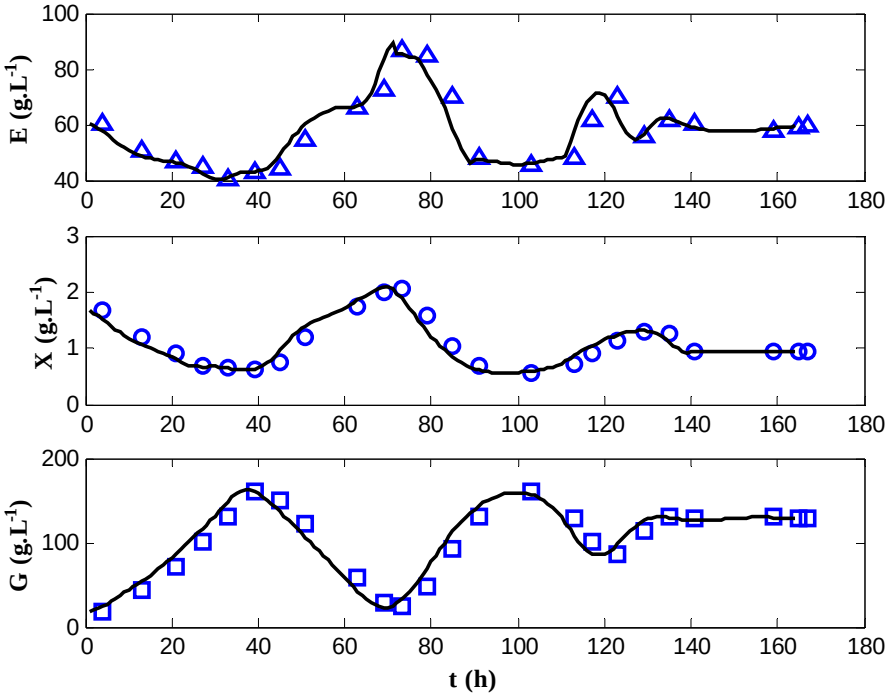


Figura D.9 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC07 – Teste 1 com correção do erro de predição. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose

D.2.6 Fermentação contínua 10 (FC10)

Na Figura D.10 encontram-se as simulações para a FC10.

Considerando os critérios estatíticos das Tabelas 5.10 a 5.12 e a Figura D.10, verifica-se a boa capacidade de predição do MHCN para os valores experimentais e na descrição da tendência ao estado estacionário da FC01, muito embora pequenos desvios sejam observados na fase inicial para a concentração de etanol e de glicose.

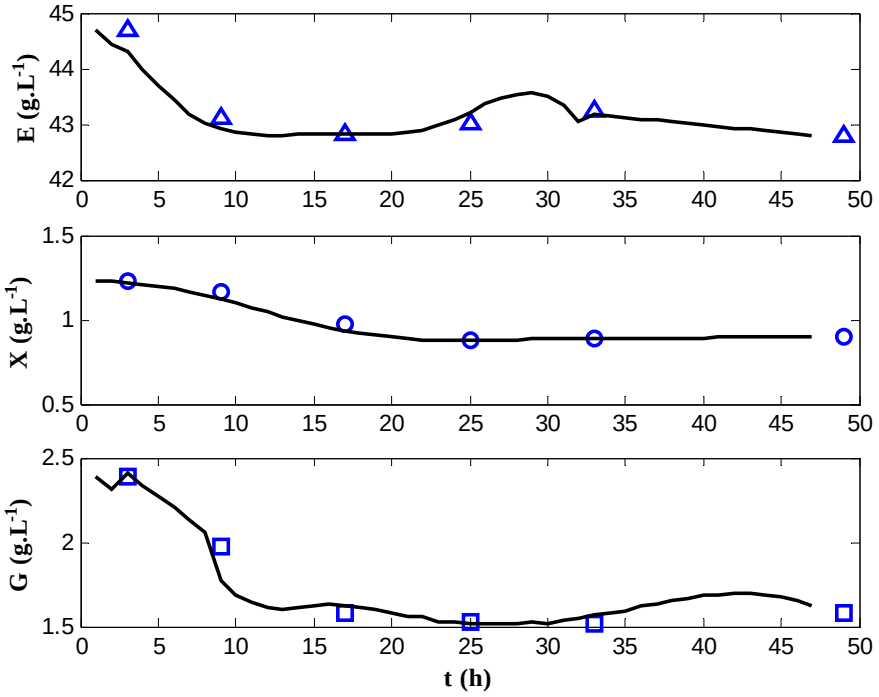


Figura D.10 – Comparação da resposta do MHCN realimentado com E_{Exp}, X_{Exp} e G_{Exp} para a FC10 – Teste 1 com correção do erro de predição. Valores simulados pelo MHCN e dados experimentais versus sequência de dados experimentais referentes à concentração de: Δ etanol; o células; □ glicose