

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO

PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

***Desenvolvimento de um Sistema
Especialista para Auxílio no Projeto
e Operação de Processos
Biotecnológicos***

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Vera Lúcia Reis de Gouveia

Mestre em Engenharia Química - FEQ/UNICAMP

Prof. Dr. Rubens Maciel Filho

Orientador

Campinas, Fevereiro de 2006.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA
DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

G745d Gouveia, Vera Lúcia Reis de
Desenvolvimento de um sistema especialista para
auxílio no projeto e operação de processos
biotecnológicos / Vera Lúcia Reis de Gouveia.--
Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Rubens Maciel Filho
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Inteligência artificial. 2. Biotecnologia - Indústria.
3. Sistemas especialistas (Computação). 4. Redes
neurais (Computação). I. Maciel Filho, Rubens. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. III. Título.

Titulo em Inglês: Expert system development for aid n the Bioprocesses
design and operation

Palavras-chave em Inglês: Bioreactor, Biotechnical processes, Bioprocess,
Expert system, Artificial neural networks.

Área de concentração: Processos Biotecnológicos

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora: Roberto de Campos Giordano, Silvio Roberto
Andrietta, Daniel Ibraim Pires Atala, Eduardo
Thomaz Inglez de Sousa, Valdir Apolinário de
Freitas.

Data da defesa: 23/02/2006

Tese de Doutorado defendida por Vera Lúcia Reis de Gouvêia e aprovada em 23 de Fevereiro de 2006 pela banca examinadora constituída pelos doutores:

Prof. Dr. Rubens Maciel Filho - Orientador

Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP

Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano

Departamento de Engenharia Química - UFSCar

Profa. Dra. Aline Carvalho da Costa

Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP

Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta

Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas,
Biológicas e Agrícolas - CPQBA/UNICAMP

Dr. Daniel Ibraim Pires Atala

Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP

Dr. Valdir Apolinário de Freitas

Rhodia Brasil S/A

Dr. Eduardo Thomaz Inglez de Sousa

Órion Automação

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de
Doutorado em Engenharia Química.

Prof. Dr. Rubens Maciel Filho - Orientador

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido marido e amigo Wanderley pelo apoio e compreensão sempre.

Ao pequeno "Deley" por se comportar tão bem em seu primeiro ano de vida que coincidiu com o último ano de tese de sua mãe.

Aos professores Rubens e Maria Regina pela dedicação e paciência com que realizam seu trabalho e pela amizade.

Aos membros da banca examinadora pela preciosa colaboração na finalização deste trabalho.

À minha querida mãe por me proporcionar momentos de paz quando mais precisei.

A todos os amigos e familiares que de perto ou a distancia torcem pelo meu sucesso.

Aos amigos e funcionários do LOPCA/FEQ/UNICAMP pela troca de informação, ajuda e boa conversa.

À FAPESP pelo auxílio financeiro, na forma de bolsa de estudo e reserva técnica, e pelas sugestões ao trabalho.

RESUMO

Os processos biotecnológicos ou Bioprocessos necessitam de maiores cuidados do que a maioria dos processos químicos comuns devido, principalmente, à sensibilidade a variações nos estados do sistema como, por exemplo, temperatura e concentração. O crescente aumento da importância dos Bioprocessos e a maior dificuldade em seu controle e simulação resultaram na procura e utilização de novas ferramentas como a Inteligência Artificial (IA). Inteligência Artificial é uma parte da ciência da computação relacionada ao projeto de sistemas computacionais inteligentes. Nos últimos anos houve um aumento substancial do uso de ferramentas de IA tais como Redes Neurais Artificiais (R.N.A), Sistemas Especialistas e Lógica Fuzzy no controle e simulação de Bioprocessos. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um software que atue como um assistente, auxiliando na simulação de Bioprocessos. O Bio-PSA (*BioProcess Simulation Assistant*) possui quatro módulos:

- Módulo 1: Simulação de Bioprocessos, incluindo funcionalidades para simulação de produção de etanol e dextrana, ambos com modelagem normal e híbrida.
- Módulo 2: Simulação de processos para purificação de proteínas, incluindo a modelagem de processos baseados no modelo CARE (*Continuous Affinity Recycle Extraction*).
- Módulo 3: Sistema Especialista e uma base de conhecimento que auxilia o usuário no design de processos biotecnológicos.
- Módulo 4: Software para treinamento de R.N.A.

Palavras-chave: Biorreator, Processos Biotecnológicos, Bioprocessos, Sistema Especialista, Redes Neurais Artificiais.

ABSTRACT

The biotechnical processes or Bioprocesses require larger cares than common chemical processes due, mainly, the states of the system variations sensibility, for example, temperature and concentrations. The increasing raise of the Bioprocess importance and the largest difficulty in its control and simulation resulted in the search and use of Artificial Intelligence (AI) tools.

Artificial Intelligence is a part of the computer science related to the project of intelligent computational systems. In the last years there was a substantial increase in the use of AI tools such as Artificial Neural Networks (A.N.N), Expert Systems and Fuzzy Logic in the Bioprocess control and simulation.

This work had the objective of the development of software that acts as an assistant, aiding in the Bioprocess simulation. The Bio-PSA (BioProcess Simulation Assistant) has four modules:

- Module 1: Bioprocess simulation, including applications for simulation of ethanol and dextran production, both with normal and hybrid modeling.
- Module 2: Simulation of proteins purification processes, including processes modeling based in the CARE (Continuous Affinity Recycle Extraction) model.
- Module 3: Expert System and a knowledge base that aids the user in the Bioprocesses design.
- Module 4: Software for A.N.N training.

Keywords: Bioreactor, Biotechnical Processes, Bioprocess, Expert System, Artificial Neural Networks.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. IMPORTÂNCIA E OBJETIVO	1
1.2. ORGANIZAÇÃO DA TESE	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS	5
2.1.1. PROJETO DE BIORREADORES	5
2.1.2. O SISTEMA BIOLÓGICO E O MEIO	8
2.1.2.1. EXIGÊNCIAS DO PRODUTO	8
2.1.2.2. IDENTIFICAÇÃO DO SISTEMA BIOLÓGICO	9
2.1.2.3. CARACTERÍSTICAS DAS CULTURAS E SUA INFLUÊNCIA NO “DESIGN” DE BIORREADORES	9
2.1.2.4. FORMULAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO MEIO	16
2.1.3. CINÉTICA	19
2.1.3.1. CINÉTICA ENZIMÁTICA	19
2.1.3.2. CINÉTICA MICROBIANA	26
2.1.4. SELEÇÃO DO TIPO DE BIORREATOR	33
2.1.5. PROJETO DO SISTEMA	38
2.2. PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE ETANOL	38
2.2.1. HISTÓRICO	38
2.2.2. PRODUÇÃO DE ETANOL VIA FERMENTATIVA	40
2.3. PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	44
2.3.1. O PROCESSO CARE	48
2.4. PRODUÇÃO DE DEXTRANA	49
2.4.1. INTRODUÇÃO	49
2.5. INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL	53
2.6. REDES NEURAIS ARTIFICIAIS	55
2.6.1. INTRODUÇÃO	55
2.6.2. ARQUITETURA	57

2.6.3. TOPOLOGIA	58
2.6.4. TREINAMENTO	59
2.6.5. REDES MULTICAMADAS	60
2.6.6. BACKPROPAGATION	61
2.6.7. PASSOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE UMA R.N.A	62
2.6.8. ERROS	64
2.6.9. CONSIDERAÇÕES	64
2.6.10. MODELAGEM HÍBRIDA	66
2.7. SISTEMAS ESPECIALISTAS	68
2.7.1. COMPONENTES DE UM S.E	69
2.7.2. FUNCIONAMENTO DE UM S.E	72
2.8. CONCLUSÕES	73
<u>3. MODELOS MATEMÁTICOS</u>	<u>75</u>
3.1. PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE ETANOL	75
3.1.1. PROCESSO COM QUATRO REATORES E RECICLO	75
3.1.1.1. ETAPAS DO BIOPROCESSO	76
3.1.1.2. VARIÁVEIS	78
3.1.1.3. MODELO E PARÂMETROS CINÉTICOS	80
3.1.1.4. RENDIMENTO E PRODUTIVIDADE	85
3.1.2. PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EXTRATIVO	85
3.1.2.1. ETAPAS DO BIOPROCESSO	86
3.1.2.2. MODELO MATEMÁTICO	88
3.1.2.3. RENDIMENTO E PRODUTIVIDADE	92
3.2. PRODUÇÃO DE DEXTRANA	93
3.2.1. INTRODUÇÃO	93
3.2.2. O PROCESSO CARE	93
3.2.3. PROCESSO CARE MODIFICADO PARA PRODUÇÃO DE DEXTRANA	94
3.2.4. CONSIDERAÇÕES SOBRE O SISTEMA	95
3.2.5. HIPÓTESES DO MODELO	95
3.2.6. DESENVOLVIMENTO DO MODELO	96
3.2.7. OBSERVAÇÕES SOBRE AS CONSTANTES CINÉTICAS	98
3.2.8. RENDIMENTO E PRODUTIVIDADE	99
3.3. PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS UTILIZANDO O PROCESSO CARE	100
3.3.1. INTRODUÇÃO	100

3.3.2. SISTEMA CARE COM DOIS ESTÁGIOS (CARE2)	100
3.3.3. SISTEMA CARE MODIFICADO DE TRÊS ESTÁGIOS (CARE3)	101
3.3.4. SISTEMA CARE MODIFICADO DE DOIS ESTÁGIOS COM ELUIÇÃO EM REATOR PISTONADO (CARE2PFR)	103
3.3.5. SISTEMA CARE MODIFICADO DE TRÊS ESTÁGIOS COM ELUIÇÃO EM REATOR PISTONADO (CARE3PFR)	104
3.3.6. LISOZIMA E LIPASE	105
3.3.7. HIPÓTESES DO MODELO	106
3.4. CONCLUSÕES	107
<u>4. INTRODUÇÃO AO SOFTWARE BIO-PSA</u>	<u>109</u>
4.1. INTRODUÇÃO	109
4.2. APRESENTAÇÃO DO BIO-PSA	111
4.3. DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA DE AJUDA PARA OS MÓDULOS	114
4.4. CONCLUSÕES	116
<u>5. BIO-PSA: MÓDULO 1 SIMULAÇÃO DE BIOPROCESSOS</u>	<u>117</u>
5.1. CASO 1: PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE ETANOL	118
5.1.1. PROCESSO COM QUATRO REATORES E RECICLO.	118
5.1.1.1. INTRODUÇÃO E FLUXOGRAMAS.	118
5.1.1.2. DADOS INICIAIS E SIMULAÇÃO.	122
5.1.1.3. RESULTADOS	128
5.1.2. PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EXTRATIVO.	129
5.1.2.1. INTRODUÇÃO E FLUXOGRAMAS.	129
5.1.2.2. DADOS INICIAIS E SIMULAÇÃO.	130
5.1.2.3. RESULTADOS	133
5.2. CASO 2: PRODUÇÃO DE DEXTRANA	134
5.2.1. INTRODUÇÃO E FLUXOGRAMA.	134
5.2.2. DADOS INICIAIS E SIMULAÇÃO.	134
5.2.3. RESULTADOS	141
5.3. CONCLUSÕES	143
<u>6. BIO-PSA: MÓDULO 2 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS</u>	<u>145</u>

6.1. CASO 1: PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA PELO PROCESSO CARE	146
6.1.1. INTRODUÇÃO E FLUXOGRAMA.	146
6.1.2. DADOS INICIAIS E SIMULAÇÃO.	147
6.1.3. RESULTADOS	152
6.2. CONCLUSÕES	154
<u>7. BIO-PSA: MÓDULO 3 SISTEMA ESPECIALISTA</u>	<u>155</u>
7.1. BIO-PSA EXPERT	156
7.1.1. ARQUITETURA DE UM S.E NO EXPERT SINTA	159
7.1.1.1. AS REGRAS NO EXPERT SINTA	160
7.1.1.2. EXEMPLO DE ENCADEAMENTO PARA TRÁS	163
7.2. DESENVOLVIMENTO DA BASE DE CONHECIMENTO	165
7.2.1. DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS E OBJETIVOS.	166
7.2.2. DEFINIÇÃO DAS PERGUNTAS	170
7.2.3. DEFINIÇÃO DAS REGRAS	172
7.3. DESENVOLVIMENTO DA FUNCIONALIDADE DE EDIÇÃO DE BASE DE CONHECIMENTO	175
7.4. DESENVOLVIMENTO DA FUNCIONALIDADE DE CONSULTA	182
7.5. CONCLUSÕES	189
<u>8. BIO-OSA: MÓDULO 4 REDES NEURAIS ARTIFICIAIS</u>	<u>191</u>
8.1. REDE NEURAL ARTIFICIAL	191
8.1.1. CARACTERÍSTICAS DA FUNCIONALIDADE	191
8.1.2. DADOS INICIAIS E TREINAMENTO.	192
8.1.3. RESULTADOS.	195
8.2. CONCLUSÕES	197
<u>9. CONSIDERAÇÕES FINAIS</u>	<u>199</u>
<u>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>201</u>

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Representação esquemática do projeto de um sistema de biorreator.....	6
Figura 2.2: Passos fundamentais de um Bioprocesso.	16
Figura 2.3: Efeito da temperatura na velocidade de reação.	26
Figura 2.4: Resumo de alguns parâmetros, fenômenos e interações que determinam a cinética da população de células.	27
Figura 2.5: Diferentes perspectivas para representação da cinética da população celular.....	28
Figura 2.6: Padrões cinéticos de crescimento e formação de produtos.....	31
Figura 2.7: Reatores de mistura mecânica..	36
Figura 2.8: Reatores com mistura pneumática..	37
Figura 2.9: Produção mundial de açúcar em 2005.....	39
Figura 2.10: Produção mundial de álcool em 2005.....	40
Figura 2.11: Esquema geral do processo fermentativo para obtenção de Etanol.....	42
Figura 2.12: Etapas de um processo genérico de purificação de biomoléculas..	46
Figura 2.13: Processo CARE original.....	49
Figura 2.14 :Esquema de unidade McCulloch – Pitts.	55
Figura 2.15: Neurônio artificial.....	56
Figura 2.16: Organização em camadas.	58
Figura 2.17: Esquema de treinamento com o algoritmo de “backpropagation”.....	61
Figura 2.18: Utilização da MLP.....	62
Figura 2.19: Superfície de erro.....	65
Figura 2.20: Tipo de Modelos.....	67
Figura 2.21: Esquema geral da construção de um modelo híbrido.	68
Figura 3.1: Esquema do processo fermentativo para produção de etanol em escala industrial.....	77
Figura 3.2: Variáveis do processo de produção de etanol.....	78
Figura 3.3: Reator de mistura perfeita i.	82
Figura 3.4: Esquema do processo Fermentação Alcoólica Extrativo.....	87
Figura 3.5: Fluxograma do processo Fermentação Alcoólica Extrativo com variáveis.	88
Figura 3.6: Esquema do reator de síntese de dextrana.	94
Figura 3.7: Esquema do reator de síntese de dextrana, com indicação dos fluxos....	95
Figura 3.8: Representação esquemática do sistema CARE com 2 estágios.	101

Figura 3.9: Representação esquemática do sistema CARE com 3 estágios.	102
Figura 3.10: Representação esquemática do sistema CARE2pfr.	103
Figura 3.11: Representação esquemática do sistema CARE3pfr.	104
Figura 4.1: Fluxograma geral do funcionamento do Bio-PSA.	111
Figura 4.2: Janelas de abertura do Bio-PSA.	112
Figura 4.3: Caixa de diálogo inicial do módulo 1.	113
Figura 4.4: Caixa de diálogo inicial do módulo 2.	113
Figura 4.5: Janela principal da funcionalidade produção de etanol- Sistema de Ajuda.	115
Figura 4.6: Sistema de ajuda da funcionalidade de produção de etanol.	116
Figura 5.1: Janela de Apresentação. Módulo 1.	118
Figura 5.2: Fluxograma geral. Módulo 1:Etanol(1).....	119
Figura 5.3: Fluxograma: Simulação 1.	120
Figura 5.4: Fluxograma. Simulação 2.Módulo 1:Etanol (1).....	120
Figura 5.5: Fluxograma. Simulação 3 e 4.Módulo 1:Etanol (1).....	121
Figura 5.6: Fluxograma. Modelo Híbrido. Módulo 1:Etanol (1).....	121
Figura 5.7: Janela principal da funcionalidade de produção de etanol (1). Simulação Normal.	122
Figura 5.8: Caixas de diálogo das variáveis. Módulo 1:Etanol (1).....	123
Figura 5.9: Janela principal da funcionalidade de produção de etanol (1). Simulação Híbrida.	124
Figura 5.10: Obtenção de dados cinéticos. Módulo 1:Etanol (1)	125
Figura 5.11: Obtenção de dados para R.N.A. Módulo 1:Etanol (1)	126
Figura 5.12: Obtenção de dados para R.N.A dinâmica. Módulo 1:Etanol (1).....	127
Figura 5.13: Conclusão de geração de dados. Módulo 1:Etanol (1).....	128
Figura 5.14: Caixa de diálogo dos resultados para simulação normal. Módulo 1:Etanol (1).....	128
Figura 5.15: Gráficos de resultados para simulação normal. Módulo 1:Etanol (1). 129	
Figura 5.16: Fluxograma da funcionalidade de produção de etanol (2).	130
Figura 5.17: Janela principal da funcionalidade de produção de etanol (2).	131
Figura 5.18: Caixa de diálogo de variáveis. Módulo 1:Etanol (2).....	132
Figura 5.19: Conclusão de geração de dados. Módulo 1:Etanol (2).....	133
Figura 5.20: Caixa de diálogo dos resultados para simulação normal. Módulo 1:Etanol (2).....	133
Figura 5.21: Gráficos de resultados para simulação normal. Módulo 1:Etanol (2). 134	

Figura 5.22: Janela principal da funcionalidade para produção de dextrana. Módulo 1:Dextrana.....	135
Figura 5.23: Caixas de diálogo das variáveis. Módulo 1:Dextrana.....	136
Figura 5.24: Janela principal da funcionalidade de produção de dextrana. Simulação Híbrida.	137
Figura 5.25: Obtenção de dados cinéticos. Módulo 1:Dextrana.	138
Figura 5.26: Obtenção de dados para R.N.A. Módulo 1: Dextrana.	139
Figura 5.27: Obtenção de dados para R.N.A dinâmica. Módulo 1: Dextrana.....	140
Figura 5.28: Conclusão de geração de dados. Módulo 1:Dextrana.....	141
Figura 5.29: Caixa de diálogo dos resultados para simulação normal. Módulo 1:Dextrana.....	142
Figura 5.30: Gráficos de resultados para simulação normal. Módulo 1: Dextrana.	142
Figura 6.1: Janela de Apresentação. Módulo 2. Proteína.....	146
Figura 6.2: Fluxograma geral. Módulo 2. Proteína.....	147
Figura 6.3: Janela principal da funcionalidade de purificação de proteínas.	148
Figura 6.4: Caixas de diálogo das variáveis. Módulo 2: Proteína.	149
Figura 6.5: Janela principal. Módulo 2: Proteína - CARE3/Lipase.	150
Figura 6.6: Janela principal. Módulo 2: Proteína - CARE2pfr/Lisozima.	151
Figura 6.7: Janela principal. Módulo 2: Proteína - CARE3pfr/Lipase.....	152
Figura 6.8: Caixa de diálogo dos resultados. Módulo2: Proteína CARE2/Lipase..	153
Figura 6.9: Caixa de diálogo dos resultados para purificação de lipase	153
Figura 7.1: Janela de abertura do <i>Bio-PSA</i>	156
Figura 7.2: Janela de Apresentação. Módulo 3. Bio-PSA Expert	156
Figura 7.3: Janela principal do <i>Bio-PSA</i> Expert.....	157
Figura 7.4: Arquitetura simplificada do Expert SINTA.....	160
Figura 7.5: Regra de Produção. Expert SINTA	160
Figura 7.6: Representação esquemática do projeto de um sistema de biorreator....	166
Figura 7.7: Janela principal do <i>Base Builder</i>	176
Figura 7.8: Caixa de diálogo com informações do S.E.....	177
Figura 7.9: Caixa de Diálogo para inclusão de regras do S.E.	178
Figura 7.10: Caixa de Diálogo para inclusão de variáveis do S.E.	178
Figura 7.11: Caixa de Diálogo para definição da variável-objetivo do S.E.	179
Figura 7.12: Caixa de Diálogo para auxílio no desenvolvimento de interfaces.....	180
Figura 7.13: Caixa de Diálogo para inclusão de nova regra.	180
Figura 7.14: Caixa de Diálogo para edição de regras.	181

Figura 7.15: Caixa de Diálogo de edição de visualização e regras.....	181
Figura 7.16: Caixa de Diálogo de edição de visualização e regras.....	181
Figura 7.17: Janela principal com uma base de conhecimento aberta. Módulo 3: S.E	183
Figura 7.18: Caixa de Diálogo para visualização das regras. Módulo 3: S.E.....	184
Figura 7.19: Janela principal em modo de consulta. Módulo 3: S.E.....	185
Figura 7.20: Caixa de Diálogo dos Resultados/Results. Módulo 3: S.E	186
Figura 7.21: Caixa de Diálogo dos Resultados/History. Módulo 3: S.E	186
Figura 7.22: Caixa de Diálogo dos Resultados/AllValues. Módulo 3: S.E.....	187
Figura 7.23: Caixa de Diálogo dos Resultados/The System. Módulo 3: S.E.....	187
Figura 7.24: Caixa de Diálogo dos Resultados/Summary. Módulo 3: S.E.....	188
Figura 7.25: Caixa de Diálogo de explicação a uma pergunta. Módulo 3: S.E.....	189
Figura 8.1: Fluxograma do programa de treinamento das Redes Neurais Artificiais.	192
Figura 8.2: Janela principal do programa de Rede Neural Artificial.....	193
Figura 8.3: Caixa de diálogo para escolha de arquivo de dados. Módulo 4: R.N.A	194
Figura 8.4: Caixa de diálogo de treinamento. Módulo 4: R.N.A.....	194
Figura 8.5: Caixa de diálogo dos resultados. Módulo 4: R.N.A.....	195
Figura 8.6: Gráficos para análise do treinamento. Módulo 4: R.N.A.....	196
Figura 8.7: Gráficos para análise da validação. Módulo 4: R.N.A.....	197

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Intervalo de tempo para cultura microbiana dobrar de tamanho.....	11
Tabela 2.2: Classificação dos microrganismos por temperatura de crescimento.....	13
Tabela 2.3: Passos e tópicos essenciais relacionados ao desenvolvimento de meio de cultura.....	17
Tabela 2.4: Resumo das principais reações enzimáticas e respectivas equações.	22
Tabela 2.5: Intersecções nos gráficos de Lineweaver-Burk para enzimas com inibidores.	24
Tabela 2.6: Modelos cinéticos não estruturados descritos para a representação de diversos fenômenos identificados em processo fermentativos.	29
Tabela 2.7: Modelos para produção de produto metabólico inibitório	31
Tabela 2.8: pH ótimo de diferentes células.....	32
Tabela 2.9: Operações unitárias do processo de purificação de produtos biotecnológicos.	47
Tabela 2.10: Um glossário resumido sobre Sistema Especialista.....	72
Tabela 3.1: Valores das variáveis operacionais de processo	78
Tabela 3.2: Variáveis independentes trabalhadas na simulação.	79
Tabela 3.3: Variáveis dependentes trabalhadas na simulação.	79
Tabela 3.4: Valores das variáveis independentes.	79
Tabela 3.5 Valores dos Parâmetros Cinéticos.....	82
Tabela 3.6 Valores das constantes utilizadas	82
Tabela 3.7: Valores das constantes físicas.	92
Tabela 7.1: Variáveis principais do S.E em ordem alfabética:	167
Tabela 7.2: Variáveis auxiliares do S.E:.....	170
Tabela 7.3: Variáveis, em ordem alfabética, e respectivas perguntas do S.E:	170

NOMENCLATURA

Abreviaturas e Siglas Gerais

- ART = Açúcares Redutores Totais
CARE = Continuous Affinity Recycle Extraction
LMS = Leito Móvel Simulado
R.N.A = Rede Neural Artificial
S.E = Sistema Especialista

Produção de Etanol: Quatro reatores

- μ = Velocidade específica de crescimento do microrganismo (h^{-1})
 ρ_i = Densidade do fluido reagente no reator i (Kg.m^{-3})
 ρ_j = Densidade do fluido de resfriamento (Kg.m^{-3})
 μ_{\max} = Velocidade específica de crescimento máxima do microrganismo (h^{-1})
 ΔH = Calor de reação (Kcal.Kg^{-1})
 A = Constante de ajuste da dependência de μ_{\max} com a temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
 a = Constante de ajuste da dependência de P_{\max} com a temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
 C_{pi} = Calor específico do fluido reagente ($\text{cal.g}^{-1}.\text{^{\circ}C}^{-1}$)
 C_{pj} = Calor específico do fluido de resfriamento ($\text{cal.g}^{-1}.\text{^{\circ}C}^{-1}$)
 E_n = Energia de ativação (cal.mol^{-1})
 $F(i)$ = Vazão de alimentação no estágio i ($\text{m}^3.\text{h}^{-1}$)
 F_0 = Vazão do meio de alimentação na entrada do sistema ($\text{m}^3.\text{h}^{-1}$)
 F_a = Vazão de água no tanque de tratamento ($\text{m}^3.\text{h}^{-1}$)
 $F_c(i)$ = Vazão de fluido reagente no trocador de calor i ($\text{m}^3.\text{h}^{-1}$)
 $F_J(i)$ = Vazão de fluido de resfriamento no trocador de calor i
 FL = Vazão de leite de levedura ($\text{m}^3.\text{h}^{-1}$)
 FL_1 = Vazão de leite de levedura após sangria ($\text{m}^3.\text{h}^{-1}$)
 Fr = Vazão de reciclo ($\text{m}^3.\text{h}^{-1}$)

F_s = Vazão de purga ($\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$)
 F_v = Vazão de vinho de levedurado ($\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$)
 $FW(i)$ = Vazão de alimentação do reator i ($\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$)
 K_0 = Constante do modelo de dependência de P_{\max} com a temperatura ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)
 K_m = Constante de Michaelis-Menten ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)
 K_s = Constante de afinidade ao substrato ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)
LMDT = Média logarítmica das temperaturas
 m = Potência do termo de inibição pela concentração celular
 n = Potência do termo de inibição pelo produto
 $P(i)$ = Concentração de etanol no reator i ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)
 P_f = Concentração de etanol na saída do último reator ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)
 P_{\max} = Concentração de etanol onde o crescimento celular cessa ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)
 P_r = Concentração de etanol no reciclo ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)
PROD = Produtividade do sistema ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
PW = Concentração de etanol na entrada do primeiro reator ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)
REND = Rendimento do processo (%)
 r_P = Velocidade de formação de produto ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
RR = Taxa de reciclo
 r_S = Velocidade de consumo de substrato ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
RT = Constante dos gases ($\text{cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)
 r_X = Velocidade de crescimento celular ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
 $S(i)$ = Concentração de substrato no reator i ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)
 S_0 = Concentração de substrato no meio de alimentação ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)
 S_f = Concentração de substrato na saída do último reator ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)
 S_r = Concentração de substrato no reciclo ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)
SW = Concentração de substrato na entrada do primeiro reator ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)
 t = Tempo (h)
 $T(i)$ = Temperatura do reator i ($^{\circ}\text{C}$)
 T_a = Temperatura de alimentação do reator 1 ($^{\circ}\text{C}$)
 $T_c(i)$ = Temperatura do fluido reagente na saída do trocador i ($^{\circ}\text{C}$)

$T_j(i)$	= Temperatura do fluido de resfriamento na saída do trocador i ($^{\circ}\text{C}$)
T_{je}	= Temperatura do fluido de resfriamento na entrada do trocador ($^{\circ}\text{C}$)
T_w	= Temperatura na entrada do primeiro reator ($^{\circ}\text{C}$)
U	= Coeficiente global de troca térmica ($\text{Kcal}\cdot\text{h}^{-1}\cdot^{\circ}\text{C}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$)
V	= Volume do reator (m^3)
$X(i)$	= Concentração de células no reator i ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
X_f	= Concentração de células na saída do ultimo reator ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
X_L	= Concentração de células no leite de levedura ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
X_{\max}	= Concentração de células onde o crescimento celular cessa ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
X_r	= Concentração de células no reciclo ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
X_v	= Concentração de células no vinho de levedurado ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
X_W	= Concentração de células na entrada do primeiro reator ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
$Y_{p/s}$	= Rendimento teórico em etanol
$Y_{x/s}$	= Rendimento teórico em biomassa

Produção de Etanol: Extrativo

ρ	= Taxa de peso de célula seco por volume de célula úmida ($\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$)
γ	= Taxa de concentração de etanol intracelular e extracelular ($\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$)
ΔH	= Calor de reação ($\text{Kcal}\cdot(\text{Kg ART})^{-1}$)
ρ_m	= Densidade do meio fermentativo ($\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$)
μ_{\max}	= Taxa específica máxima de crescimento (h^{-1})
CP	= Calor específico ($\text{Kcal}\cdot(\text{Kg}\cdot^{\circ}\text{C})^{-1}$)
D	= Taxa de diluição (h^{-1})
F	= Vazão de alimentação do fermentador ($\text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$)
F_0	= Vazão de entrada de substrato ($\text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$)
F_a	= Vazão de água no tanque de tratamento ($\text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$)
F_C	= Vazão de alimentação da centrífuga ($\text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$)
F_{C1}	= Vazão de alimentação da cuba ($\text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$)
F_E	= Vazão de alimentação no tanque "flash" ($\text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$)
F_L	= Vazão no tanque "flash" a vácuo ($\text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$)

FLR = Vazão de reciclo do "flash" ($\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$)
 FLS = Vazão de alimentação na coluna ($\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$)
 FP = Vazão de purga ($\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$)
 FV = Vazão de água ($\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$)
 Kdp = Coeficiente de morte por etanol ($\text{m}^3 \cdot \text{Kg}^{-1}$)
 KdT = Coeficiente de morte por pela temperatura (h^{-1})
 KS = Constante de saturação por substrato ($\text{Kg} \cdot \text{m}^3$)
 m = Constante
 mp = Produção de etanol associada ao crescimento
 ($\text{Kg} \cdot (\text{Kg} \cdot \text{h})^{-1}$)
 mx = Coeficiente de manutenção ($\text{Kg} \cdot (\text{Kg} \cdot \text{h})^{-1}$)
 n = Constante
 P = Concentração de produto no fermentador ($\text{Kg} \cdot \text{m}^3$)
 PF = Concentração de produto na alimentação ($\text{Kg} \cdot \text{m}^3$)
 Plr = Concentração de produto na fase leve da centrífuga
 ($\text{Kg} \cdot \text{m}^3$)
 P_{max} = Concentração de produto no reciclo da cuba ($\text{Kg} \cdot \text{m}^3$)
 Pr = Concentração de produto quando o crescimento
 celular cessa ($\text{Kg} \cdot \text{m}^3$)
 PROD = Produtividade
 PV = Concentração de produto na fase de vapor do tanque
 "flash" ($\text{Kg} \cdot \text{m}^3$)
 r = Taxa de reciclo do tanque "flash".
 rd = Taxa cinética de morte celular ($\text{Kg} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{h})^{-1}$)
 REND = Rendimento do processo (%)
 rP = Taxa cinética de formação de produto ($\text{Kg} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{h})^{-1}$)
 RR = Taxa de reciclo de células
 rS = Taxa cinética de consumo de substrato ($\text{Kg} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{h})^{-1}$)
 rX = Taxa cinética de crescimento celular ($\text{Kg} \cdot (\text{m}^3 \cdot \text{h})^{-1}$)
 S = Concentração de substrato no fermentador ($\text{Kg} \cdot \text{m}^{-3}$)
 S0 = Concentração de entrada de substrato no fermentador
 ($\text{Kg} \cdot \text{m}^3$)
 SF = Concentração de substrato na alimentação ($\text{Kg} \cdot \text{m}^3$)
 SLR = Concentração de substrato na fase leve da
 centrífuga ($\text{Kg} \cdot \text{m}^3$)
 Sr = Concentração de substrato no reciclo ($\text{Kg} \cdot \text{m}^3$)
 T = Temperatura no fermentador ($^{\circ}\text{C}$)
 T0 = Temperatura na entrada do fermentador ($^{\circ}\text{C}$)

TF	= Temperatura da corrente de alimentação (°C)
Tlr	= Temperatura na fase leve da centrífuga (°C)
Tr	= Temperatura da corrente de reciclo (°C)
TV	= Temperatura de vapor no tanque "flash" (°C)
V	= Volume do fermentador (m ³)
XC	= Concentrações de células na fase pesada da centrífuga (Kg.m ⁻³)
Xd	= Concentrações de células mortas no fermentador (Kg.m ⁻³)
XdF	= Concentrações de células mortas na alimentação (Kg.m ⁻³)
XE	= Concentrações de células na fase leve do tanque "flash" (Kg.m ⁻³)
xi	= Concentração do componente i no líquido, (mol%)
xEi	= Concentração do componente i na fase leve, (mol%)
XF	= Concentração de células na alimentação do fermentador (Kg.m ⁻³)
XLR	= Concentração de células no reciclo do tanque "flash" (Kg.m ⁻³)
X _{max}	= Concentração de biomassa quando o crescimento cessa (Kg.m ⁻³)
Xr	= Concentrações de células no reciclo (Kg.m ⁻³)
Xt	= Concentrações de células totais (Kg.m ⁻³)
XV	= Concentrações de células viáveis (Kg.m ⁻³)
XVF	= Concentrações de células viáveis na alimentação (Kg.m ⁻³)
YPX	= Rendimento de produto baseado no crescimento celular (Kg.Kg ⁻¹)

Produção de Dextrana

γ	= Correlação dada pela razão F1 / F2
ψ	= Correlação dada pela razão FR / F1
ε	= Fração líquida
τ_1	= Correlação dada pela razão V1 / F1 (h)
τ_2	= Correlação dada pela razão V2 / F1 (h)
E(i)	= Concentração de enzima livre no estágio i (g.l ⁻¹)
E0	= Concentração inicial de enzima no estágio I (g.l ⁻¹)
F(i)	= Vazão de alimentação no estágio i (l.h ⁻¹)

- FR = Vazão de reciclo ($l.h^{-1}$)
- K1 = Constante cinética da reação direta: adsorção ($l.g^{-1}.h^{-1}$)
- K2 = Constante cinética da reação inversa: adsorção (h^{-1})
- K3 = Constante cinética: dessorção (h^{-1})
- Km = Constante de Michaelis-Menten ($g.l^{-1}$)
- Q(i) = Concentração de enzima adsorvida no estágio i ($(g.l^{-1})$ resina)
- Qm = Capacidade máxima de adsorção da resina ($g.l^{-1}$)
- S(i) = Concentração de substrato no estágio i ($g.l^{-1}$)
- S0 = Concentração de substrato na alimentação do estágio I ($g.l^{-1}$)
- t = Tempo (h)
- V(i) = Volume de líquido no estágio i ($l.h^{-1}$)
- V_{max} = Velocidade máxima da reação ($g.l^{-1}.h^{-1}$)
- Vs(i) = Volume de sólido no estágio i (l resina. h^{-1})
- Vt = Volume total do reator de líquido no estágio II ($l.h^{-1}$)
- Vt(i) = Volume de líquido no estágio i ($l.h^{-1}$)

Purificação de Proteínas

- ϵ = Fração líquida do meio.
- C(i) = Concentração de impurezas no estágio i do sistema de purificação ($mol.l^{-1}$ e $g.l^{-1}$ para o sistema de purificação de lisozima e lipase, respectivamente).
- C0 = Concentração de impurezas na alimentação ($mol.l^{-1}$ ou $U.l^{-1}$)
- E(i) = Concentração ou atividade de enzimas na Fase líquida no estágio i ($mol.l^{-1}$ e $g.l^{-1}$ para o sistema de purificação de lisozima e lipase, respectivamente).
- E0 = Concentração de enzima na alimentação ($mol.l^{-1}$ ou $U.l^{-1}$)
- F(i) = Fluxo volumétrico no estágio i (alimentação, lavagem ou eluição) ($l.h^{-1}$).
- FP = Fator de purificação
- FR = Fluxo volumétrico do refinado ($l.h^{-1}$)
- k1, k2, k3 = Parâmetros cinéticos da taxa de adsorção e dessorção ($l.g^{-1}.h^{-1}$)

- L = Comprimento axial da coluna ou duto tubular com membrana
- Q(i) = Concentração de enzima adsorvida por volume de resina no estágio i (mol.l^{-1} ou U.l^{-1})
- Qm = Capacidade máxima de enzima adsorvida por volume de resina de adsorção (mol.l^{-1} ou U.l^{-1})
- REND = Rendimento (%)
- S(i) = Concentração de sal (NaCl) no estágio i do sistema de purificação (mol.l^{-1})
- S0 = Concentração de sal na alimentação (mol.l^{-1})
- t = Tempo (h)
- U = Unidade de atividade lipolítica da lipase definida como a quantidade de enzima que libera um mmol de ácido graxo por minuto de reação
- V = Volume do reator (litro)
- Vl = Volume de líquido (litros)
- Vs = Volume de sólido (matriz adsorvente)
- z = Posição axial ao longo da coluna ou duto tubular com membrana

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

1.1. IMPORTÂNCIA E OBJETIVO

A capacidade dos bioprocessos em transformar matéria-prima de baixo custo em produtos de maior valor agregado fez sua importância crescer nos últimos anos. No entanto seu projeto e controle requerem maior cuidado que um processo químico comum, uma vez que os Bioprocessos são muito sensíveis a variações nos estados do sistema como, por exemplo, temperatura e concentração.

Nos últimos anos houve um aumento substancial do uso de ferramentas de Inteligência Artificial tais como Redes Neurais Artificiais, Sistemas Especialistas e Lógica Fuzzy no controle e simulação de Bioprocessos. Inteligência Artificial é uma parte da ciência da computação relacionada ao projeto de sistemas computacionais inteligentes.

Este trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de um software que atua como um assistente, auxiliando na simulação de Bioprocessos para tomada de decisões quanto à operação e projeto. Foi desenvolvida a estrutura básica do software de modo que novas versões deste possam acrescentar novos processos e novas regras para o Sistema Especialista. O software é denominado Bio-PSA (*BioProcess Simulation*

Assistant). A seguir é feita a descrição dos módulos existentes:

MODULO 1: A Simulação de Bioprocessos. No estágio atual de desenvolvimento possui funcionalidade para simulação de produção de etanol e dextrana. A produção de etanol é por via fermentativa utilizando-se o microrganismo *Saccharomyces cerevisiae*. O primeiro processo consiste de quatro reatores de mistura perfeita ligados em série com reciclo de células. Este processo é amplamente utilizado pelas usinas do Estado de São Paulo sendo as informações obtidas validadas industrialmente (Andrietta e Maugeri, 1994). O segundo é um processo de fermentação extrativo com a presença de uma unidade "Flash" à vácuo (SILVA, 1998). A produção de dextrana é feita por um processo similar ao processo CARE (*Continuous Affinity Recycle Extraction*, PUNGOR et al. (1987)). O primeiro processo para produção de etanol e a produção de dextrana possuem a opção de simular um modelo híbrido com a utilização de Redes Neurais Artificiais.

MODULO 2: Funcionalidade para simulação de processos para purificação de proteínas. Contem o processo CARE que combina adsorção de afinidade e tecnologia de membranas onde a matriz adsorvente é recirculada entre os estágios de adsorção, lavagem e eluição.

MODULO 3: Sistema Especialista e uma base de conhecimento para auxílio na operação e design de processos biotecnológicos. O usuário é guiado pelo Sistema Especialista para a coleta de dados iniciais para o projeto e design geral de biorreatores.

MODULO 4: Funcionalidade para treinamento de Redes Neurais Artificiais utilizadas no desenvolvimento de modelos híbridos e "caixa preta".

Todo software foi desenvolvido utilizando-se os compiladores Borland Delphi Professional 6.0, da Borland

Software Corporation, e Compaq Visual Fortran Professional Edition 6.6, da Compaq Visual Corporation. De maneira resumida pode se dizer que a parte gráfica foi desenvolvida em Delphi e os cálculos matemáticos em linguagem Fortran. A seguir é apresentado um resumo da organização desta dissertação.

1.2. ORGANIZAÇÃO DA TESE

Apresentam-se a seguir os principais assuntos abordados neste trabalho.

O capítulo 2 aborda os principais conceitos utilizados no trabalho. Uma breve revisão sobre Bioprocessos, produção de etanol e dextrana, purificação de proteínas, Sistemas Especialistas e Redes Neurais Artificiais é apresentada.

A representação matemática dos modelos utilizados nos módulos do Bio-PSA é mostrada no capítulo 3. São apresentados modelos para simulação de produção de etanol e dextrana e purificação de proteínas. Conceitos matemáticos sobre Bioprocessos de modo geral, Sistema Especialistas (S.E) e Redes Neurais Artificiais (R.N.As) são mostrados na revisão da literatura (Capítulo 2).

O capítulo 4 tem como objetivo a apresentação do software Bio-PSA. Nos capítulos seguintes são apresentados de maneira mais detalhada os módulos desenvolvidos.

O enfoque do Capítulo 5 é o modulo de simulação de Bioprocessos tendo como estudo de caso a produção de etanol e de dextrana.

Encontra-se no Capítulo 6 a simulação de processos para purificação de proteínas tendo como caso de estudo o processo CARE e mais três variações: Sistema CARE de três estágios, sistema CARE de dois estágios com eluição em reator pistonado e sistema CARE de três estágios com eluição em reator pistonado. Todos os sistemas, acima citados, estão habilitados para a simulação da purificação das proteínas

lipase e lisozima. Para o caso de outras proteínas devem-se alterar os respectivos dados cinéticos.

A funcionalidade de criação de S.E (módulo 3) e uma base de conhecimento para auxílio no projeto de processos biotecnológicos são apresentados no Capítulo 7.

O módulo 4 é apresentado no Capítulo 8 e inclui a funcionalidade para treinamento de R.N.A. Esta R.N.A trabalha com o algoritmo de treinamento chamado *Backpropagation*, possui um número variável de camadas e de neurônios, dentre outras características explanadas no mesmo capítulo.

As considerações finais e sugestões para trabalhos futuros estão sumarizadas no Capítulo 9.

CAPÍTULO 2

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Prefácio

Este capítulo apresenta de forma simplificada a teoria dos assuntos discutidos e aplicada neste trabalho. O primeiro item 2.1 traz os conceitos básicos de processos biotecnológicos com enfoque nos assuntos relacionados à base de dados utilizada no Sistema Especialista contido no software Bio-PSA. A produção de etanol é detalhada no item 2.2. Uma breve explanação sobre os processos para purificação de proteínas é apresentada no item 2.3. O item 2.4 discute aspectos gerais da produção de dextrana. O item 2.5 contém os conceitos básicos sobre Inteligência Artificial seguido do item 2.6 que aborda as Redes Neurais Artificiais, que fazem parte de outro módulo do software Bio-PSA. Finalizando, no item 2.7, a teoria sobre os Sistemas Especialistas e seu modo de operação.

2.1. PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

2.1.1. Projeto de biorreatores

O objetivo do projeto de reatores, de modo geral, é de se obter dados sobre o seu tamanho, tipo e modo de operação

para uma finalidade específica. A seleção e projeto de biorreatores incluem uma série de decisões que englobam tópicos de microbiologia e bioquímica básica à engenharia de processos e "marketing". Deseja-se obter um comportamento ótimo do sistema biológico operando a um custo mínimo e maximizando a produtividade e rendimento do Bioprocesso. ASENJO e MERCHUK (1994), sugerem um esquema (Figura 2.1) com passos a serem seguidos para o projeto de biorreatores.

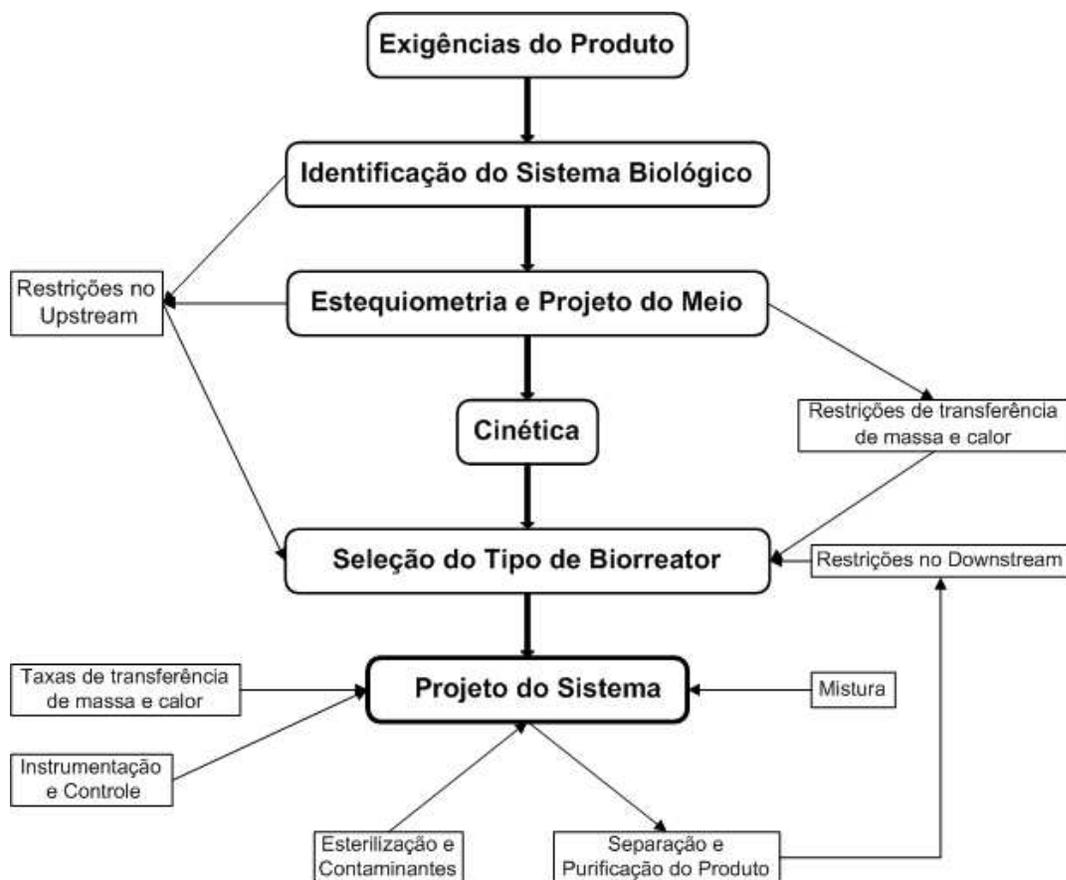


Figura 2.1: Representação esquemática do projeto de um sistema de biorreator (adaptado de ANSEJO e MERCHUK, 1994).

Exigências do produto: Especificação do produto a ser produzido no biorreator (tipo de produto, grau de pureza requerido, etc). Essas especificações são determinadas, geralmente, pela necessidade do mercado ou até por exigências governamentais.

Identificação do sistema biológico: A identificação de um sistema para síntese do produto começa com a seleção do

sistema biológico. Podem ser considerados: microrganismos, células animais ou plantas. Alguns fatores a serem analisados são: condições de crescimento, necessidade de O_2 , pH ótimo (para produção de produto ou crescimento celular), condições de agitação, necessidade de luz, produção ou não de espuma, verificação se o produto é excretado para o meio, dentre outros. Deve-se fazer uma pesquisa sobre as inovações tais como, novas cepas de microrganismos ou microrganismos geneticamente modificados

Estequiometria e Projeto do meio: A análise do tipo de meio de fermentação requerido pelo sistema biológico escolhido deve ser realizada a fim de se maximizar o desempenho do sistema. O meio deve, se possível, facilitar a etapa de separação e purificação. É nessa etapa que se define as quantidades de O_2 e luz, caso sejam necessárias. A relação quantitativa entre o consumo de substrato e formação de produto e geração/liberação do calor (estequiometria) são os primeiros elementos analisados no projeto de reatores de modo geral. O metabolismo dos organismos do sistema resulta na conversão de substrato em produto com a liberação de uma certa quantidade de calor. Os cálculos estequiométricos fornecem relacionamentos quantitativos entre produção de biomassa e síntese de produto, produção de energia, e são extremamente importantes no projeto de Bioprocessos.

Cinética: Os dados sobre a estequiometria complementam as informações cinéticas e, juntos, são o núcleo do projeto de um biorreator. Além da cinética microbiana existe a cinética enzimática que é a parte da enzimologia que estuda a velocidade das reações enzimáticas, e os fatores que influenciam esta velocidade. Os dados cinéticos podem ser obtidos experimentalmente ou através de trabalhos publicados. As Redes Neurais Artificiais são ferramentas que podem ser utilizadas na determinação das cinéticas de Bioprocessos. Vale lembrar que a cinética de um sistema

biológico difere se as células estiverem imobilizadas ou em suspensão.

Seleção do tipo de Biorreator: Escolha do biorreator adequado de acordo com os dados obtidos anteriormente. Todas as restrições possíveis do sistema biológico devem ser analisadas para a seleção do melhor biorreator. A análise da possibilidade, ou necessidade, de reciclo de células deve ser realizada.

Projeto do Sistema: Após a seleção do biorreator deve-se definir o seu modo de operação, as equações básicas de operação, a análise do aumento de escala, a necessidade, tipo e controle da esterilização, o controle de contaminantes, o tratamento da água, ar e outros gases que possam ser utilizados no sistema, outros acessórios necessários, como o consumo de vapor, etc.

2.1.2. O sistema biológico e o meio

Neste item são apresentadas considerações para seleção do sistema biológico adequado e a formulação e otimização do meio.

2.1.2.1. Exigências do produto

O primeiro passo ao se planejar um Bioprocesso é definir quais são as exigências do produto a ser comercializado. Os objetivos comerciais são determinados pela necessidade do mercado. Segundo ASENJO e MERCHUK (1994) os produtos biotecnológicos comerciais se enquadram dentro de uma escala de especificação constituída de dois extremos:

- Produtos de baixo custo e largo volume de produção, como o etanol produzido por via fermentativa.
- Produtos sofisticados de alto custo e rigorosas especificações, com baixo volume de produção, como as vacinas e algumas enzimas.

Deve-se ter uma definição objetiva do que se deseja produzir e a estimativa de custo envolvido.

2.1.2.2. Identificação do sistema biológico

Antes de se fazer as considerações sobre o sistema biológico a ser utilizado no processo deve-se lembrar que um mesmo produto pode ser obtido de sistemas diferentes. Várias pesquisas são realizadas mundialmente com o intuito de se descobrir novos microrganismos para uso comercial assim como o aprimoramento genético dos já conhecidos. Após a definição do produto ou atividade microbiana que se deseja é necessária uma pesquisa na literatura e sua procura em coleções de culturas e/ou isolamento de alguma amostra. Um cuidado especial com a estocagem é fundamental visando assegurar o acesso a estoques de culturas viáveis, não contaminadas e prevenidas de mutações genéticas. O desenvolvimento de microrganismos recombinantes possibilitou o surgimento de processos com rendimento mais alto e baixo custo de produção. Por isto estão cada vez mais presentes na indústria. A técnica de DNA recombinante é altamente específica. O(s) gene(s) de interesse é (são) produzido em um microrganismo hospedeiro onde a proteína ou outro metabólico desejado é produzido com rendimento e/ou produtividade maior. Inicialmente esta técnica era utilizada somente para produtos farmacêuticos, mas outros produtos estão sendo produzidos com esta técnica.

O uso apenas da enzima responsável pela reação desejada também deve ser considerado. Apesar do custo de produção desta enzima ser alto na maioria dos casos, sua possível reutilização e diminuição de etapas nos processos de separação e purificação pode ser vantajosa.

2.1.2.3. Características das culturas e sua influência no "design" de biorreatores

O estudo deste item não considera os biorreatores com células imobilizadas. Discutir-se-á algumas características

dos microrganismos e como elas podem influenciar na escolha do tipo de biorreator.

A primeira característica a se considerar é o crescimento. Através de pesquisa em literatura especializada pode-se definir o tipo de crescimento do microrganismo escolhido. Alguns itens gerais serão mostrados a seguir.

A divisão dos microrganismos em procariontes e eucariontes não é tão importante quando se deseja fazer o "design" de biorreatores. Neste caso é mais importante a distinção entre microrganismo unicelular, pluricelular ou com crescimento por brotamento.

As bactérias são geralmente unicelulares e possuem três formas básicas: espiral, bastão e esférica (BAILEY e OLLIS, 1986). Elas reproduzem por fissão binária onde uma célula mãe dá origem a duas células filhas. Algumas formam esporos se submetidas a situações extremas como alta temperatura, voltando à forma vegetativa em condições normais. Alguns microrganismos produzem uma cápsula de polissacarídeos sob determinadas condições o que altera drasticamente a viscosidade do meio. Se o produto desejado não é a cápsula deve-se evitar trabalhar nestas condições. Problemas com viscosidade ocorrem também em sistema biológicos constituídos de fungos filamentosos ou de *Actinomicetos*. Os *Actinomicetos* são bactérias que crescem produzindo hifas, o gênero *Streptomyces* é muito importante produzindo 90% dos antibióticos conhecidos (DEWITT et al., 1989).

As leveduras são fungos, mas se diferenciam deles por serem bolores unicelulares. São mais simples que outros fungos crescendo e se reproduzindo mais rapidamente que estes. Uma levedura típica consta de células ovais, que se multiplicam assexuadamente comumente por brotamento. Elas despertam grande interesse industrial e são muito usadas na tecnologia de DNA Recombinante (ASENJO e MERCHUK, 1994).

A taxa de crescimento de um sistema microbiano depende de vários fatores incluindo espécie, pH, composição do meio, suplemento de O₂ e condições de mistura. De um modo geral uma cultura microbiana dobra de tamanho, em condições ótimas, no intervalo de tempo mostrado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Intervalo de tempo para cultura microbiana dobrar de tamanho.

Microrganismo	Intervalo Médio	μ (h ⁻¹)
Bactéria	20-120 min	2,00-0,35
Levedura	1-4h	0,70-0,17
Fungos Filamentosos	4-24h	0,17-0,03

Altas taxas de crescimento necessitam de sofisticados sistemas de controle de pH. A alta produção de energia requer, no caso de um fermentador com alta densidade celular, bom sistema de resfriamento. Neste caso deve-se calcular a produção máxima de calor do processo para se definir os requerimentos de resfriamento necessários.

Para baixas taxas de crescimento a preocupação maior é com a contaminação. O resfriamento geralmente não é necessário podendo até ser requerido um sistema de aquecimento.

Outro fator importante de se obter é a cinética de crescimento microbiana. Em sua fase exponencial de crescimento as células crescem a uma taxa específica de crescimento constante. A Equação 2.1 e Equação 2.2 mostram a relação do crescimento celular com o tempo, onde μ_{\max} é a taxa específica de crescimento (h⁻¹) e x a concentração celular (SCRAGG, 1991).

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{\max} \cdot x \quad \text{Equação 2.1}$$

$$x = x_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \quad \text{Equação 2.2}$$

Existem várias relações para μ . Um conhecimento mais aprofundado sobre cinética será tratado em outro item.

Segundo ASENJO e MERCHUK (1994), um sistema de mistura adequado para a cultura microbiana é essencial no "design" devido a muitos aspectos, dentre eles:

- Fornecimento adequado de nutrientes e oxigênio às células.
- Remoção de substâncias "tóxicas" produzidas no processo.
- Transferência de calor adequada facilitando o controle da temperatura.
- Homogeneidade da cultura melhorando a precisão do monitoramento de metabólitos.
- Rápida dispersão das soluções adicionadas à cultura como ácidos, bases e nutrientes.

Um aumento exagerado na agitação causa estresse hidromecânico que pode levar ao rompimento celular e inviabilidade do processo. A viscosidade do meio pode mudar sob determinadas condições interferindo no mecanismo de mistura e na transferência de massa. Os principais fatores que influenciam as propriedades reológicas nas fermentações microbianas são:

- Microrganismo (ex. células simples ou micélio).
- Metabólitos formados na fermentação (ex. Biopolímeros).
- Substratos (ex. Celulose, amido...).

Geralmente, em suspensão simples a cultura microbiana tem viscosidade similar à da água. Entretanto, alta concentração celular ou rompimento de células podem aumentar drasticamente a viscosidade.

Com relação à demanda de oxigênio, os microrganismos podem ser divididos em três grupos: aeróbios, microaeróbios e anaeróbios. Os microrganismos anaeróbios não necessitam de oxigênio podendo até serem sensíveis à presença deste. Os microaeróbios requerem pequena quantidade de oxigênio e geralmente não impõem restrições ao "design" do biorreator.

Já os aeróbios necessitam de grande quantidade de oxigênio devendo ser calculada a demanda máxima de O₂ para o sistema.

Outro fator a ser considerado é o efeito do pH na cultura. A maioria dos microrganismos cresce em pH 5.5–8.8. Alguns microrganismos acidófilos têm pH ótimo muito baixo como o *Thiobacillus ferroxidans* com pH ótimo de 1.5. Outros têm pH ótimo muito alto como o *Bacillus macerans* que cresce em pH 9.0. Mas são exceções, pois a maioria se encontra no intervalo citado anteriormente. Vale lembrar que os microrganismos tendem a baixar o pH da cultura durante o crescimento.

A temperatura ótima de crescimento é outro fator de grande importância. Os microrganismos são classificados em três tipos de acordo com sua temperatura ótima conforme a Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Classificação dos microrganismos por temperatura de crescimento (Adaptado de MADIGAN et al, 2000).

Tipo	Temperatura média		Exemplos
	Crescimento	Ótima	
Hipertermófilos	65 a 100°C	88°C	<i>Thermococcus celer</i>
Termófilos	40 a 70°C	60°C	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
Mesófilos	10 a 45°C	39°C	<i>Escherichia coli</i>
Psicrotróficos	-5 a 12°C	4°C	<i>Polaromonas vacuolata</i>

Os mesófilos constituem um grupo importante por incluir a maioria dos microrganismos acidificantes (JAY, 1994). Esses microrganismos também são importantes devido à termorresistência apresentada por vários gêneros.

Os psicrotróficos não são muito utilizados em processos industriais, mas seu estudo, principalmente na tecnologia de DNA recombinante, vem crescendo muito.

Os microrganismos termófilos são conhecidos como contaminantes na indústria de fermentação, mas possuem algumas vantagens interessantes. Como o processo ocorre a altas temperaturas fica mais fácil coletar produtos voláteis diminuindo assim possível inibição por produto. A maioria dos termófilos não é patogênica ao homem e o crescimento em temperaturas elevadas é geralmente rápido.

Algumas bactérias necessitam de luz para se desenvolverem assimilando CO₂ por fotossíntese. As algas (Ex. *Spirulina* e *Chlorocella*) necessitam também de um período de exposição à luz para seu crescimento, além de água, gás carbônico e substâncias inorgânicas. O "design" de biorreatores com fornecimento de luz é incomum e novos modelos vêm sendo implementados.

Outro fenômeno que ocorre em Bioprocessos é a formação de espumas. O fluxo de ar no biorreator e a agitação formam pequenas bolhas que, se não destruídas, produzem a espuma. A força necessária para rompimento da bolha é dependente da tensão superficial do líquido. Algumas substâncias produzidas no processo, como óleos e gorduras, diminuem a tensão do meio favorecendo a formação de espuma. Salvo algumas exceções, como a indústria cervejeira, a formação de espuma tem aspectos negativos no processo. Ocorre a diminuição do volume real do reator, aumento perigoso da pressão e entupimento de filtros, que aumenta o risco de contaminação.

O estudo da formação de bolhas em biorreatores é complicado, pois depende do microrganismo e sua dispersão no meio. São utilizados dispositivos mecânicos e/ou agentes químicos antiespuma. Entretanto estes agentes podem prejudicar o desempenho de etapas subseqüentes como micro ou ultrafiltração. Os agentes antiespuma são adicionados quando o nível de espuma chega ao limite máximo. Ao se voltar a um nível seguro cessa a adição.

A utilização de microrganismos mutantes que não formam espuma é uma alternativa para não se utilizar agentes químicos ou equipamentos antiespuma. Vale lembrar que em produtos farmacêuticos não é permitido o uso de agentes químicos no controle de espuma.

Em termos de "esterilidade" um Bioprocessos pode ocorrer em três condições:

- Condições assépticas restritas, onde nenhuma outra espécie de microrganismo é permitida e o controle é realizado por assepsia (ex. uso de microrganismos recombinantes).
- Condições parcialmente seletivas, onde algumas outras espécies coexistem (ex. leveduras a pH 3,5).
- Condições altamente seletivas, onde dificilmente outro microrganismo irá coexistir devido às condições do meio (ex. combinação de pH e temperatura baixa).

Geralmente processos longos requerem melhor controle de contaminação do meio.

Não se deve esquecer de consultar o(s) órgão (ões) regulamentador (es) do governo sobre possíveis restrições ao uso do microrganismo escolhido para o processo e características finais do produto comercial.

A interrupção da fase logarítmica de crescimento do microrganismo, quando não há carência de O_2 , é usualmente atribuída a déficit de substrato ou acúmulo de substâncias tóxicas. Em muitos casos a causa desta interrupção não é estudada. No caso de inibição pelo produto um modo de retirá-lo do processo deve ser analisado. Uma boa otimização do meio pode também reduzir este problema com a redução de componentes potencialmente problemáticos do meio.

Os produtos de processo fermentativo podem ser divididos em: produtos associados ao crescimento, produtos parcialmente associados ao crescimento e produtos não associados ao crescimento. Os produtos associados ao crescimento são também chamados de metabólitos primários e incluem ácidos orgânicos, nucleotídeos, aminoácidos, lipídios, vitaminas e polissacarídeos. São produzidos em paralelo com o crescimento e podem, a princípio, serem produzidos em cultura contínua. Usualmente, devido ao baixo preço dos produtos, seria economicamente viável se o

crescimento e a produção tiverem taxas relativamente altas. Os produtos não associados ao crescimento também chamados de metabólitos secundários incluem antibióticos, alcalóides, toxinas microbianas e micotoxinas. Estes produtos são usualmente formados na fase estacionária de crescimento o que causa complicações no processo contínuo.

2.1.2.4. Formulação e otimização do meio

A composição do meio tem um efeito importantíssimo na taxa de crescimento. Os principais fatores que afetam a taxa de crescimento são as fontes de carbono e nitrogênio como também as vitaminas e alguns elementos limitantes como potássio e fósforo e minerais. As fontes de carbono mais utilizadas são glicose e sacarose. Outras de menor importância são hidrocarbonetos e dióxido de carbono. Um grande número de minerais é necessário para o crescimento, mas apenas em pequenas quantidades. Em alta quantidade podem atuar como inibidores.

O crescimento e a produção de metabólitos por microrganismos em um Bioprocessamento são resultados de interações entre efeitos intra e extracelular conforme mostrado na Figura 2.2.

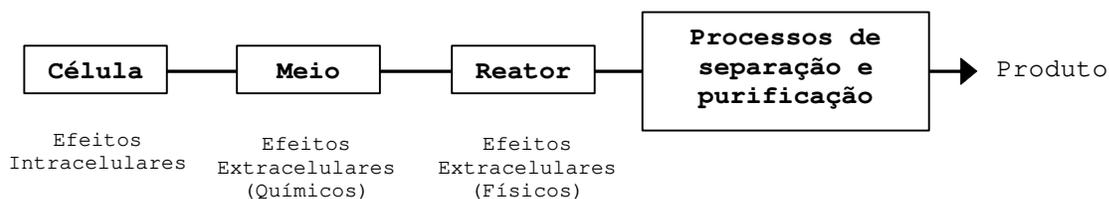


Figura 2.2: Passos fundamentais de um Bioprocessamento (adaptado de ASENJO e MERCHUK, 1994).

Os efeitos intracelulares são relacionados com os mecanismos de controle da replicação, transcrição e translação de informação genética. Já os efeitos extracelulares podem ser de natureza química ou física. Os parâmetros físicos são representados pela temperatura,

viscosidade, condições de agitação/ aeração, etc., e os químicos incluem todos os nutrientes utilizados.

Em um meio fisicamente e nutricionalmente apropriado uma cultura microbiana irá crescer a uma taxa definida e característica. Este crescimento se torna restrito com mudança no meio devido ao crescimento do microrganismo ou alterações externas com mudanças químicas ou físicas.

Os meios utilizados em Bioprocessos são agrupados em sintéticos ou complexos. Os meios sintéticos são aqueles em que os componentes são quimicamente definidos. Os meios complexos são os mais utilizados industrialmente, mas sua composição não é definida. Os passos para o desenvolvimento de meios de cultura sugeridos por ASENJO e MERCHUK (1994) são mostrados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3: Passos e tópicos essenciais relacionados ao desenvolvimento de meio de cultura.

Passos	Tópicos
"design"	Requerimentos nutricionais para crescimento e formação de produto. Outros aditivos. Mecanismos bioquímicos. Processos "Upstream" e "Downstream". Bioviabilidade dos íons. Custo, viabilidade e adequação dos substratos.
Formulação	Composição de massa celular, estequiometria de crescimento e formação de produto. Coeficientes de rendimento e outros parâmetros de fermentação.
Otimização	Metodologias de otimização.

Dentre os requerimentos nutricionais para crescimento e formação de produto destacam-se macroelementos, microelementos, fatores de crescimento e influencia de fatores físicos. Não se deve esquecer que os requerimentos para se obter máximos rendimento e produtividade de metabólitos podem ser diferentes daqueles necessários para se obter máximo crescimento. Isto é válido principalmente para processos com crescimento não associado.

Os macroelementos são carbono, oxigênio, hidrogênio, enxofre, fósforo, potássio e magnésio. Constituem cerca de

90-95% do peso seco da massa microbiana. Os microelementos são geralmente adicionados na forma de sais sendo os principais Ca, Mn, Cu, Co e Zn. Fatores de crescimento são componentes necessários para o microrganismo, mas que este não consegue sintetizar, como exemplo pode-se citar alguns tipos de vitaminas e aminoácidos. Os principais fatores físicos a afetarem o meio de cultura são temperatura e atividade de água.

Em certos casos para se obter uma melhor produtividade, pode ser necessária a adição de agentes com funções específicas como quelantes, estimulantes, antiespuma, estabilizantes e neutralizantes.

O "*design*" do meio deve levar em conta também os passos ocorridos antes da fermentação (*upstream*) e logo após ela (*downstream*). Na etapa anterior à fermentação, pode ser necessário um pré-tratamento de elementos que formarão o meio como a quebra de amidos, conversões e esterilização. Na esterilização com uso de calor, podem ocorrer reações indesejadas, como a de Maillard, como também a perda de atividade de elementos importantes como vitaminas. Somente com esta profunda análise se poderá ter uma informação real do meio. Os processos de separação e purificação posteriores à fermentação também irão sofrer influências dos componentes do meio de cultura utilizado. Por exemplo, a adição de um componente no meio pode aumentar o rendimento da fermentação, mas requerer um alto custo nos processos de separação e purificação inviabilizando seu uso.

O custo e um suplemento regular da fonte utilizada na fabricação do meio de cultura devem ser analisados e são de grande importância na adequação deste material ao processo. Alguns materiais podem ser sazonais necessitando de reserva estocada e requisitando estudos para condições ótimas de estocagem. Outras fontes têm composição variada dependendo do local onde foi produzida e quando foi. Estas considerações devem ser analisadas assim como o estudo de

fontes alternativas. Alguns aspectos importantes devem ser considerados na preparação do meio para fins comerciais. O ponto principal é assegurar a reprodutibilidade do meio. Sua composição deve ser sempre a mesma. Para isto deve-se:

- Avaliar e considerar os efeitos de estocagem dos materiais utilizados na composição do meio.
- Evitar a adição dos componentes em ordem errada.
- Caso o meio contenha sólidos em suspensão é necessário preparar em um tanque separado, assegurar agitação adequada ao se transferir para o agitador.

Com relação à otimização do meio muitas metodologias podem ser aplicadas. As mais adequadas e rigorosas são baseadas em culturas contínuas e técnicas estatísticas.

2.1.3. Cinética

Para se realizar o design de um processo biotecnológico é necessário saber a taxa com que ocorrem mudanças nas concentrações, por exemplo, de biomassa, substrato e produto. Os dados da cinética microbiana de crescimento, distribuição da população de células, síntese de produto e consumo de substrato são de grande importância na produção, controle e otimização do processo (ASENJO e MERCHUK, 1994). É importante saber também como o ambiente afeta a cinética. Em alguns casos o uso de modelos simplificados é suficiente para o design do sistema. Contudo, em outros pode ser vantajoso o uso de modelos mais sofisticados.

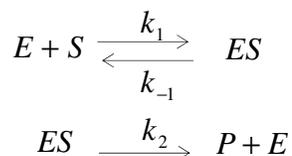
2.1.3.1. Cinética Enzimática

As enzimas atuam como catalisadores nas reações. As similaridades entre um catalisador sintético e uma enzima iniciam-se pela técnica na modelagem da cinética da reação. As expressões para taxa eventualmente obtidas para ambos catalisadores são muito parecidas e muitas vezes idênticas. Isto acontece, pois, em ambos os casos sabe-se que as

moléculas reagentes formam um complexo com o catalisador (BAYLEY e OLLIS, 1986).

A cinética de Michaelis-Menten é uma das mais utilizadas em processos biotecnológicos. Como será demonstrado, ela possui forma matemática idêntica à cinética de Lagmuir-Hinshelwood ou Hougen-Watson utilizadas em processos químicos.

Assumindo uma simples reação enzimática em que a enzima (E) e o substrato (S) se unem para formar o complexo enzima-substrato (ES) que se dissocia formando o produto (P) e enzima livre como abaixo:



onde K representa constantes da reação.

Algumas simplificações foram realizadas por Michaelis e Menten para se construir o modelo matemático sendo elas:

- A reação inversa na formação de produto não ocorre uma vez que a concentração de produto é considerada desprezível. Isto porque o estudo se baseou em velocidades iniciais.
- Após um regime transiente inicial muito curto, a concentração do complexo (ES) se mantém constante:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0$$

Logo:

$$\frac{d[ES]}{dt} = [E][S]K_1 - [ES]K_2 - [ES]K_{-1} = 0$$

$$\frac{K_{-1} + K_2}{K_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} = K_m$$

Sendo K_m chamada de constante de Michaelis-Menten e também podendo ser denominada constante de dissociação uma vez que k_{-1} é geralmente muito menor que K_1 e K_2 , ou seja:

$$K_m = \frac{K_2 + K_{-1}}{K_1} \cong \frac{K_2}{K_1}$$

Como toda enzima presente está ou no estado livre ou associada no complexo tem-se que: $[E] + [ES] = [E_0]$, onde (E_0) é a concentração total de enzima no sistema. Visto que a decomposição do complexo (ES) em (P) e (E) é assumida como irreversível, esta será a etapa limitante do processo, assim:

$$v = K_2[ES]$$

E como toda enzima participa da reação a velocidade será máxima quando: $v_{\max} = K_2[ES]$

$$\text{Logo: } \frac{v}{v_{\max}} = \frac{[ES]}{[E_0]} = \frac{\frac{[E][S]}{K_m}}{[E] + [ES]} = \frac{\frac{[E][S]}{K_m}}{[E] + \frac{[E][S]}{K_m}}$$

$$v = v_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Equação de Michaelis-Menten}$$

Algumas considerações podem ser realizadas a partir da acima:

- Se $[S]$ é muito maior que K_m então $v = v_{\max}$
- Se $[S]$ é muito menor que $K_m \rightarrow v = \frac{v_{\max}}{K_m}[S]$
- Se $v = \frac{v_{\max}}{2} \rightarrow K_m = [S]$

A equação de Michaelis-Menten em sua forma original não torna fácil estimar os parâmetros cinéticos v_{\max} e K_m . Para facilitar este cálculo foi realizado um rearranjando na equação de Michaelis-Menten obtendo-se as seguintes equações:

- Equação de Lineweaver-Burk: $\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}}$
- Equação de Eadie-Hanes: $\frac{[S]}{v} = \frac{1}{v_{\max}} [S] + \frac{K_m}{v_{\max}}$
- Equação de Hofstee: $v = -K_m \frac{v}{[S]} + v_{\max}$

A Tabela 2.4 mostra um resumo das principais reações enzimáticas e suas respectivas equações cinéticas.

Tabela 2.4: Resumo das principais reações enzimáticas e respectivas equações.

Reação Enzimática	Equação
<p>Reações reversíveis</p> $E + S \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} ES \xrightleftharpoons[k_2]{k_2} E + P$	$v = -\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = \frac{\left(\frac{v_s}{K_s}\right)S - \left(\frac{v_p}{K_p}\right)P}{1 + \frac{S}{K_s} + \frac{P}{K_p}}$ <p>sendo v_s e K_s idênticos a v_{\max} e K_m</p>
<p>Reações com múltiplos substratos</p> $E + S_1 \xrightleftharpoons[k_1]{k_1} ES_1$ $E + S_2 \xrightleftharpoons[k_2]{k_2} ES_2$ $ES_1 + S_2 \xrightleftharpoons[k_{12}]{k_{12}} ES_1S_2$ $ES_2 + S_1 \xrightleftharpoons[k_{21}]{k_{21}} ES_1S_2$ $ES_1S_2 \xrightleftharpoons[k]{k} P + E$	$v = v_{\max}^* \frac{S_1}{K_1^* + S_1}$ <p>onde:</p> $v_{\max}^* = \frac{KEoS_2}{S_2 + K_{12}}$ $K_1^* = \frac{K_{21}S_2 + K_1K_{12}}{S_2 + K_{12}}$
<p>Reação com inibição reversível puramente competitiva</p> $E + S \xrightleftharpoons[k_s]{k_s} ES$ $E + I \xrightleftharpoons[k_i]{k_i} EI$ $ES \xrightarrow{k} E + P$	$v = \frac{KE_0S}{S + K_s \left(1 + \frac{I}{K_i}\right)}$

Para o cálculo dos parâmetros das equações da Tabela 2.4 pode-se utilizar os valores das intersecções nos gráficos de Lineweaver-Burk para enzimas com inibidores conforme mostrado na Tabela 2.5.

Tabela 2.5: Intersecções nos gráficos de Lineweaver-Burk para enzimas com inibidores (BAYLEY e OLLIS, 1986).

Tipo	
Puramente Competitiva	$\frac{1}{v_{\max}} \qquad \frac{1}{K_s \left(1 + \frac{i}{K_i}\right)}$
Parcialmente Competitiva	$\frac{1}{v_{\max}} \qquad \frac{1 + \left(\frac{i K_m}{K_i K'_m}\right)}{K_m \left(1 + \frac{i}{K_i}\right)}$
Puramente não-competitiva	$\frac{1 + \frac{I}{K_i}}{v_{\max}} \qquad \frac{1}{K_m}$
Parcialmente não-competitiva	$\frac{1 + \frac{I}{K_i}}{v_{\max} + \frac{K' E_0}{K_i}} \qquad \frac{1}{K_m}$
Mista	$\frac{1 + \frac{i K_m}{K_i K_m}}{v_{\max}} \qquad \frac{1 + \left(\frac{i K_m}{K_i K'_m}\right)}{K_m \left(1 + \frac{i}{K_i}\right)}$

Outras Influências na atividade enzimática

O projeto de um sistema enzimático não pode ser considerado completo sem a exploração das variáveis que afetam o catalisador e a análise quantitativa desta influência. Até o momento foi demonstrado como a associação da enzima com diferentes componentes pode influenciar a taxa de reação. Outros fatores podem afetar a atividade catalítica da enzima seja afetando a estrutura desta ou seu estado químico. Alguns destes fatores são (BAYLEY e OLLIS, 1986):

- pH
- Temperatura

- Forças Fluidas (Ex. Forças hidrodinâmicas e pressão hidrostática)
- Agentes químicos
- Irradiação

a) pH

Quando há mudanças no pH a enzima é afetada em seu sítio catalítico e em sua conformação. Isto porque a enzima possui vários grupos ionizáveis. As enzimas trabalham em uma determinada faixa de pH com um pH ótimo. Existem modelos matemáticos que expressam esta relação entre atividade e pH que podem ser obtidos na literatura especializada.

b) Temperatura

A taxa de uma reação catalisada por uma enzima aumenta com a temperatura como em toda reação química. Entretanto a maioria das enzimas é afetada negativamente por altas temperaturas onde ocorre a perda de sua atividade. Como mostrado na Figura 2.3 a taxa de reação aumenta com a temperatura até um nível máximo onde abruptamente cai com o aumento da temperatura. Sabe-se que a maioria das enzimas se desnatura a temperaturas acima de 40°C.

Deve-se ter bastante atenção no processo de estocagem da enzima. A partir de certo período de tempo ocorre a desnaturação da enzima mesmo a temperaturas moderadas. Algumas enzimas podem também perder sua atividade quando congeladas. Modelos matemáticos para ativação térmica e desnaturação podem ser encontrados em literatura especializada.

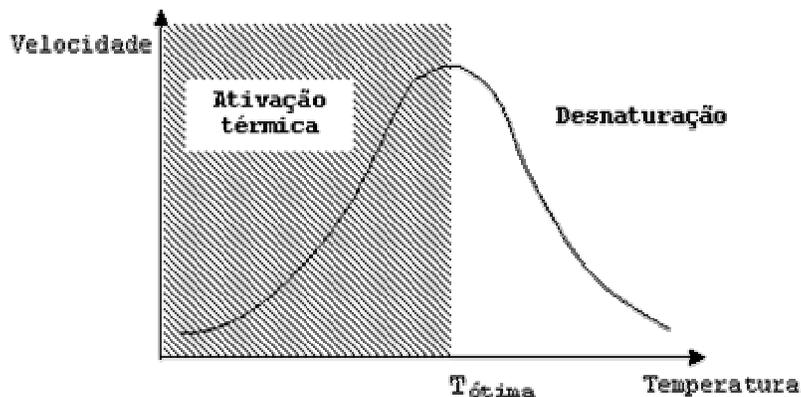


Figura 2.3: Efeito da temperatura na velocidade de reação.

2.1.3.2. Cinética Microbiana

Os microrganismos quando colocados em um meio com condições essenciais satisfatórias tais como quantidade de nutrientes, pH e temperatura, começam a se multiplicar. O processo de crescimento terá dois tipos de manifestações dependendo da morfologia das células envolvidas (BAYLEY e OLLIS, 1986):

- **Microrganismos unicelulares:** o aumento de biomassa está associado ao aumento de população. Neste contexto vale citar que as leveduras aumentam o volume celular acarretando erro na determinação de biomassa.
- **Fungos filamentosos:** o aumento de biomassa está associado ao aumento do comprimento e do número de micélios. Há aumento de tamanho e densidade, mas não necessariamente de número.

Associados ao crescimento de células existem dois outros processos: consumo de substrato e liberação de produtos metabólicos finais no meio. As taxas com que estes processos ocorrem variam muito durante o processo de crescimento celular.

Dependendo do uso, da aplicação e da complexidade da situação física os modelos que representam o crescimento celular podem variar bastante. Esta variação engloba os

modelos bem simples e os mais sofisticados. A Figura 2.4 mostra alguns parâmetros, fenômenos e interações que influenciam o comportamento cinético da população de células.

A utilização de modelos matemáticos simplificados faz-se necessária para tornar prática a representação matemática da cinética. É quase impossível tentar formular um modelo que inclua todos os detalhes mostrados na Figura 2.4. Assim, algumas simplificações são realizadas. Uma das mais utilizadas é a que considera um único substrato limitante sendo o restante em excesso de modo que seja considerada somente a concentração deste substrato. Se necessário pode-se incluir outro componente do meio como um inibidor. Também o uso de controles externos no biorreator pode regular e manter constantes algumas variáveis do meio como pH, temperatura e concentração de O₂ dissolvido (BAYLEY e OLLIS, 1986).

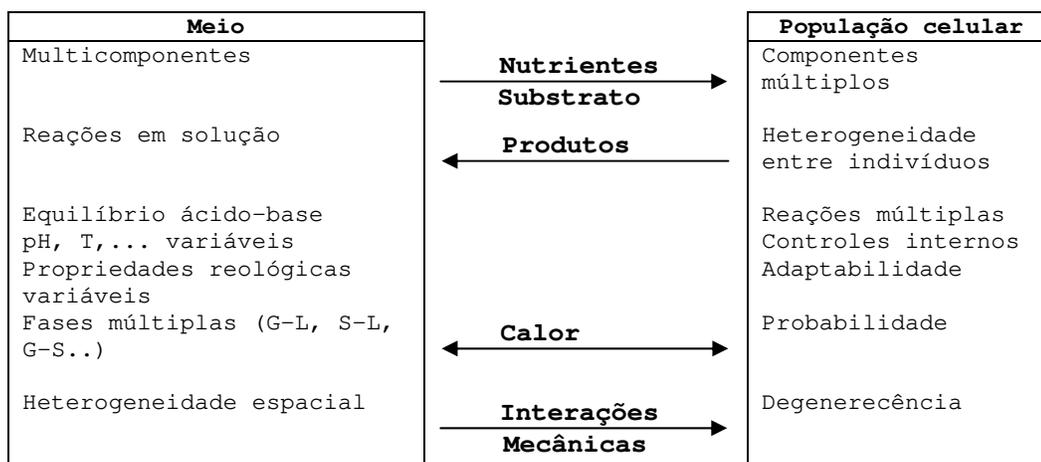


Figura 2.4: Resumo de alguns parâmetros, fenômenos e interações que determinam a cinética da população de células (BAYLEY e OLLIS, 1986).

Por outro lado, pode se tornar necessária, em alguns casos, a inclusão de variáveis múltiplas no modelo de modo a se obter uma melhor representatividade do comportamento cinético.

A Figura 2.5 mostra diferentes perspectivas para representação da cinética de crescimento celular. Esta

perspectiva foi, segundo BAYLEY e OLLIS (1986), resumida por Arnold Fredrickson e Henry Tsuchiya:

- Modelo estruturado: células tratadas como indivíduo de múltiplos componentes.
- Modelo não estruturado: células tratadas como um componente soluto do meio.
- Modelo segregado: células tratadas como seres individuais distintos.
- Modelo não segregado: composição média semelhante.

Os modelos segregados e estruturados são os modelos reais. Em alguns casos o uso de modelos não simplificados é vantajoso.

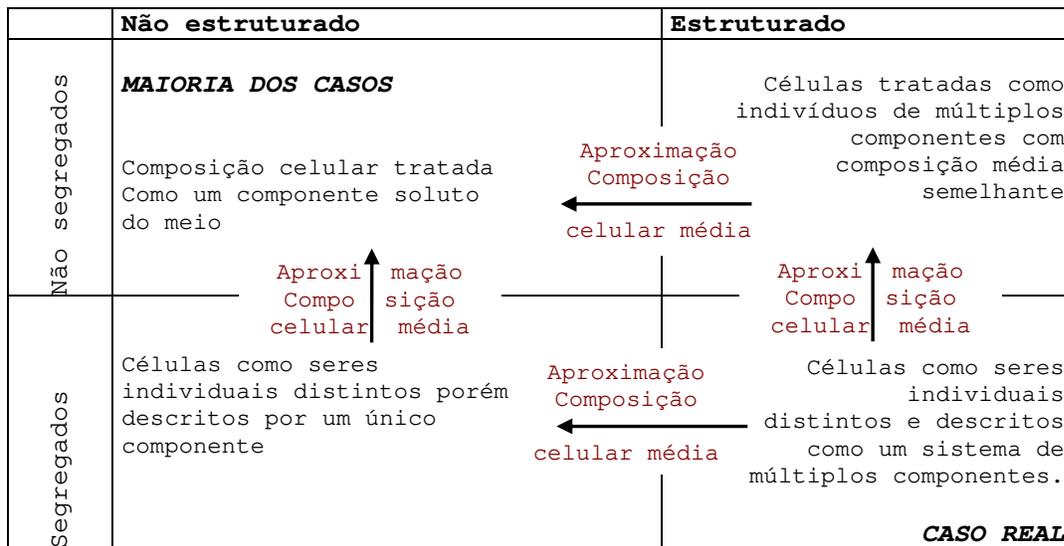


Figura 2.5: Diferentes perspectivas para representação da cinética da população celular (BAYLEY e OLLIS, 1986).

a) Modelos cinéticos de crescimento microbiano

O modelo cinético de crescimento microbiano mais utilizado é o mostrado na Equação 2.3 denominado *Monod*. É muito semelhante ao modelo de cinética enzimática Michaelis-Menten mostrado no item 2.1.3.1.. Este modelo é válido se somente um substrato é limitante estando os outros em excesso.

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S}$$

Equação 2.3

onde
$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

SCHMIDELL et al. (2001) mostram um resumo de modelos não estruturados com crescimento balanceado que são apresentados na Tabela 2.6. Estes modelos não estruturados não devem ser utilizados quando a composição celular mudar significativamente no processo afetando assim a cinética. Para estes casos devem ser utilizados modelos estruturados disponíveis em literatura especializada.

Tabela 2.6: Modelos cinéticos não estruturados descritos para a representação de diversos fenômenos identificados em processo fermentativos (Adaptado de SCHMIDELL et al. 2001).

Referência	Modelo Cinético
Crescimento com um único substrato limitante	
MONOD	$\mu_x = \frac{\mu_m s}{K_s + s}$
MOISER	$\mu_x = \frac{\mu_m s^n}{K_s + s^n}$
CONTOIS	$\mu_x = \frac{\mu_m s}{K_s x + s}$
Morte celular	
SINCLAIR; KRISTIANSEN	$\mu_d = -K_d$
Crescimento com um único substrato limitante e inibidor	
ANDREWS	$\mu_x = \frac{\mu_a s}{K_s + s + \frac{S}{K_i^2}}$
WU et al.	$\mu_x = \frac{\mu_a}{1 + \frac{K_s}{S} + \left(\frac{S}{K_i}\right)^n}$
Crescimento com múltiplo substrato limitante (Uso preferencial de S ₁)	
DUNNET et al.	$\mu_x = \frac{\mu_{m1} s_1}{K_{s1} + s_1} + \frac{\mu_{m2} s_2}{K_{s2} + s_2 + \frac{s_1^2}{K_i}}$
Crescimento com múltiplo substrato limitante (Uso preferencial de S ₁ e S ₂)	
MEGEE et al.	$\mu_x = \frac{\mu_{m1} s_1 s_2}{(K_{s1} + s_1) + (K_{s2} + s_2)}$
TSAO; HANSON	$\mu_x = \left(\mu_0 + \frac{\mu_1 s_1}{K_{s1} + s_1} + \frac{\mu_2 s_2}{K_{s2} + s_2} \right) \left(\frac{s_3}{K_{s3} + s_3} \right)$

Consumo de substrato limitante para manutenção	
PIRT	$\mu_s = \frac{1}{Y_{x/s}} \mu_x + m_s$
ZENG; DECKWER	$\mu_s = \frac{1}{Y_{x/s}} \mu_x + m_s + \Delta\mu_s^{\max} \frac{S - S^*}{K^* + S - S^*}$
<p>Onde:</p> <p>μ_x = velocidade específica de crescimento.</p> <p>μ_d = velocidade específica de morte.</p> <p>μ_s = velocidade específica de consumo de substrato.</p> <p>S, S_1, S_2 e S_3 = concentrações de substratos limitantes.</p> <p>S^* = concentração de S para manter μ_x.</p> <p>X = concentração celular.</p> <p>$Y_{x/s}$ = fator de conversão de substrato em células.</p> <p>m_s = consumo de substrato para manutenção.</p> <p>Os demais são parâmetros cinéticos.</p>	

Existem também os modelos de formação de produto. A formação de produto pode ser classificada em diferentes grupos (ASENJO e MERCHUK, 1994):

- a. Produto principal é resultado direto do metabolismo energético.
- b. Produto principal é resultado indireto do metabolismo energético.
- c. Produto principal é um metabólico secundário.
- d. Produto principal é uma proteína intra ou extracelular.

Segundo BAYLEY e OLLIS (1986), Gaden simplificou os grupos acima e classificou a relação entre produção e crescimento celular em:

- Tipo 1. Produção associada ao crescimento.
- Tipo 2. Produção parcialmente associada ao crescimento.
- Tipo 3. Produção dissociada do crescimento.

A Figura 2.6 mostra os respectivos gráficos destes grupos. Os modelos cinéticos são mostrados abaixo:

Tipo 1:
$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} \quad \pi = \alpha\mu$$

onde: π é a taxa específica de formação de produto.

Tipo 3: $\frac{dP}{dt} = \beta X \quad \pi = \beta$

Tipo 2: $\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad \pi = \alpha\mu + \beta$

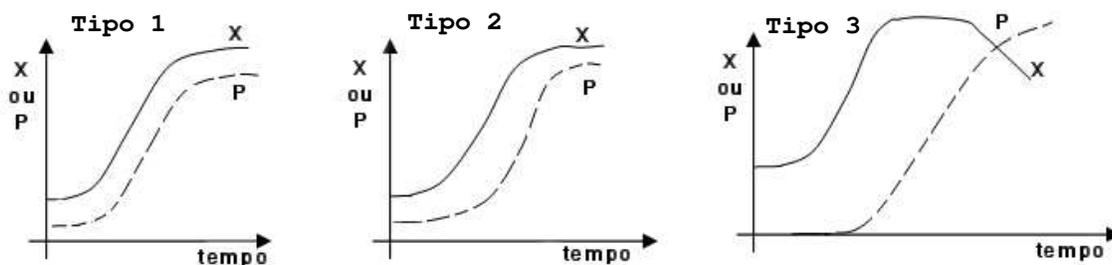


Figura 2.6: Padrões cinéticos de crescimento e formação de produtos.

Outros modelos que associam a formação de produto podem ser visto na Tabela 2.7.

Tabela 2.7: Modelos para produção de produto metabólico inibitório (Adaptado de SCHMIDELL et al., 2001)

Referência	Modelo Cinético
AIBA; SHODA	$\mu_x = \frac{\mu_m s}{K_s + s} + \frac{K_p}{K_p + P}$ $\mu_p = \frac{\mu'_m s}{K'_s + s} + \frac{K'_p}{K'_p + P}$
AIBA et al.	$\mu_x = \frac{\mu_m s}{K_s + s} e^{-K_p P}$ $\mu_p = \frac{\mu'_m s}{K'_s + s} e^{-K'_p P}$
GHOSE; TYAGI	$\mu_x = \frac{\mu_m s}{K_s + s} + \left(1 - \frac{P}{P_m}\right)$ $\mu_p = \frac{\mu'_m s}{K'_s + s} + \left(1 - \frac{P}{P'_m}\right)$
<p>Onde: μ_x = velocidade específica de crescimento. μ_p = velocidade específica de produção. S = concentração de substrato limitante. P = concentração de produto. Os demais são parâmetros cinéticos.</p>	

Alguns modelos utilizados em fermentações alcoólicas são abaixo citados:

$$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n \left(\frac{S}{K_S + S}\right) \quad \text{LEVENSPEIL (1980)}$$

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_S + S}\right) \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)^m \quad \text{LEE et al (1983)}$$

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{\left(K_S + S + \frac{S^2}{K}\right)} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n \quad \text{TOSETTO (2002)}$$

b) Efeito do pH e temperatura

A cinética de crescimento e formação de produto são influenciados pelas condições do ambiente como pH e temperatura. A temperatura é um fator crítico que afeta o desempenho das células. Como visto na Tabela 2.2 os microrganismos podem ser mesófilos, termófilos ou psicrótróficos. As velocidades de reação são dadas pela equação de Arrhenius:

$$K = A \exp\left(\frac{-E}{RT}\right)$$

O pH é outro fator que também afeta a taxa de crescimento microbiano. Contudo, as fermentações são usualmente realizadas próximo ao pH ótimo. Em alguns casos o pH ótimo de crescimento pode ser diferente do pH de formação de produto. Isto deve ser levado em consideração no momento de realizar a otimização do processo. O pH ótimo de algumas células é mostrado na Tabela 2.8. Durante a fermentação o pH pode modificar, mas isto depende da natureza do substrato principalmente das fontes de nitrogênio.

Tabela 2.8: pH ótimo de diferentes células.

Células	Faixa de pH
Bactéria	4-8
Leveduras	3-6
Fungos	3-7
Plantas	5-6
Animais	6, 5-7, 5

2.1.4. Seleção do tipo de biorreator

Uma vez completados os cálculos estequiométricos e cinéticos do processo, estará disponível ao projetista um conjunto de dados que em muitos casos estão interligados. Estes dados serão a base para a escolha do tipo de biorreator.

O início da escolha do tipo de biorreator começa com a definição do estado do biocatalizador. Por exemplo, se é bactéria, fungo, levedura, célula animal ou de insetos, se as células estão na forma livre ou imobilizada. Não só os dados estequiométricos e cinéticos são levados em consideração como também a necessidade de mistura, requerimentos de gases, remoção ou a adição de calor, etc. É este o conjunto de informações que dará a base ao projetista para decidir sobre o tipo e modo de operação do biorreator.

Os tipos básicos de biorreatores são mostrados na Figura 2.7 e Figura 2.8. Eles são comumente operados com alta concentração de células através do reciclo parcial ou total de biomassa. A biomassa reciclada por sua vez pode ser separada por centrifugação ou filtração.

ASENJO e MERCHUK, (1994) citam alguns biorreatores utilizados:

- **Biorreatores de Tanque de Mistura:** é o mais importante tipo utilizado industrialmente. Deve ser analisado o número, local e tipo de agitadores. Fácil controle e utilização para meios muito viscosos.
- **Biorreatores Pneumatamente Agitados:** Possuem melhor transferência de O_2 . Utilizados em processos de baixo desempenho.
- **Biorreatores de Membrana:** são reatores de fluxo onde as membranas são utilizadas para separar células ou enzimas do fluxo de produto. Os produtos podem ser removidos continuamente. Têm

sido utilizados em escala industrial para reações enzimáticas. Apresentam vantagens para sistemas específicos, como sistemas que apresentam duas fases.

- **Biorreatores com Microrganismos Imobilizados:** Enzimas têm sido utilizadas na forma imobilizada devido, principalmente, ao seu alto preço. Para ser imobilizada as enzimas podem ser extraídas de células (enzimas intracelulares) ou recuperadas de uma cultura celular (enzimas extracelulares). Existem vários estudos sobre imobilização que tornam possível o projeto destes biorreatores.
- **Biorreatores com Células Animais Imobilizadas:** culturas de células animais são imobilizadas em superfícies apropriadas. Utilizados para produção de vacinas tais como rubéola e proteínas recombinantes terapêuticas. Uma grande variedade de biorreatores com células animais imobilizadas tem sido desenvolvida para aplicações específicas.
- **Biorreatores com Células de Plantas:** produtos derivados de plantas são muito utilizados na indústria farmacêutica e na indústria alimentícia (ingredientes flavorizantes). Muitos componentes produzidos por plantas são complexos demais para se tentar obter através de uma síntese química. As células de plantas são utilizadas por três caminhos básicos: células em suspensão, células imobilizadas ou como culturas da planta.
- **Fotobiorreatores:** Algumas utilizações deste tipo de reatores são para o tratamento de água, remediação de terra contaminada, para a purificação de ar em recinto fechado. Neste tipo de biorreator CO_2 é consumido enquanto O_2 é produzido.

A análise das variáveis envolvidas no início do processo é importante. Pode ocorrer inibição pelo substrato

que pode ser evitada pela escolha de uma baixa alimentação ou pela manipulação do modo de operação. Uma das mais importantes razões para o uso da operação *fed-batch*, ou batelada alimentada é evitar a alta concentração de nutrientes que podem ocasionar inibição do crescimento, por exemplo. Uma alta conversão pode acarretar um meio muito viscoso gerando problemas na separação. Um exemplo é a produção de polissacarídeos como a xantana (ASENJO e MERCHUK, 1994). O peso molecular máximo e viscosidade máxima são obtidos antes da concentração máxima de produto. Neste caso o conceito ótimo de reator e design dependerá do objetivo do processo. No caso de produtos farmacêuticos a pureza do produto é de suma importância. Os estágios de separação e purificação ditam as regras que influenciam a seleção do sistema biológico e do tipo de biorreator, pois tudo deve ser projetado de modo a facilitar o processo final de purificação.

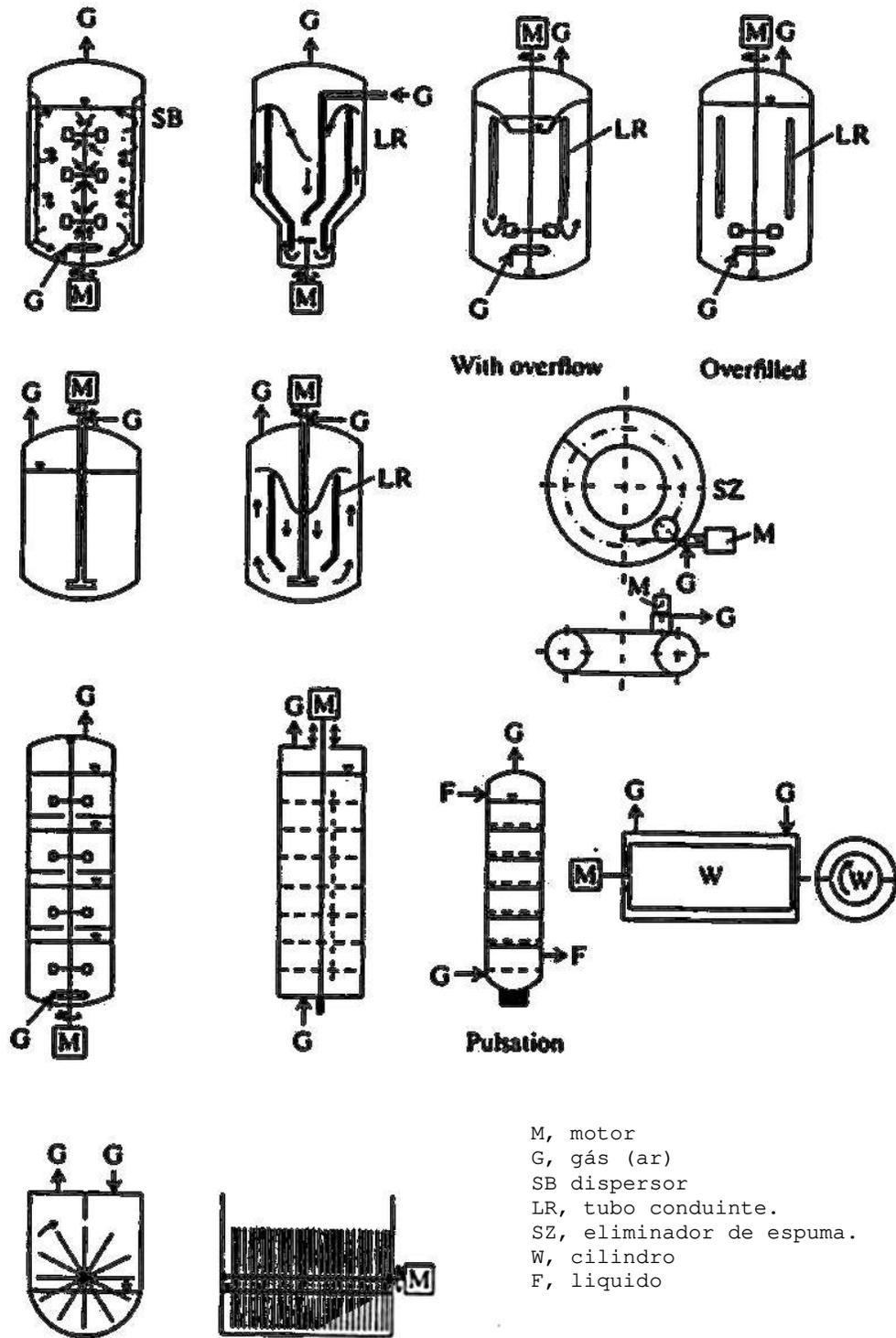


Figura 2.7: Reatores de mistura mecânica. (ASENJO e MERCHUK, 1994).

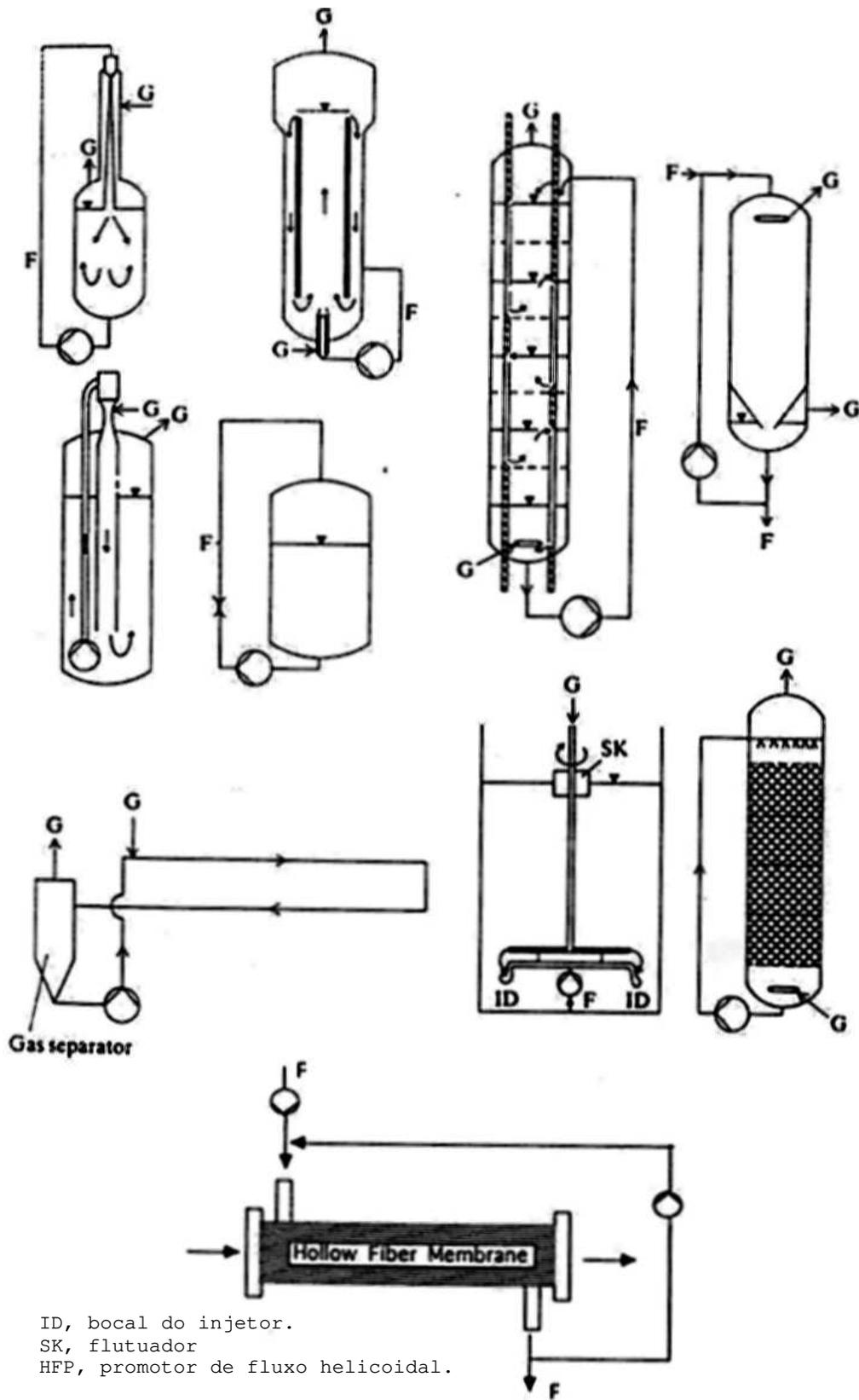


Figura 2.8: Reatores com mistura pneumática. (ASENJO e MERCHUK, 1994).

2.1.5. Projeto do Sistema

O último estágio mostrado na Figura 2.1 é o projeto do sistema que é baseado principalmente no conhecimento da cinética, das taxas de transferência de massa e energia e requerimentos e condições de mistura. Estes dados são obtidos, geralmente em escala laboratorial onde as condições de mistura e taxas de transferência de massa e calor são diferentes das de larga escala. Assim o processo de aumento de escala é uma etapa delicada e importante no projeto do sistema. Ele inclui não só o tamanho do tipo de reator selecionado como também os equipamentos requeridos pelo sistema como instrumentação e controle e suplemento de água, ar e vapor.

No aumento de escala devem-se levar em consideração também as necessidades do mercado e modo de operação. Os modos de operação utilizados em Bioprocessos são:

- Batelada ou descontínuo
- Batelada alimentada
- Batelada alimentada cíclica
- Batelada cíclica ou semicontínuo
- Contínuo

VOLESKY e VOTRUBA (1992) relatam que o projeto de biorreatores deve incluir uma análise de toda a tecnologia envolvida considerando aspectos sociais e de engenharia, e que não há um método geral para seleção do tipo de reator.

2.2. PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE ETANOL

2.2.1. Histórico

A produção de etanol (álcool etílico) via fermentativa no Brasil é feita utilizando-se, principalmente, a cana-de-açúcar que foi introduzida no Brasil no século XVII.

O PRÓALCOOL (Programa de Incentivo à Produção de Álcool) foi criado pelo governo na 1ª crise do petróleo. A

utilização do álcool como combustível agradou os usineiros, pois o preço do açúcar sofria de constantes oscilações no mercado internacional naquela época. A perspectiva da utilização do álcool como combustível deu um enorme impulso na sua produção e no aprimoramento de técnicas. Na área agrícola houve melhoramento das variedades das canas cultivadas, das técnicas de plantio e colheita. Na indústria desenvolveram-se novos processos, novos microrganismos foram testados, dentre outras melhorias, visando o aumento de rendimento e produtividade.

Segundo NASTARI (2005) o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar e álcool com 33,9% da produção mundial (2004/2005) de cana, 18,5% de açúcar e 36,4% de álcool. É também o maior exportador mundial (2004/2005) de açúcar e álcool com 37,4% do mercado livre mundial de açúcar e 50,4% de álcool. A Figura 2.9 e Figura 2.10 mostram dados da produção mundial de açúcar (em 121 países produtores) e álcool (em 57 países produtores), respectivamente.

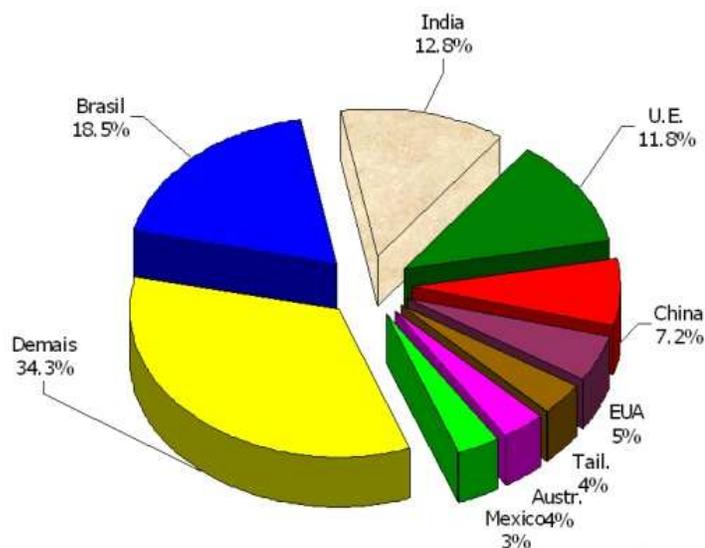


Figura 2.9: Produção mundial de açúcar em 2005. Fonte DATAGRO/ISO (citado por NASTARI, 2005).

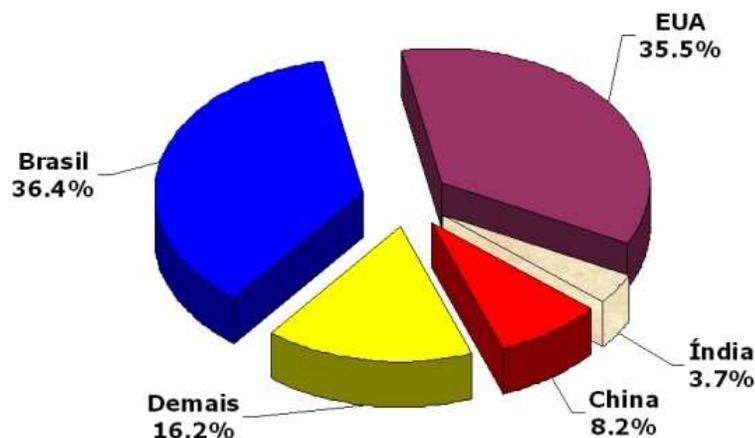


Figura 2.10: Produção mundial de álcool em 2005. Fonte DATAGRO/F.O.LICHT (citado por NASTARI, 2005).

O etanol passou a ser visto como substituto provável à gasolina em várias partes do mundo em 1999 graças à conquista da competitividade. Também é visto como um motor de desenvolvimento e redutor de pobreza para países em desenvolvimento. São esperadas reduções de custos de produção através do desenvolvimento de técnicas de aproveitamento de resíduos da cana como bagaço, pontas e palhas. Espera-se um aumento do consumo interno com o sucesso dos carros com tecnologia flexível e também um aumento nas exportações graças ao baixo custo em relação à gasolina. O desafio do setor sucroalcooleiro é investir para fazer frente à demanda interna e externa e manter as participações no mercado já conquistadas (NASTARI, 2005).

O etanol é considerado um combustível alternativo, renovável e com um futuro promissor nesta época de preocupação ecológica.

2.2.2. Produção de Etanol Via Fermentativa

A fermentação alcoólica requer uma série de reações que podem ser resumidas em:



Os microrganismos mais utilizados na produção de álcool são as leveduras, principalmente a *Saccharomyces cerevisiae* (LIMA, 1982). Elas funcionam como catalisadores biológicos.

A matéria-prima, fonte de glicose pode variar e são enquadradas em três grandes grupos:

- Açucaradas (ex.: melão, cana-de-açúcar, beterraba açucareira).
- Amiláceas e feculentas (ex.: mandioca, milho, babaçu, batata-doce).
- Celulósicas (ex.: bagaço residual, madeira e seus resíduos).

As fontes denominadas açucaradas são mais vantajosas, pois o microrganismo obtém a glicose mais facilmente. Existem microrganismos que produzem etanol diretamente das fontes amiláceas e feculentas não necessitando de prévio tratamento da matéria-prima. No Brasil, a grande extensão territorial e o cultivo histórico da cana-de-açúcar levaram à sua utilização como principal fonte de matéria-prima. Além disso, estudos comprovam que a cana-de-açúcar possui maior produtividade em álcool por área colhida por ano se comparada a outras fontes de glicose.

O processo fermentativo para produção de etanol, tendo como fonte de carbono a cana-de-açúcar, pode ser dividido em três fases:

- **Preparo da matéria-prima:** incluem moagem da cana, peneiragem, decantação (a quente) e resfriamento. Gera como resíduo o bagaço e a torta.
- **Transformação:** é o processo de fermentação no qual o açúcar é transformado em etanol pelos microrganismos.
- **Separação:** destilação com finalidade de separar o álcool do vinhoto.

A Figura 2.11 apresenta um esquema geral do processo.

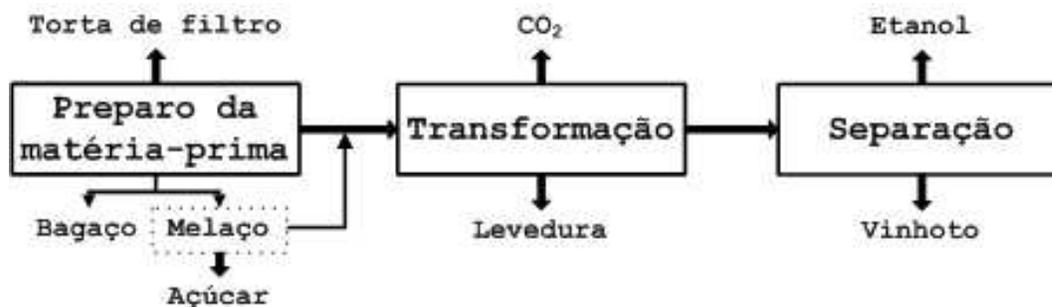


Figura 2.11: Esquema geral do processo fermentativo para obtenção de Etanol.

Os processos fermentativo em escala industrial evoluíram, e estão evoluindo, desde a década de 70. Segundo ANDRIETTA (1998), a evolução dos processos de fermentação alcoólica pode ser dividida em:

Processos de batelada alimentada: Utilizado na década de setenta com grande evolução nos anos 80, resultando em melhor desempenho e produtividade.

Processos de fermentação contínua: apresentam maior produtividade que os processos em batelada e batelada alimentada principalmente pelo fato de que não há paradas para descarga, lavagem e enchimento das dornas. O processo de fermentação contínua também se encontra em evolução:

1ª geração: evoluíram paralelamente com os processos de batelada alimentadas e não passaram de adaptações destes. Apesar do baixo custo possuíam sérios problemas de concepção. Foram responsáveis pelo atraso na implementação dos sistemas contínuos.

2ª geração: surgiram no final dos anos 80 introduzindo conceitos de engenharia aos projetos. Estes processos apresentam melhor desempenho e estabilidade oferecendo maior confiança que os anteriores. O ponto negativo é que não levam em conta fatores cinéticos importantes na otimização do processo.

3ª geração: apareceram no início dos anos 90. Levam em conta fatores cinéticos da levedura e não possuem problemas de fluxo. Levaram os processos contínuos a terem maior

produtividade, menor consumo de insumos, melhor aproveitamento da massa celular excedente para secagem, maior facilidade para automação e possibilidade de operação em regime permanente.

Existe uma tendência para uma nova geração de processos fermentativos. ANDRIETTA (1998) expõe o que poderia vir a ser uma evolução dos processos fermentativos contínuos que não necessitam da utilização de centrífugas para separação da levedura do vinho. As centrífugas são responsáveis por cerca de 25% do custo total de uma destilaria. No entanto estes processos ainda estão sendo estudados. O processo convencional de fermentação possui características inibitórias devido ao fato do etanol (produto) inibir o crescimento celular. Esta inibição afeta de forma negativa o rendimento e a produtividade do processo. Para resolver este problema trabalhos recentes estão sendo desenvolvidos para extrair o etanol durante o processo diminuindo assim sua influência inibitória (SILVA, 1998). Seguem-se outros exemplos de trabalhos avançados nesta área. FERREIRA (2003) modelou e simulou um biorreator tipo torre de leito pseudo-expandido utilizando leveduras alto-imobilizáveis para produção de etanol. VIEGAS (2003) otimizou um sistema de fermentação alcoólica contínua utilizando reatores tipo torre e leveduras com características floculantes. ATALA (2000) trabalhou com fermentação alcoólica com alta densidade celular. Modelou, convalidou parâmetros e otimizou o processo. Também ATALA em 2004 trabalhou com o desenvolvimento experimental de um processo fermentativo extrativo de produção de etanol incluindo instrumentação e controle do processo. Este mesmo processo foi também estudado por COSTA et al (2001) onde se utilizou planejamento fatorial e simulação para a otimização e determinação das estruturas de controle do processo.

No capítulo 3 será mostrada a descrição de dois processos para produção fermentativa de etanol e suas respectivas modelagens matemática.

2.3. PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas, como todos os produtos biotecnológico, não possuem um processo de purificação geral. As características do meio e das biomoléculas de interesse são muito variadas tornando a etapa de purificação tão desafiante quanto à etapa de cultivo (PESSOA Jr. e KILIKIAN, 2005).

De modo geral as etapas para purificação de proteínas podem ser divididas em (BAYLEY e OLLIS, 1986):

- Remoção de insolúveis,
- Separação primária,
- Purificação,
- Separação final do produto.

As técnicas de separação dependem das propriedades físicas do caldo fermentativo, da localização do produto, das suas propriedades físicas (como tamanho, carga e solubilidade), da concentração, forma de apresentação e valor do produto final e por fim da escala do processo (BAYLEY e OLLIS, 1986).

A Figura 2.12 mostra as etapas de um processo genérico de purificação de biomoléculas. O sobrenadante, entrada para as etapas de separação/concentração de moléculas pode ser resultante de um simples processo de clarificação, no caso de produtos extracelulares, ou, para produtos intracelulares, de várias etapas para retirada da fração sólida.

Um dos grandes desafios da indústria biotecnológica é reduzir os gastos com a purificação das biomoléculas, para que seu produto possua um preço competitivo no mercado. Em suma, deseja-se obter o máximo rendimento com a máxima

pureza minimizando os custos do processo. Um meio de conseguir isto é reduzir o número de etapas envolvidas (HARRIS e ANGAL, 1995). O custo do processo de purificação pode chegar a 80% do custo final do produto (PESSOA Jr. e KILIKIAN, 2005).

A Tabela 2.9 mostra as operações unitárias empregadas nos processos de purificação viáveis em escala industrial, a etapa à qual pertencem e o princípio de separação da biomolécula-alvo. O processo CARE, apresentado neste trabalho, pertence à etapa de purificação de alta resolução utilizando princípio similar à cromatografia de afinidade.

A cromatografia por afinidade é a segunda técnica mais comumente usada na purificação de proteínas. Nessa técnica, os compostos que possuem afinidade pelo ligante são imobilizados em matriz cromatográfica mediante ligação seletiva reversível do ligante com a molécula de interesse. Oferece uma bioafinidade que pode ser aproveitada para obtenção de biosseparações com elevado grau de seletividade. Os sistemas de bioafinidade são os mais poderosos métodos de separação disponíveis, devido ao alto grau de resolução, capacidade e seletividade que se pode obter (ZUÑIGA et al, 2003). A maior limitação da cromatografia por afinidade é a dificuldade de operação contínua (JANSON, 1984). Logo, técnicas alternativas foram propostas para suprir esta limitação.

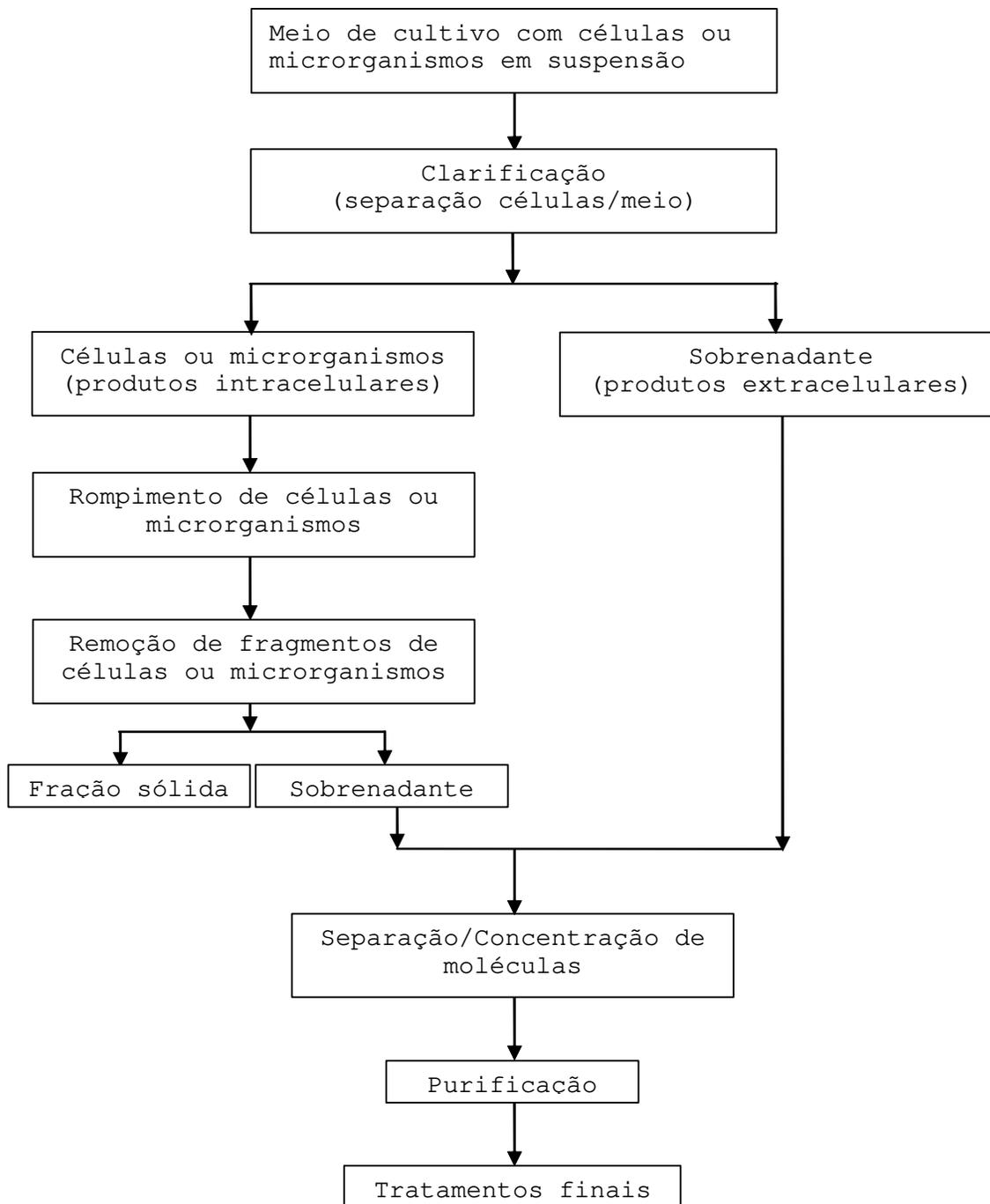


Figura 2.12: Etapas de um processo genérico de purificação de biomoléculas. (PESSOA Jr. e KILIKIAN, 2005).

Tabela 2.9: Operações unitárias do processo de purificação de produtos biotecnológicos (Adaptado de PESSOA Jr. e KILIKIAN, 2005).

Etapas do processo	Operações unitárias	Princípio
Clarificação	Filtração convencional Centrifugação Filtração tangencial (membrana) Floculação	Tamanho de partículas Tamanho e densidade de partículas Tamanho de partículas Hidrofobicidade de partículas
Rompimento de células	Homogeneização Ultra-som Moagem em moinho de bolas Rompimento químico ou enzimático	Cisalhamento Cisalhamento Cisalhamento Hidrólise, solubilização ou desidratação de moléculas que compõem a parede ou a membrana celular
Purificação de baixa resolução	Precipitação Ultrafiltração (membranas) Extração em sistemas de duas fases líquidas	Solubilidade Massa molar e raio hidrodinâmico de moléculas Solubilidade, massa molar
Purificação de alta resolução	Cromatografia de troca-iônica Cromatografia de afinidade (biológica ou química) Cromatografia de imunoafinidade Cromatografia de interação hidrofóbica Cromatografia de exclusão molecular Membranas adsortivas	Tipo e densidade de carga na superfície da biomolécula Sítios específicos da superfície de uma proteína (adsorção) Sítios específicos da superfície de uma proteína (adsorção antígeno/anticorpo) Hidrofobicidade Massa molar Massa molar e características para adsorção ou sítios específicos da superfície de uma proteína.
Tratamentos finais	Cristalização Liofilização Secagem	Solubilidade e características de equilíbrio líquido-sólido Características de equilíbrio líquido-sólido Características de equilíbrio líquido-sólido Características de equilíbrio líquido-sólido

Foram desenvolvidos métodos que não apresentam a estrutura de uma cromatografia de separação e que empregam o princípio de afinidade biológica como força motriz. Segundo LABROU e CLONIS (1994) as tecnologias não cromatográficas de separação por afinidade mais difundidas são:

- Extração contínua com reciclo, conhecida por CARE;
- Partição bifásica aquosa;
- Filtração por membrana;
- Polímeros solúveis reversíveis;
- Precipitação por afinidade.

Algumas das técnicas acima citadas têm sido alvos de estudos aprofundados, pois se mostram eficientes em casos onde existem limitações difusionais e de aumento de escala.

RIBAS (1999) simulou e analisou o desempenho de diferentes sistemas de purificação de proteína. Propôs e estudou diferentes configurações do sistema CARE (vide item 2.3) e modificações deste. Incluindo a substituição dos reatores tanque de mistura com membrana, nos estágios de lavagem e eluição por reatores de fluxo pistonado com membrana. Propôs um sistema denominado tanque móvel simulado (TMS) que é semelhante ao sistema de leito móvel simulado (LMS), mas ao invés de reatores com colunas utiliza reatores de tanque de mistura com membrana, semelhante ao utilizado no sistema CARE. Parte destes sistemas foi implementada no software Bio-PSA.

2.3.1. O Processo CARE

O processo CARE (Figura 2.13) é baseado na adsorção cromatográfica de afinidade. A cromatografia por afinidade explora os vários tipos de afinidades biológicas para a adsorção da fase sólida. O ligante é imobilizado na fase sólida enquanto o contraligante (geralmente uma proteína) é adsorvido do extrato que passa na coluna cromatográfica. (JANSON e RYDEN, 1989). O processo CARE foi desenvolvido originalmente por PUNGOR et al. (1987) visando à recuperação

e isolamento da enzima β -galactosidase produzido pela E.Coli. Utilizou-se como suporte a PABTG-agarose. Consistia de dois estágios, adsorção e dessorção operando de modo contínuo no estado estacionário com reciclo de resina. Este processo também foi estudado por outros pesquisadores como AFEYAN et al (1989) e GORDON et al (1990). DECHECHI et al. (1997) propuseram uma modificação deste processo incluindo um estágio intermediário de lavagem, melhorando assim as características relacionadas à purificação do processo.

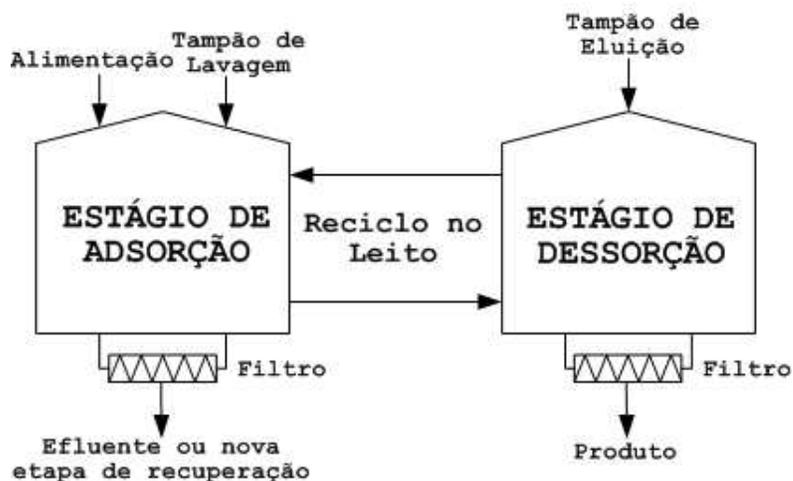


Figura 2.13: Processo CARE original.

Os métodos mais comumente usados em biosseparações comerciais, tais como precipitação, coluna cromatográfica e adsorção em batelada, são processos descontínuos. O desenvolvimento do processo CARE, ou "*Continuous Affinity Recycle Extraction*", surgiu como um processo alternativo de purificação de proteína possibilitando uma purificação contínua, devido à recirculação do adsorvente. Maiores detalhes sobre o sistema CARE nos itens 3.2 e 3.3.

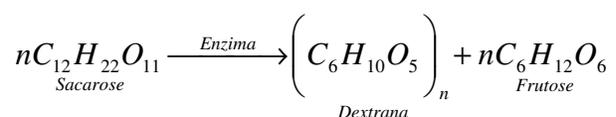
2.4. PRODUÇÃO DE DEXTRANA

2.4.1. Introdução

A dextrana ($C_6H_{10}O_5$) é um polissacarídeo constituído de monômeros de glicose ligados principalmente (95%) por

ligações $\alpha(1,6)$ (SANTOS et al., 2000). Sua origem é bacteriana possuindo uma cadeia principal linear (ASPINALL, 1983).

Foi Scheibler, em 1874, quem criou o termo dextrana ao observar um estranho espessamento em xaropes de beterraba e cana-de-açúcar (ALSOP, 1983). Porém foi Pasteur, mais de dez anos antes, quem atribuiu tal espessamento a substâncias viscosas oriundas de ação microbiológicas. Foi dado o nome de *Leuconostoc mesenteroides* à bactéria responsável pela produção deste espessamento. A grande maioria dos trabalhos que investigam a produção de dextrana utiliza *L. mesenteroides*, mais precisamente à linhagem NRRL B-512 (f) (LEE, CHOI et al., 1992). Esta linhagem de *Leuconostoc* cresce entre 5 a 30°C e tem crescimento ótimo entre 25 e 30°C (SANTOS et al., 2000). Entretanto a dextrana pode ser produzida por vários outros microrganismos. Quando o *L. mesenteroides* NRRL B-512 (f) cresce em um meio rico em sacarose a produção da enzima extracelular dextrana-sacarase é induzida. A sacarose é o único substrato conhecido capaz de promover esta indução. A dextrana-sacarase produzida utiliza então a sacarose como substrato para produzir dextrana e frutose como descrito abaixo:



Sabe-se que o tipo do microrganismo produtor e o meio de reação influenciam as características da dextrana produzida. A maioria da dextrana comercial produzida é por via enzimática, na presença ou ausência do microrganismo sintetizador da enzima, e utilizando a sacarose como substrato (SANDFORD, 1983). Assim a dextrana é uma substância que não possui características definidas.

A aplicação comercial da dextrana depende de suas características, principalmente peso molecular. As dextranas de alto peso molecular (40 a 50 milhões de Daltons) possuem

várias aplicações na recuperação secundária de petróleo, em filmes protetores para sementes (ALSOP, 1983, citado por HERNALSTEENS, 2002), como componente de lama de perfuração, dentre outras. Já as dextranas de médio peso molecular têm potencial de utilização na indústria química e alimentícia. Como exemplos de aplicações podem-se citar: agente gelificantes em geléias e chicletes, como espessantes em pudins e xaropes, como inibidores de cristalização em sorvetes e em preenchimento de colunas cromatográficas (FLORIDO, 2001). Dextranas com baixo peso molecular são utilizadas na indústria farmacêutica como, por exemplo, reguladora de fluxo de sangue. HERNALSTEENS (2002) cita a existência de um tipo de dextrana clínica, com peso molecular de 75.000 ± 25.000 Daltons (D75), que é comercializada em solução salina a 6% p/v e apresenta propriedades osmóticas e coloidais semelhantes às do plasma. Entretanto, muitas das aplicações da dextrana ainda são apenas objetos de estudo devido ao elevado custo de fabricação desta e à existência de substitutos mais baratos (FLORIDO, 2001).

São dois os processos de produção de dextrana: o convencional e o enzimático. Em ambos os processos são produzidas dextranas de alto peso molecular. Logo há necessidade de etapas posteriores para redução de peso molecular, fracionamento e purificação, dependendo da aplicação da dextrana.

Processo convencional: caracterizado pela produção de dextrana durante o crescimento do microrganismo. Neste processo somente é feito o controle da temperatura e a dextrana é obtida do caldo de fermentação.

Processo enzimático: é dividido em duas fases. Na primeira se produz a enzima dextrana-sacarase através de um processo fermentativo utilizando-se uma bactéria como a *L. mesenteroides*. Na segunda fase se produz a dextrana através da utilização da enzima dextrana-sacarase na forma

purificada ou bruta. Esta via de produção apresenta a vantagem de proporcionar maior rigor no controle da fermentação, tornando-se mais rentável e racional que o método convencional, mesmo porque as condições ótimas de produção de enzima não são as mesmas da dextrana (LEE et al., 1992, citado por FLORIDO, 2001).

SOUZA (1993) adaptou o CARE original ao processo de obtenção de dextrana, introduzindo a reação enzimática no estágio de dessorção. No laboratório de Bioprocessos da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) vários trabalhos envolvendo a produção de dextrana foram desenvolvidos como, BURKERT (2003), HERNALSTEENS (2002), MIBIELLI (2001), SANTOS (2000), CURRALERO (2000 e 1998) e SOUZA (1993).

MICHELENA et al. (2003) realizaram o escalonamento do processo de produção da enzima dextrana-sacarase por *Leuconostoc mesenteroides* utilizando critérios da transferência de O₂. Foi determinada, para um volume de reator de 5L, que a melhor agitação foi de 225 min⁻¹ e a taxa de aeração de 0,15 vvm obtendo uma atividade enzimática de 127 DSU/ml. Sendo que uma DSU foi definida como a quantidade de enzima que converte um miligrama de sucrose em dextrana em uma hora a pH 5,2 e 30°C em 10% de solução de sucrose.

CURRALERO (2000) realizou um estudo aprofundado do sistema proposto por SOUZA (1993) obtendo parâmetros cinéticos e modelo determinístico e aplicou técnicas para otimização do sistema. Além disto, testou o processo em escala laboratorial.

O modelo determinístico apresentado neste trabalho foi desenvolvido por FLORIDO (2000), que por sua vez baseou-se, principalmente, no trabalho desenvolvido por SOUZA (1993). FLORIDO (2000) modelou e desenvolveu uma estratégia de controle para a síntese de dextrana em reator contínuo com reciclo da enzima, também conhecido como CARE.

2.5. INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL

É difícil de definir Inteligência Artificial (IA) de modo exato e absoluto. Todas as técnicas e programas que são utilizadas para fazer computadores resolverem problemas que são normalmente resolvidos por seres humanos podem ser classificados como IA.

Segundo FEIGENBAUM (1981) "IA é parte da ciência da computação relacionada ao projeto de sistemas computacionais inteligentes, isto é, que exibem características que nós associamos com inteligência no comportamento humano".

O objetivo mais amplo da IA é a construção de sistemas cooperativos que assistam de perto os humanos em seus trabalhos ou sistemas autônomos que possam operar sem intervenção humana.

A IA utiliza técnicas que constroem programas em que cada parte atua de forma independente objetivando a solução de um problema ou conjunto deste. Com a programação comum pode se fazer tudo o que um programa de inteligência artificial faz. A grande diferença entre eles é que no programa com inteligência artificial cada parte pode ser modificada sem afetar a estrutura inteira do programa. Segundo LEVINE et al. (1988) esta flexibilidade permite maior eficiência e compreensibilidade na programação, ou seja, "inteligência".

A IA tem três áreas de observação (MAÑAS, 1999):

- **Linguagem natural:** relacionada com o desenvolvimento de programas de computadores, que possibilitam a sua leitura, fala e entendimento da conversação natural das pessoas;
- **Robótica:** relacionada com o problema de desenvolver programas visuais e tateáveis que permitam aos robôs mover-se em volta de um ambiente e manipular objetos.

- **Engenharia do Conhecimento:** relacionada com o desenvolvimento de programas que usam conhecimento simbólico para simular o comportamento dos humanos especialistas.

A seguir são citadas as áreas onde se concentram o maior número de pesquisas em IA:

- Processamento Natural da Linguagem
- Sistemas Especialistas
- Jogos
- Redes Neurais Artificiais
- Lógica Fuzzy

Processos biotecnológicos são, por natureza, variáveis com o tempo e não lineares. Segundo KARIM et al. (1997), a natureza tempo-variante se deve ao fato de que os microrganismos sofrem, ao longo do tempo, mudanças de natureza fisiológica e morfológica e mutações. Já a não linearidade apresentada pelos processos é fruto de vários fatores, dentre eles: cinética celular de crescimento e formação de produtos (inibição das reações pelo aumento da concentração do produto formado), limitações termodinâmicas do processo, efeitos de transferência de massa e calor, agitação do fluido no reator, interação entre os fenômenos, dentre outros. Em Bioprocessos mais conhecidos e entendidos, melhorias na supervisão e controle podem reduzir consideravelmente a variabilidade do processo aumentando conseqüentemente o rendimento. Metodologias de Inteligência Artificial e outras técnicas de modelagem e controle estão permitindo o desenvolvimento de Sistemas Supervisórios Inteligentes (SSI). IGNOVA et al. (1996) mostram o desenvolvimento de um SSI na fermentação industrial de penicilina.

No próximo tópico serão tratados com maiores detalhes as Redes Neurais Artificiais e os Sistemas Especialistas, que representam a área de interesse deste trabalho.

2.6. REDES NEURAIS ARTIFICIAIS

2.6.1. Introdução

Redes Neurais Artificiais (*Artificial Neural Networks*) são técnicas computacionais que apresentam um modelo matemático inspirado na estrutura neural de organismos inteligentes que adquirem conhecimento através da experiência.

Uma Rede Neural Artificial é composta de várias unidades de processamento simples que normalmente não fazem mais nada além de somar entradas de forma ponderada (CHITRA et al., 1995). Ao invés de executar uma série de instruções, uma rede neural responde em relação às entradas que lhe são fornecidas. O resultado final consiste em um estado geral da rede obtido depois que ela atinge a condição de estado estacionário, o qual correlaciona padrões entre os dados de entrada e as saídas correspondentes ou os valores de saída desejados. Cada unidade (neurônio) trabalha com dados provindos de suas conexões.

Em 1943, Warren McCullock e Walter Pitts explicaram o funcionamento de um neurônio artificial, mais tarde denominado neurônio de McCullock-Pitts (Figura 2.14). Este neurônio mostra, de forma simplificada, uma noção do funcionamento de R.N.As .

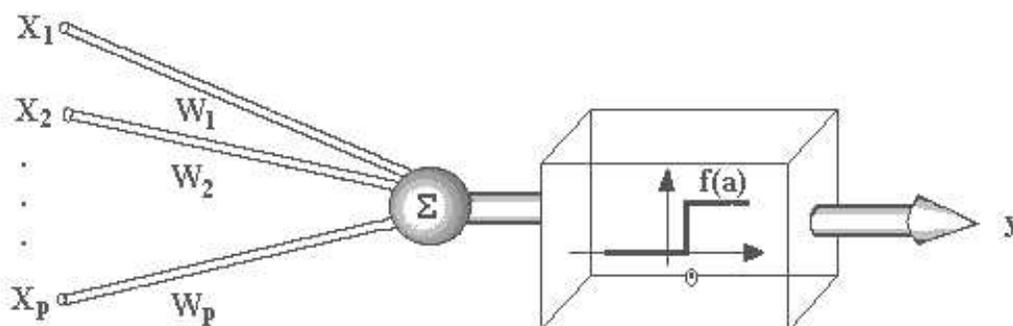


Figura 2.14 :Esquema de unidade McCullock - Pitts (MENDES, 1997).

Primeiramente os dados são apresentados à entrada (X_1, X_2, \dots, X_p). Cada sinal é, então, multiplicado por um número, ou peso (W_1, W_2, \dots, W_p), que indica sua influência na saída da unidade. A soma ponderada dos sinais é feita produzindo um nível de atividade. Ou seja:

$$a = W_1 * X_1 + W_2 * X_2 + \dots + W_p * X_p \quad \text{Equação 2.4}$$

onde a é a atividade.

Caso este nível de atividade exceda um determinado limite ("threshold"), a unidade de processamento (neurônio) produz certa resposta de saída.

MacCulloch e Pitts trabalharam com sinais que assumem valores booleanos (0 ou 1) e θ como um limitador, assim a saída pode ser dada por:

$$\begin{cases} y = 1, & \text{se } a \geq \theta \text{ ou} \\ y = 0, & \text{se } a < \theta \end{cases}$$

Esta é uma explicação simplificada. A Figura 2.15 mostra um neurônio de forma mais detalhada, onde S é a soma, A a ativação e T a transferência.



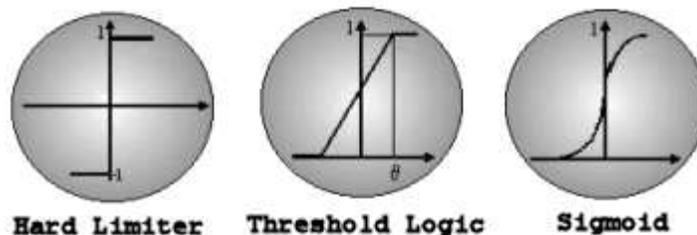
Figura 2.15: Neurônio artificial (NOVA, 1992).

A função Soma (S) estabelece a forma de como combinar os valores de entrada de um neurônio B (Ex: Equação 2.4) com os pesos das conexões deste neurônio em um instante t gerando um valor, por exemplo, $S_B(t)$.

Função de Ativação

A função de Ativação estabelece como o valor $S_B(t)$ é combinado com o estado atual de ativação deste neurônio

$a_B(t)$ para produzir um novo estado de ativação $a_B(t+1)$. As principais funções de ativação são:



A função sigmoide é a mais utilizada, sua expressão é:

$$f(a) = \frac{1}{(1 + e^{-a})} \quad \text{Equação 2.5}$$

O valor de saída do neurônio é obtido através da função Transferência $T(a_B(t))$. A função de transferência mais utilizada é a função identidade, ou seja, o valor de saída do neurônio é igual ao valor de sua ativação.

As R.N.As não se resumem a entrada e saída de dados, é preciso treinar a rede de modo que os pesos sejam ajustados. Uma rede neural é especificada, principalmente, pela sua topologia, pelas características dos nós e pelas regras de treinamento. A seguir, serão apresentados maiores detalhes.

2.6.2. Arquitetura

A escolha da arquitetura da rede leva em conta o número de camadas, o número de neurônios, etc. A Figura 2.16 mostra um tipo de arquitetura.

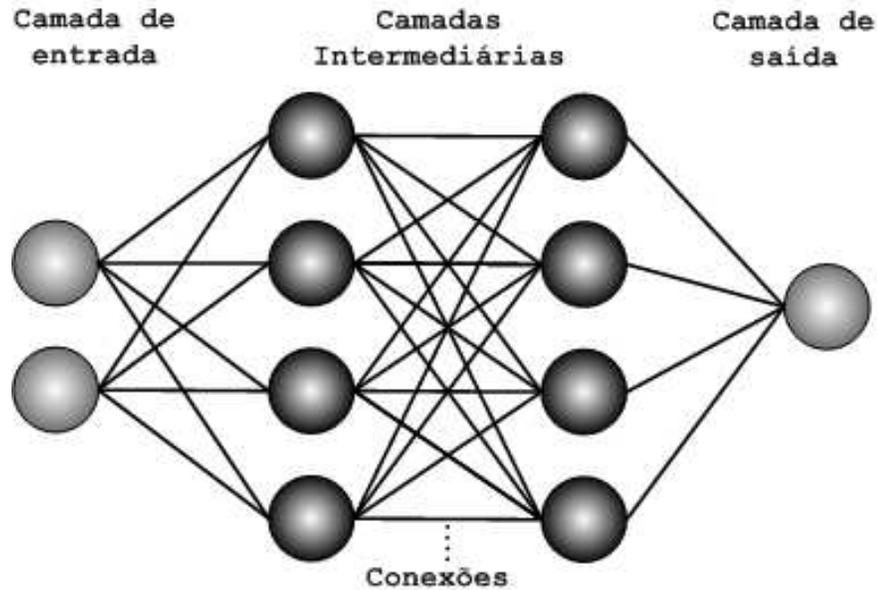


Figura 2.16: Organização em camadas (MENDES, 1997).

As camadas são classificadas em três tipos:

- **Camada de Entrada:** onde os padrões são apresentados à rede ("Input");
- **Camadas Intermediárias ou Escondidas:** onde é feita a maior parte do processamento, através das conexões ponderadas. Podem ser consideradas como extratoras de características ("Hidden");
- **Camada de Saída:** onde o resultado final é concluído e apresentado ("Output").

Os pesos estão associados às conexões. Um peso positivo pode representar uma entrada excitatória, enquanto que um peso negativo representa uma entrada inibitória.

2.6.3. Topologia

A topologia se refere a como os neurônios são interligados. Os modos principais são:

- **Redes "FEED-FORWARD":** os dados fluem da entrada ("input") para a saída. Não existem conexões na direção contrária.

- **Redes RECORRENTES** ("FEEDBACK"): existe um fluxo contrário entrada/saída de dados. Ao contrário da "Feedforward", as propriedades dinâmicas da rede são importantes.

2.6.4. Treinamento

A rede "aprende" alterando os pesos associados às entradas de cada neurônio. A regra de aprendizagem descreve exatamente como os pesos devem ser alterados e é determinada pelo modelo da rede escolhido. O aprendizado ocorre quando a rede neural atinge uma solução generalizada para uma classe de problemas.

O aprendizado pode ser:

- **Supervisionado**: é apresentado à rede par padrão (entrada/saída) de dados que funcionam como professores da rede.
- **Não-supervisionado** (auto-organização): um conceito é incorporado à rede sem o conhecimento prévio da saída.

Dentre as regras de aprendizagem mais comuns podemos citar a Regra Delta, a regra Delta generalizada e a Regra Hebbiana. A regra delta simples funciona em redes de uma camada sendo seu entendimento um passo para se aplicar a regra delta generalizada, que é utilizada em redes multicamadas. A seguir uma explicação sobre a regra delta.

Ao se apresentar um padrão de entrada à rede com os pesos inicializados aleatoriamente ela produzirá uma saída (saída obtida). A regra delta prevê a modificação dos pesos da seguinte maneira:

$$W_{novo} = W_{anterior} + \beta * (d - O) * X \quad \text{Equação 2.6}$$

onde: d = resposta desejada (saída)

O = resposta Obtida (saída)

β = taxa de aprendizado. Constante positiva que influi na velocidade de aprendizado.

X = valor de entrada.

Modo de correção dos pesos na aprendizagem:

Denomina-se ciclo uma apresentação de todos os N pares (entrada/saída) do conjunto de treinamento no processo de aprendizagem. A correção dos pesos num ciclo pode ser executada de dois modos:

- **Modo Padrão:** A correção dos pesos acontece a cada apresentação à rede de um exemplo do conjunto de treinamento. Cada correção de pesos baseia-se somente no erro do exemplo apresentado naquela iteração. Assim, em cada ciclo ocorrem N correções.
- **Modo Batch:** Apenas uma correção é feita por ciclo. Todos os exemplos do conjunto de treinamento são apresentados à rede, seu erro médio é calculado e a partir deste erro fazem-se as correções dos pesos.

2.6.5. Redes Multicamadas

A Figura 2.16 mostra uma rede multicamada. Todas as redes utilizadas atualmente são multicamadas, variando apenas a forma das ligações (conexões), o número de camadas e a quantidade de neurônios existentes em cada uma.

Cada camada da rede tem uma função específica: a camada de saída recebe os estímulos da camada intermediária e constrói a resposta. As camadas intermediárias são extratoras de características, cujos pesos são uma codificação das características apresentadas nos padrões de entrada permitindo que a rede crie uma representação mais rica e complexa do problema.

O algoritmo mais utilizado para treinamento de redes multicamadas é o de retropropagação ou "*backpropagation*". O modelo de rede mais utilizado é o das redes "*Perceptron Multi-camadas*" (MLP) treinadas com o algoritmo de "*backpropagation*".

2.6.6. Backpropagation

O algoritmo de "backpropagation" utiliza uma modificação da regra delta: a regra delta generalizada. O algoritmo funciona da seguinte maneira:

1. Inicialização de todos os parâmetros (pesos, taxa de aprendizados, etc.);
2. Apresentação de um padrão à camada de entrada;
3. Cálculo da atividade em cada neurônio (a rede flui até a saída);
4. Obtenção de uma resposta na saída;
5. Comparação do valor obtido na saída com a resposta padrão calculando o erro;
6. Atualização de todos os pesos de forma a minimizar o erro (retropropagação do erro);

Novos padrões são apresentados à rede até se conseguir um erro mínimo sem perda da sua capacidade de generalização. A Figura 2.17 mostra o esquema do algoritmo de "backpropagation".

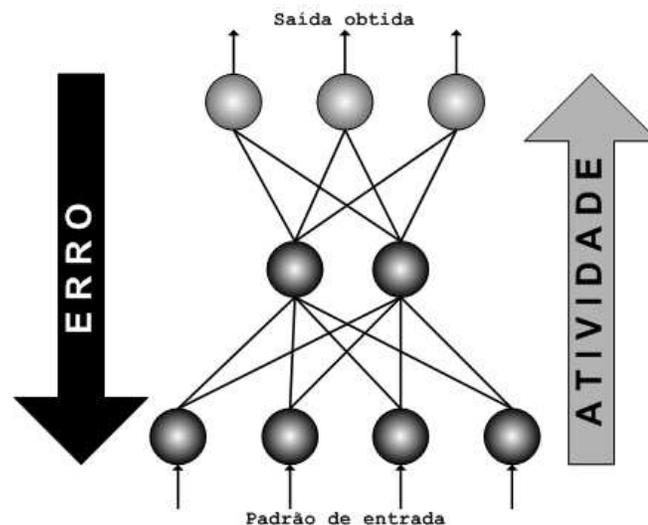


Figura 2.17: Esquema de treinamento com o algoritmo de "backpropagation".

Após a rede estar devidamente treinada, ou seja, com um erro mínimo e uma capacidade de generalização máxima, ela

pode ser utilizada como na Figura 2.18. A rede é então integrada a um sistema do ambiente operacional da aplicação.

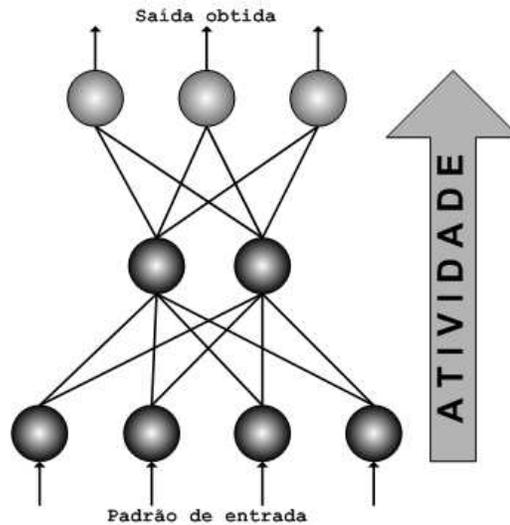


Figura 2.18: Utilização da MLP

2.6.7. Passos para o Desenvolvimento de uma R.N.A

1º Passo: Coleta dos dados

Os dados colhidos devem ser significativos e cobrir o problema amplamente. Deve-se lembrar que a rede aprende com estes dados e se caso eles forem restritos às operações normais a rede não conseguirá trabalhar eficientemente em situações fora de controle.

2º Passo: Divisão dos dados

Os dados devem ser divididos em duas categorias: um conjunto será usado no treinamento e o outro para verificar se a rede está bem treinada. Este último conjunto é chamado de dados de teste ou validação. Um subconjunto de dados extraído dos dados de treinamento pode ser utilizado para verificar a capacidade de generalização durante o treinamento (MENDES, 1997).

Todos os dados devem ser colocados em ordem aleatória para evitar tendências. Podem também, dependendo do caso, sofrer normalizações, escalonamento e conversão de formato.

Estes tratamentos podem tornar os dados mais apropriados para se trabalhar.

3º Passo: Definir a configuração da rede

Este passo inclui a seleção do paradigma neural, a determinação da topologia da rede e determinação dos parâmetros do algoritmo de treinamento e funções de ativação.

4º Passo: Treinamento

É a fase em que os pesos são ajustados. Deve-se definir os valores iniciais de cada peso (geralmente aleatório). O modo de treinamento utilizado normalmente é o padrão, pois armazena quantidade de dados e é menos susceptível a problemas de mínimos locais. Porém, o modo "batch" torna o treinamento mais estável. O tempo de treinamento depende de vários fatores e um critério de parada pode ser utilizado. Um critério bastante utilizado é o número máximo de ciclos, no entanto, deve-se levar em consideração a taxa de erro média e a capacidade de generalização. O ponto ótimo de parada deve ser aquele em que a rede tem um erro mínimo e uma capacidade de generalização máxima.

5º Passo: Teste da rede

Nesta fase são utilizados dados que não foram usados no treinamento da rede. A análise destes dados permite a avaliação do desempenho da rede. Pode-se verificar se há neurônios com peso pequeno que podem ser descartados ou com pesos significativos que podem estar associados a um "over-training" da rede. O "over-training" faz com que a rede se especialize demais nos dados de treinamento perdendo a sua capacidade de generalização.

6º Passo: Integração da rede

Após o treino e validação a rede pode, então, ser acoplada ao ambiente operacional da aplicação para o qual

ela foi criada. O sistema deve periodicamente monitorar o desempenho da rede fazendo sua manutenção e indicando se há necessidade de retreinamento.

2.6.8. Erros

Para cada configuração de rede é calculado o Erro Relativo Médio (E_{Rel}) comparando-se o resultado da R.N.A e o modelo. O treinamento é feito de modo a se minimizar o Erro Quadrático Global (E_{QG}). O erro E_{Rel} é utilizado para se verificar a melhor configuração de rede.

$$E_{rel} = \frac{\sum |VS_{rede} - VS_{modelo}|}{N} \quad \text{Equação 2.7}$$

$$E_{QG} = \frac{1}{2} \cdot \sum_m [(o_m - d_m)^2] \quad \text{Equação 2.8}$$

onde VS_{rede} e VS_{modelo} são os valores da variável de saída VS provindos da rede e do modelo, respectivamente, ao se utilizar o conjunto de pesos ajustados. N é o número de pares utilizados na representação. O_m e d_m são os valores obtidos pela rede e o desejado (modelo) durante o processo de treinamento. A variável m representa o número de variáveis de saída da rede.

2.6.9. Considerações

As redes neurais são vistas como "caixas pretas", não se sabendo como a rede chega ao resultado final. Não há justificativas para respostas dos modelos.

O treinamento de redes neurais que utilizam "backpropagation" tende a ser muito lento. A arquitetura ideal da rede é difícil de definir. Ela deve ser grande o suficiente para conseguir obter as representações necessárias, ao mesmo tempo pequenas o suficiente para se ter um treinamento mais rápido.

A taxa de aprendizado β da rede varia de 0 a 1. Quanto maior o valor de β mais rápido será o treinamento. No

entanto, valores altos podem levar à oscilação do modelo. Sendo assim, é preciso ter uma taxa alta o suficiente para agilizar o treinamento, mas que não leve à oscilação.

Uma maneira de aumentar a taxa de aprendizado sem levar à oscilação é modificar a regra delta generalizada para incluir o termo momento (α). O termo momento leva em consideração o efeito de mudanças anteriores de pesos na direção do movimento atual no espaço de pesos. Adicionando o termo de momento à equação de correção dos pesos pode-se melhorar o tempo de treinamento do algoritmo de "backpropagation" e a estabilidade do processo. Torna-se útil em superfícies de erro que contenham quedas significativas, com curvas acentuadas ou vales com descidas suaves, pois a rede consegue atingir o fundo dos vales (mínimos locais) na superfície de erro (exemplo na Figura 2.19).

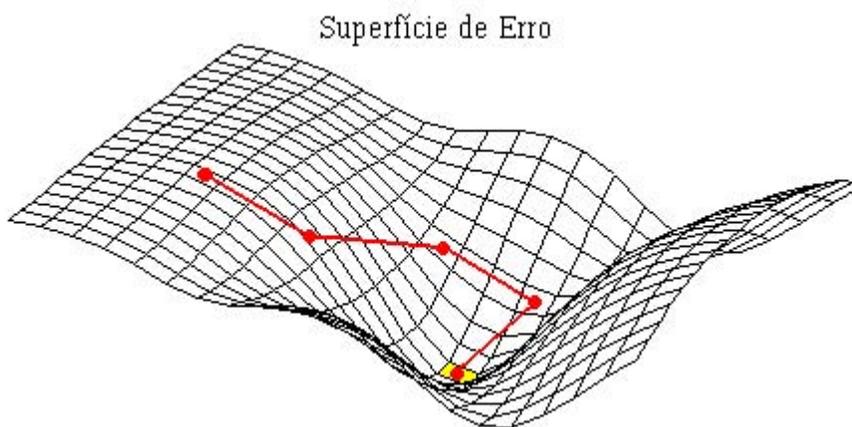


Figura 2.19: Superfície de erro.

Um fenômeno chamado "paralisia da rede" ocorre quando o processo de treinamento fica extremamente lento. Este efeito é consequência do ajuste dos pesos em valores muito altos o que força os neurônios a trabalharem com altos valores de saída em uma região onde a derivada da função de ativação é pequena. Para contornar esta situação deve-se, geralmente, reduzir a taxa de aprendizado.

2.6.10. Modelagem Híbrida

O desenvolvimento de modelos puramente mecanísticos ou determinísticos (Figura 2.20a) suficientemente detalhados para descrever com sucesso os principais fenômenos que ocorrem no processo é uma atividade cara e muitas vezes demorada. Nestes modelos todas as equações de balanço, taxas cinéticas e parâmetros necessários estão descritos por relações matemáticas bem definidas. A grande vantagem destes modelos é o conhecimento detalhado do processo que eles fornecem.

Por outro lado, o uso de modelos totalmente caixa preta, como é o caso R.N.As, pode levar a um uso inadequado das informações disponíveis (ZORZETTO et al., 2000). A utilização destes modelos (Figura 2.20b) torna o processo desconhecido, pois não se sabe as leis e relações que o regem. Sabe-se apenas a reação do processo depois de determinada perturbação. Não há justificativa, em princípio, do ponto de vista matemático para as respostas do modelo.

Os modelos híbridos, também chamados de modelos "caixa cinza" combinam equações determinísticas com técnicas de modelos "caixa preta" (que, em princípio, serão reservadas para as partes não muito esclarecidas do sistema), de forma a obter um uso eficiente das informações disponíveis. A razão para isto é que existem aspectos do processo que podem ser acuradamente descritos por equações relativamente simples, como os balanços de massa e energia.

Podem-se gerar os modelos híbridos utilizando diferentes níveis de informação conforme mostrado em Figura 2.20c e Figura 2.20d. Normalmente, as análises têm mostrado que os modelos de R.N.As puros apresentam um bom desempenho na faixa das condições de operação do processo, que foram utilizadas no seu treinamento. No entanto, a inclusão do conhecimento mecanístico, através das equações

determinísticas, aumenta as capacidades de extrapolação e interpolação do modelo.

O modelo híbrido deve ser desenvolvido depois de definida a estrutura ótima da rede e seu treinamento. A rede treinada e validada é acoplada ao modelo determinístico. Um esquema geral da construção de um modelo híbrido é mostrado na Figura 2.21.

Exemplos de aplicações de modelagem híbrida em processos biotecnológicos podem ser encontrados em GOUVÊIA (2000), GOUVÊIA e MACIEL FILHO (2003a), HARADA et al. (2002) e DE ASSIS e MACIEL FILHO (2000).

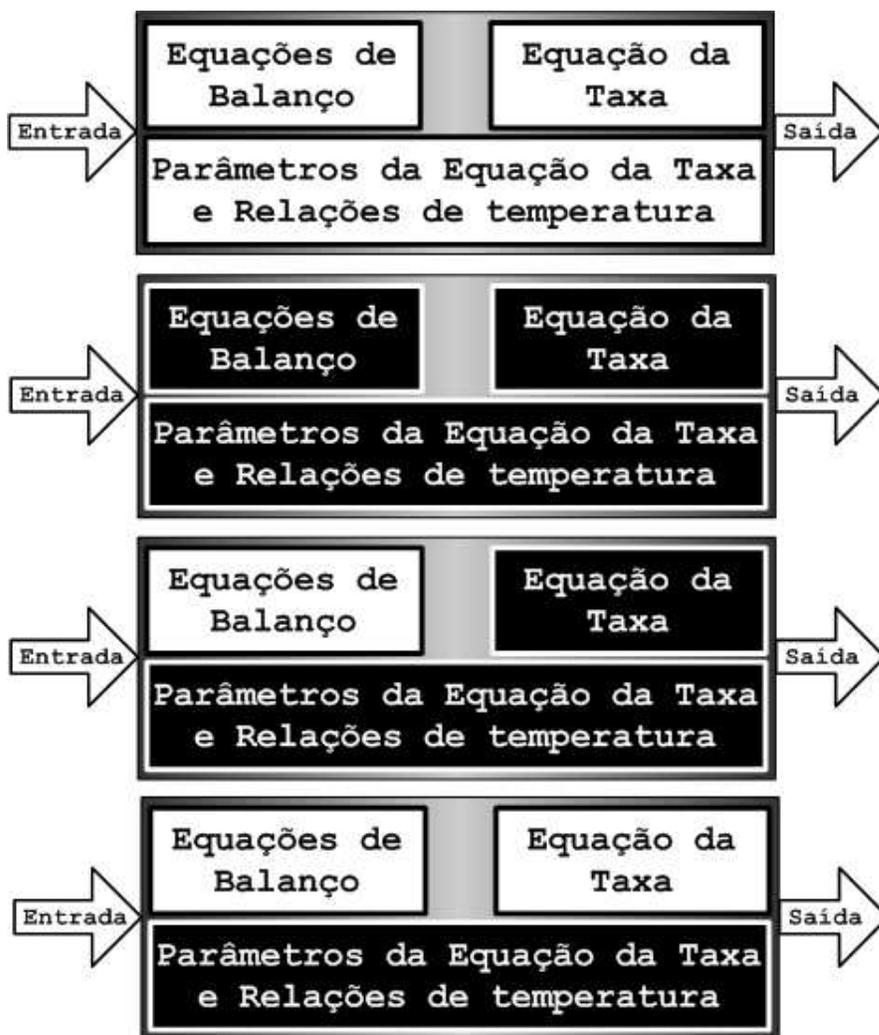


Figura 2.20: Tipo de Modelos: (a) Modelo determinístico, (b) Modelo "Caixa Preta" (ex.: Redes Neurais Artificiais), (c) e (d) Modelos Híbridos "Caixa Cinza".



Figura 2.21: Esquema geral da construção de um modelo híbrido.

2.7. SISTEMAS ESPECIALISTAS

O S.E é um tipo de tecnologia de software que trabalha com engenharia do conhecimento. A palavra sistema é definida como "conjunto de elementos, entre os quais se possam encontrar ou definir alguma relação" e especialista é "pessoa que se consagra com interesse e cuidado a certos estudos, conhecedor, perito" (FERREIRA, 1986). Assim, S.Es são sistemas que solucionam problemas que são solucionáveis apenas por pessoas especialistas na resolução deste tipo de problema (FEIGENBAUM, 1981).

Algumas diferenças entre os sistemas especialistas e os programas convencionais (MAÑAS, 1999):

- Os sistemas especialistas usam e representam conhecimentos, enquanto os programas convencionais usam e representam dados.
- Os sistemas especialistas utilizam a heurística, enquanto os programas convencionais usam algoritmos.
- Os sistemas especialistas utilizam um processo inferencial enquanto os programas convencionais utilizam processos repetitivos.
- Os sistemas especialistas são orientados rumo ao processamento simbólico, enquanto os programas convencionais são orientados para o processamento numérico. Processamento simbólico quer dizer que lá se manipulam símbolos que representam objetos e relações. Para resolver um problema, o sistema especialista manipula esses símbolos mais do que executar pura e simplesmente cálculos matemáticos.

- Os sistemas especialistas podem facilmente explicar as suas razões durante a sua execução, enquanto para pequenos programas convencionais isto é uma tarefa impossível. Nos sistemas especialistas, o usuário pode perguntar em qualquer momento, por que o S.E faz determinada pergunta ou como chegou a uma determinada conclusão em particular.
- A execução dos sistemas especialistas é altamente interativa, enquanto nos programas convencionais é ou seqüencial ou em "batch".
- Os sistemas especialistas podem ser mantidos por pessoas especialistas (também chamados engenheiros do conhecimento), enquanto os programas convencionais são mantidos pelos programadores.

2.7.1. Componentes de um S.E

Um S.E é composto de:

- **Base de Conhecimento:** armazena o conhecimento específico para determinada aplicação que pode ser diretamente fornecido por um especialista ou acumulado pelo sistema em experimentos. Contém o domínio do conhecimento na forma de fatos e regras ou outra forma de conhecimentos heurísticos.
- **Mecanismo de Inferência:** atua como uma estrutura de controle utilizando a base de conhecimento na procura de uma solução para o problema.
- **Interface com Usuário:** tem a função de facilitar a comunicação homem-máquina, estimulando, orientando e extraíndo respostas do usuário para fornecer a solução.

Segundo LINKO (1998) "o conhecimento implica em entendimento. O processo de construção de um S.E é freqüentemente chamado de engenharia de conhecimento. A engenharia de conhecimento envolve a aquisição, representação, implementação e processamento para a solução

prática e específica de problemas. A representação do conhecimento é a chave para o sucesso de um S.E. O desenvolvedor do sistema incorpora dados e conhecimentos apropriados no sistema. Durante o uso contínuo do S.E, ele poderá ser atualizado modificando-se ou adicionando-se dados e conhecimento.”

A seguir é mostrada uma classificação, baseada na função a ser exercida pelo sistema, para diversos tipos de S.Es existentes:

- **Interpretação:** São sistemas que inferem descrições de situações a partir da observação de fatos fazendo uma análise de dados e procurando determinar as relações e seus significados.
- **Diagnósticos:** São sistemas que detectam falhas oriundas da interpretação de dados.
- **Monitoramento:** Interpreta as observações de sinais sobre o comportamento monitorado.
- **Predição:** A partir de uma modelagem de dados do passado e do presente, este sistema permite uma determinada previsão do futuro.
- **Planejamento:** O sistema prepara um programa de iniciativas a serem tomadas para se atingir um determinado objetivo.
- **Projeto:** É um sistema capaz de justificar a alternativa tomada para o projeto final, e de fazer uso dessa justificativa para alternativas futuras.
- **Depuração:** Trata-se de sistemas que possuem mecanismos para fornecerem soluções para o mau funcionamento provocado por distorções de dados.
- **Reparo:** Este sistema desenvolve e executa planos para administrar os reparos verificados na etapa de diagnóstico.
- **Instrução:** O sistema de instrução tem um mecanismo para verificar e corrigir o comportamento do aprendizado de estudantes.

- **Controle:** É um sistema que governa o comportamento geral de outros sistemas (não apenas de computação). É o mais completo, de um modo geral, pois deve interpretar os fatos de uma situação atual, verificando os dados passados e fazendo uma predição do futuro.

Na Tabela 2.10 são descritas algumas "palavras-chave" utilizadas quando se fala de S.E.

Os S.E podem ser utilizados em várias áreas do conhecimento e também em processos biotecnológicos. LIENQUEO et al (1997) construíram um S.E híbrido que combina as regras do S.E com correlações matemáticas para a manipulação de uma base de dados para a seleção de uma seqüência de operações de um processo de separação de proteínas. O trabalho descreve como dados físico-químicos foram utilizados para selecionar uma seqüência de operações com um número mínimo de passos para se chegar a um nível de pureza especificado. Este trabalho é fruto de trabalhos anteriores podendo citar ASENJO (1989) e ASENJO e MAUGERI (1992). Em 2000 LIENQUEO e ASENJO publicaram um artigo com uma nova versão deste S.E híbrido. Eles utilizaram o Shell Nexpert Object™ da Neuron Data.

GUERREIRO et al (1997) desenvolveram um S.E para o projeto de uma unidade de fermentação contínua para produção de álcool. O S.E é híbrido envolvendo também simulações computacionais. O processo é similar ao encontrado no item 3.1.1. e foi utilizado um Shell trabalhando com interfaces do DOS. Como exemplo de aplicação de S.E em controle de processos biotecnológicos pode-se citar o trabalho de CIMANDER et al (2003). Eles utilizaram um S.E no desenvolvimento e projeto de um sistema computacional integrado para monitoramento e controle de biorreatores laboratoriais equipados com uma variedade de analisadores gerando mais de 1800 diferentes sinais do Bioprocesso.

Continuando a explicação sobre S.E segue no próximo tópico uma descrição de como funciona um S.E. No capítulo 7 se encontram maiores explicações sobre o assunto.

Tabela 2.10: Um glossário resumido sobre Sistema Especialista (LINKO, 1998)

Inteligência Artificial	Uma área da ciência da computação que propõe a possibilidade de um computador se comportar inteligentemente como um especialista humano faz.
<i>Backward chaining</i>	Uma estratégia de controle na qual um sistema baseado em regras tenta determinar se uma regra é correta.
Conhecimento baseado em regras	Programação em que o conhecimento é estocado na forma de experiência ou regras.
Domínio	Uma área estreitamente definida do conhecimento.
Sistemas Especialistas	Um sistema de computador imitando a performance de um especialista humano.
<i>Forward chaining</i>	Estratégia de controle de um sistema baseado em regras inicializada pela checagem de todas as regras cujas cláusulas IF são verdadeiras, repetindo o processo até o objetivo ser alcançado.
Frame	Um esquema de representação de conhecimento similar a uma lista ou registro de propriedade na programação convencional.
Lógica Fuzzy	O processo de resolver problemas que lidam com dados ambíguos e expressam todas as coisas em forma de grau por funções membros que recebem valores entre 0 e 1.
Sistemas Híbridos	Um sistema que é baseado em várias técnicas tais como, programação convencional, conhecimento especialista, lógica fuzzy, redes neurais, etc.
Mecanismo de Inferência	A porção do sistema que contém a inferência e estratégias de controle. Também pode incluir subsistemas (ex. para aquisição de conhecimentos, explanação e interface com o usuário).
Base de Conhecimento	A parte do S.E que consiste de fatos e heurística sobre o domínio.
Regras (if...then...')	Uma expressão condicional representando um raciocínio heurístico em que a primeira parte IF estabelece as condições para que a Segunda parte THEN seja executada.
Shell	Um programa que facilita a construção de um S.E.

2.7.2. Funcionamento de um S.E

O funcionamento da tomada de decisão de um S.E é parecido com um especialista humano. Para um especialista tomar uma decisão sobre um problema específico ele deve

primeiro encontrar fatos e formular hipóteses. Com base no conhecimento prévio acumulado em sua memória e adquirido através da sua formação acadêmica e/ou através da vida profissional, o especialista emite a decisão. O processo de raciocínio para tomar a decisão final sobre um problema específico é feito verificando-se o grau de importância dos fatos que encontra comparando-os com as informações dos fatos e hipóteses contidas no seu conhecimento acumulado. Durante o processo novas hipóteses são formadas e novos fatos são verificados. O especialista pode não chegar a uma decisão se os fatos de que dispõem para aplicar seu conhecimento prévio acumulado não forem suficientes, podendo até chegar a uma conclusão errada. Este erro, caso ocorra, é função de fatos verificados e do conhecimento prévio acumulado do especialista. Um S.E é um programa que capacita o computador a auxiliar uma tomada de decisão para um problema. O conhecimento prévio de um especialista humano é utilizado para instruir o computador na tarefa.

CHORAFAS (1988), exemplifica a atuação de um S.E com as seguintes palavras: "o computador interage com as perguntas do usuário e apresenta uma conclusão baseada nas respostas. O usuário pode perguntar ao computador por que ele quer certa informação e o S.E explicará sua necessidade dos dados e como eles serão utilizados. O mais importante é que o S.E mostrará como chegou a suas conclusões; não fornecendo somente a resposta, mas também as razões lógicas da tomada de decisão."

2.8. CONCLUSÕES

O estudo do projeto de biorreatores mostrou que existe um amplo conjunto de variáveis a serem consideradas e analisadas para a escolha de biorreatores e projetos de sistema biotecnológicos. Cabe ao projetista saber as etapas a serem desenvolvidas, pesquisar os dados necessários, analisar como as variáveis se relacionam, enfim, ter em mãos

todos os detalhes do processo para a correta escolha e projeto do sistema.

O uso de técnicas de inteligência artificial está crescendo em todas as áreas do conhecimento inclusive no projeto e operação de processos biotecnológicos. Torna-se então de grande importância o desenvolvimento de ferramentas que permitam a utilização destas técnicas.

É neste contexto que o aplicativo Bio-PSA (*BioProcess Simulation Assistant*) foi desenvolvido. No próximo capítulo serão mostradas as equações matemáticas utilizadas nos processos implementados nos módulos do Bio-PSA. Os capítulos seguintes contêm a apresentação do aplicativo.

CAPÍTULO 3

3. MODELOS MATEMÁTICOS

Prefácio

O modelo matemático de um processo permite fazer sua simulação reproduzindo seu comportamento após sofrer perturbações. Neste capítulo são apresentados os modelos utilizados no software Bio-PSA que será apresentado no capítulo 4. Os dois primeiros modelos, apresentados no tópico 3.1, representam a produção fermentativa de etanol. O item 3.1.1 mostra um processo fermentativo de produção de etanol com quatro reatores ligados em série e reciclo. O segundo processo fermentativo é um processo extrativo com a presença de uma unidade "Flash" e está apresentado no item 3.1.2. O tópico 3.2 mostra o modelo de produção de dextrana seguido no tópico seguinte pela descrição dos modelos para processo de purificação de proteínas baseados no método CARE.

3.1. PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE ETANOL

3.1.1. Processo com quatro reatores e reciclo

As equações do modelo determinístico que representam o processo descrito na Figura 3.1 são obtidas por balanços de

massa e energia. O modelo cinético empregado na modelagem foi descrito por LEE (1983) sendo seus parâmetros obtidos por ANDRIETTA (1994). O modelo foi considerado não segregado e não estruturado, ou seja, a célula é tratada como um soluto na modelagem. As equações diferenciais geradas foram resolvidas pelo método de Runge-Kutta de 4ª ordem implementado em linguagem FORTRAN 90. A modelagem matemática de Bioprocessos é considerada complexa requerendo modelos cinéticos adequados e parâmetros confiáveis.

3.1.1.1. Etapas do Bioprocesso

O processo esquematizado na Figura 3.1 representa um processo em escala industrial. Consiste de quatro reatores de mistura perfeita ligados em série com reciclo de células. O primeiro reator recebe o mosto provindo da etapa de preparação da matéria-prima e as células recicladas saídas da unidade de tratamento ácido. Cada reator possui um sistema de resfriamento, pois a conversão da glicose em etanol, realizada pelo microrganismo, é um processo exotérmico. O controle da temperatura é importante, pois ela possui grande influência no comportamento da levedura. O vinho fermentado é enviado para a unidade de separação. Este vinho é constituído principalmente de etanol, água, leveduras e açúcares não consumidos. A unidade de separação é composta por centrífugas de pratos que operam com velocidade angular de 8000rpm. O vinho fermentado entra na centrífuga com cerca de 30g/l a 45g/l de células (base seca). A separação fornece dois produtos: o vinho delevedurado que é mandado para a unidade de destilação; e o creme de levedura que segue para a unidade de tratamento ácido.

O vinho delevedurado deve ter no máximo 3g/l de células e ao sair da centrífuga é enviado ao tanque pulmão da unidade de destilação (dorna volante). A concentração de etanol no vinho delevedurado é de 9 a 12% e, dependendo do

processo de destilação, fornecerá como produto final álcool hidratado ou anidro (ANDRIETTA, 1994).

O creme de levedura, destinado à unidade de tratamento ácido, contém de 160 a 200g/l de células (base seca). Esta unidade é constituída de dois a quatro tanques agitados. O creme é primeiramente diluído com água de boa qualidade na proporção 1:1 sendo o pH ajustado com ácido sulfúrico concentrado (2,0 a 2,5). A duração desta etapa é de uma a duas horas. A adição da água tem como objetivos: a quebra do poder tampão do creme diminuindo a quantidade de ácido adicionado; diminuição da concentração de produtos inibitórios ao crescimento do microrganismo; adição de O_2 ao meio. A finalidade do tratamento ácido é fazer uma seleção de células eliminando contaminantes e células "velhas". Como já dito, todo o processo é contínuo e as células retornam ao primeiro reator.

O mosto é uma mistura de caldo-decana tratada e melaço (provindo da fabricação do açúcar). O caldo-de-cana recebe um aquecimento seguido de decantação na sua preparação. A finalidade deste tratamento é eliminar sólidos insolúveis (terra, bagacilho, etc.) que podem interferir no processo fermentativo bem como sobrecarregar as centrífugas.

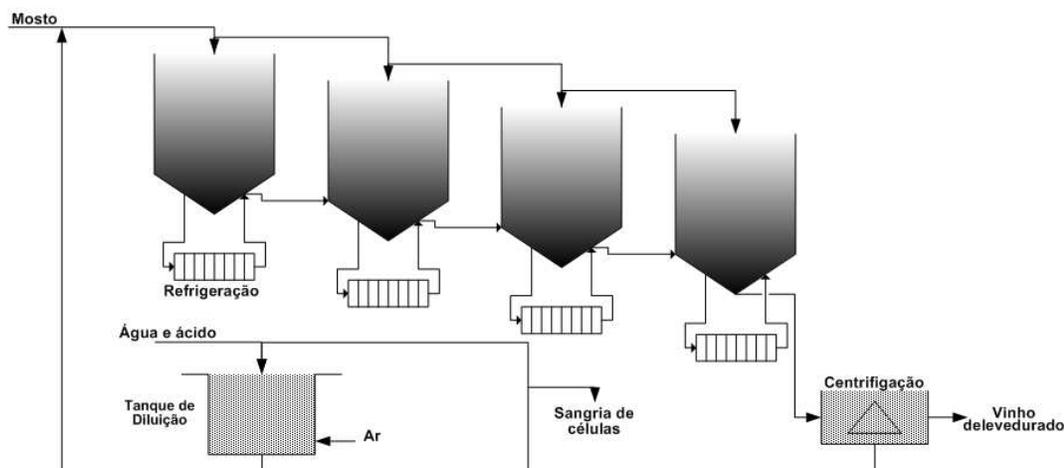


Figura 3.1: Esquema do processo fermentativo para produção de etanol em escala industrial.

3.1.1.2. Variáveis

A Tabela 3.1 mostra os valores operacionais das principais variáveis do processo. Estes são valores em que o processo deve trabalhar para que se consiga manter sua lucratividade e eficiência. A Figura 3.2 apresenta as variáveis no processo.

Tabela 3.1: Valores das variáveis operacionais de processo (ANDRIETTA, 1994)

Variáveis	Valores
Concentração de ART no mosto	180,0 g/l
Concentração de células no creme	180,0 g/l
Concentração de células no reciclo	90,0 g/l
Concentração de células no vinho	3,0 g/l
Temperatura do fluido refrigerante (água)	28,0 °C

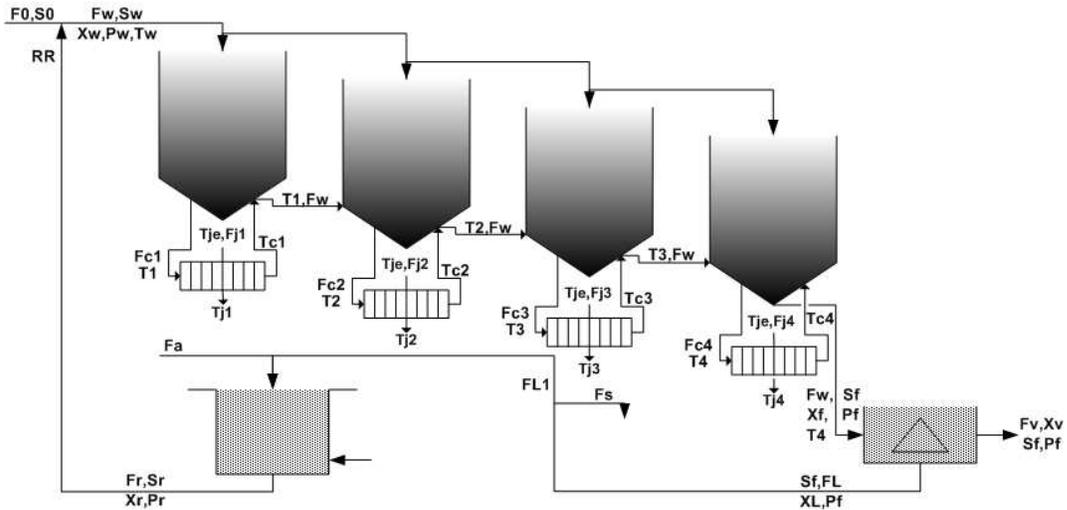


Figura 3.2: Variáveis do processo de produção de etanol.

A Tabela 3.2 e Tabela 3.3 mostram as principais variáveis independentes e dependentes do processo que foram utilizadas na modelagem. A Tabela 3.4 apresenta os valores em que as variáveis independentes devem trabalhar durante o processo.

Tabela 3.2: Variáveis independentes trabalhadas na simulação.

Variável	Descrição	Observações
F0	Vazão do meio de alimentação na entrada do sistema (m^3h^{-1})	Seu valor é fixado em $100 m^3/h.l$
S0	Concentração de Açúcares Redutores Totais no meio de alimentação ($g l^{-1}$)	Deve estar em torno de $180g/l$ para chegar à concentração de etanol desejada. Seu valor depende da cana-de-açúcar e da quantidade de água utilizada na moagem.
RR	Taxa de reciclo	Fração entre a vazão do creme de levedura tratado e a vazão total de alimentação do fermentador. Valor mais utilizado é de $0,3$.
Tw	Temperatura de alimentação do primeiro reator ($^{\circ}C$)	Engloba a temperatura do mosto vinda dos resfriadores e do creme de levedura do reciclo. Seu valor é fixado em $28^{\circ}C$
Tje	Temperatura do fluido de resfriamento na entrada do trocador i ($^{\circ}C$)	Depende da temperatura da água do rio utilizado caso a indústria não possua um sistema de resfriamento em circuito fechado. O valor médio da temperatura de rios é em torno de $28^{\circ}C$ no estado de São Paulo.

Tabela 3.3: Variáveis dependentes trabalhadas na simulação.

Variável	Descrição
S(i)	Concentração de ART no reator i ($g l^{-1}$)
X(i)	Concentração de células no reator i ($g l^{-1}$)
P(i)	Concentração de etanol no reator i ($g l^{-1}$)
T(i)	Temperatura no reator i ($^{\circ}C$)
Tc(i)	Temperatura do fluido reagente na saída do trocador i ($^{\circ}C$)
Fj(i)	Vazão do fluido de resfriamento no trocador de calor i, (m^3h^{-1}).
FW	Vazão de alimentação do primeiro reator (m^3h^{-1})
FL1	Vazão de leite de levedura após a sangria (m^3h^{-1})
Rendimento	Quantidade de etanol produzido pela fermentação alcoólica em relação à quantidade de açúcares que pode ser convertida em álcool pela multiplicação do valor estequiométrico $0,511g/g$ e por $100(\%)$.
Produtividade	Quantidade de etanol formado em relação a uma unidade de volume do reator por unidade de tempo. ($g. l^{-1}.h^{-1}$)

Tabela 3.4: Valores das variáveis independentes (ANDRIETTA, 1994).

Variáveis independentes manipuladas	Valores
F0	$100.0 (m^3.h^{-1})$
RR	0.30
S0	$180.0 (g/l)$
Tw	$28.0 (^{\circ}C)$
Tje	$28.0 (^{\circ}C)$

3.1.1.3. Modelo e Parâmetros Cinéticos

Um modelo cinético microbiano para aplicação industrial deve ser simples (rapidez), ter poucos parâmetros para ajuste e descrever com precisão o processo. A conversão de ART em etanol por um microrganismo envolve grande número de reações enzimáticas. Uma descrição completa deste modelo cinético levaria à necessidade de muitos parâmetros o que tornaria o modelo complexo e inviável para aplicação industrial. Para contornar este problema são feitas simplificações. Considerar o modelo como não segregado e não estruturado já reduz bastante o número de parâmetros no ajuste. LEE (1983) propôs um modelo cinético derivado do modelo de "Monod" que se mostrou adequado em escala industrial quando a dinâmica é relativamente lenta (como os processos fermentativos).

$$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)^m \left(\frac{S}{K_s + S}\right) \quad \text{Equação 3.1}$$

O cálculo de μ_{\max} inclui a temperatura (T) e segue a equação de Arrhenius:

$$\mu_{\max} = A e^{-\frac{E_n}{RT}} \quad \text{Equação 3.2}$$

Segundo ANDRIETTA (1994), abaixo da temperatura crítica de 32°C P_{\max} é constante, acima desta temperatura seu cálculo é feito pela Equação 3.3.

$$P_{\max} = K_0 e^{aT} \quad \text{Equação 3.3}$$

Por definição: $\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$

Ou seja:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \text{Equação 3.4}$$

Substituindo a Equação 3.1 na Equação 3.4 tem-se:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)^m \left(\frac{S}{K_s + S}\right) \quad \text{Equação 3.5}$$

A equação acima descreve a variação de células com o tempo. Sabe-se que:

$$\frac{dX}{dt} = Y_{X/S} \left(-\frac{dS}{dt} \right) \quad \text{Equação 3.6}$$

$Y_{X/S}$ é uma constante calculada experimentalmente. Relacionando a Equação 3.5 e a Equação 3.6 e sabendo que o substrato é consumido:

$$Y_{X/S} = \frac{dX/dt}{-dS/dt}$$

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{\mu_{\max} X}{Y_{X/S}} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)^n \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right)^m \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \quad \text{Equação 3.7}$$

Analogamente, tem-se que: $Y_{P/S} = \frac{dP/dt}{-dS/dt}$

Resultando em:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{\mu_{\max} X Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)^n \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right)^m \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \quad \text{Equação 3.8}$$

Resumindo, para o processo analisado têm-se as seguintes relações:

$$r_X = \frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)^n \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right)^m \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \quad \text{Equação 3.9}$$

$$r_S = \frac{dS}{dt} = -\frac{\mu_{\max} X}{Y_{X/S}} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)^n \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right)^m \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \quad \text{Equação 3.10}$$

$$r_P = \frac{dP}{dt} = \frac{\mu_{\max} X Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}} \right)^n \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right)^m \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \quad \text{Equação 3.11}$$

Os parâmetros cinéticos e as constantes utilizadas nas equações diferenciais são mostrados na Tabela 3.5 e na Tabela 3.6.

Tabela 3.5 Valores dos Parâmetros Cinéticos (ANDRIETTA, 1994)

Parâmetros	Valores
μ_{\max}	0,41 hora ⁻¹
P_{\max}	103 grama/litro (T ≤ 32°C)
X_{\max}	100 grama/litro
n	3,0
m	1,0
K_s	1,6

Tabela 3.6 Valores das constantes utilizadas

Constantes	Valores
E	1,54.10 ⁴ cal.mol ⁻¹
A	4,50.10 ¹⁰
K_0	895,6 g/l
a	-0,0676 °C ⁻¹

Balanco de massa para o reator i

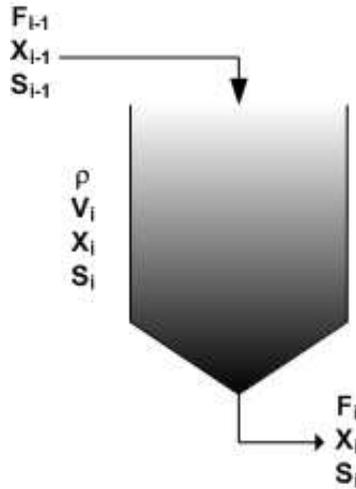


Figura 3.3: Reator de mistura perfeita i.

a) Balanço global

$$\frac{d(V_i \rho_i)}{dt} = F_{i-1} \rho_{i-1} - F_i \rho_i$$

Considerando ρ_i constante em cada reator:

$$\frac{dV_i}{dt} = \frac{F_{i-1} \rho_{i-1}}{\rho_i} - F_i \tag{Equação 3.12}$$

b) Balanço de Substrato

O balanço para o substrato é representado pela seguinte expressão:

$$\frac{d(V_i S_i)}{dt} = F_{i-1} S_{i-1} - F_i S_i + r_s V_i$$

Substituindo a Equação 3.10 na equação anterior:

$$\frac{d(V_i S_i)}{dt} = F_{i-1} S_{i-1} - F_i S_i - \frac{V_i \mu_{\max} X_i}{Y_{X/S}} \left(1 - \frac{P_i}{P_{\max}}\right)^n \left(1 - \frac{X_i}{X_{\max}}\right)^m \left(\frac{S_i}{K_S + S_i}\right) \quad \text{Equação 3.13}$$

c) Balanço de Produto

Analogamente o balanço para o produto é representado pela seguinte expressão:

$$\frac{d(V_i P_i)}{dt} = F_{i-1} P_{i-1} - F_i P_i + r_P V_i$$

$$\frac{d(V_i P_i)}{dt} = F_{i-1} P_{i-1} - F_i P_i - \frac{V_i \mu_{\max} X_i Y_{P/S}}{Y_{X/S}} \left(1 - \frac{P_i}{P_{\max}}\right)^n \left(1 - \frac{X_i}{X_{\max}}\right)^m \left(\frac{S_i}{K_S + S_i}\right) \quad \text{Equação 3.14}$$

d) Balanço de Células

O balanço de células proposto por ANDRIETTA (1994) engloba células viáveis e mortas não incluindo a taxa de morte celular. Ou seja, é considerado que a concentração de células incapazes de crescer e reproduzir é desprezível.

$$\frac{d(V_i X_i)}{dt} = F_{i-1} X_{i-1} - F_i X_i + r_X V_i$$

$$\frac{d(V_i X_i)}{dt} = F_{i-1} X_{i-1} - F_i X_i - V_i \mu_{\max} X \left(1 - \frac{P_i}{P_{\max}}\right)^n \left(1 - \frac{X_i}{X_{\max}}\right)^m \left(\frac{S_i}{K_S + S_i}\right) \quad \text{Equação 3.15}$$

Balanço de energia

a) Fluido Reagente no reator i

$$\frac{\rho_i C_{p_i} d(V_i T_i)}{dt} = F_{i-1} T_{i-1} \rho_i C_{p_i} - F_i T_i \rho_i C_{p_i} + F_{c_i} (T_{c_i} - T_i) \rho_i C_{p_i} + V_i \Delta H r_S \quad \text{Equação 3.16}$$

O termo $V_i \Delta H r_S$ provém da geração de calor do crescimento do microrganismo para o reator da Figura 3.3. Segundo SHULER e KARGI (1992), entre 40% e 50% da energia obtida pelo microrganismo é transformada em energia biológica (ATP) durante o metabolismo aeróbico. O restante da energia é perdido para o meio na forma de calor.

Para o reator estudado temos que:

$$\frac{d(V_i T_i)}{dt} = F_{i-1} T_{i-1} - F_i T_i + F c_i (T c_i - T_i) + \frac{V_i \Delta H X_i}{\rho_i C p_i Y_{X/S}} \mu_i \quad \text{Equação 3.17}$$

b) Fluido Reagente no trocador de calor i

$$\frac{d(T c_i)}{dt} = \frac{F c_i}{V c_i} (T_i - T c_i) - \left(\frac{U A_i}{V c_i \rho_i C p_i} \right) L M D T_i \quad \text{Equação 3.18}$$

Onde:

$$L M D T_i = \frac{(T_i - T j_i) - (T c_i - T j e)}{\ln \left(\frac{(T_i - T j_i)}{(T c_i - T j e)} \right)}$$

c) Fluido de Resfriamento no trocador de calor i

$$\frac{d(T j_i)}{dt} = \frac{F j_i}{V j_i} (T j e - T j_i) + \left(\frac{U A_i}{V j_i \rho_j C p_j} \right) L M D T_i \quad \text{Equação 3.19}$$

Balances de massa aplicados ao sistema

A Figura 3.2 mostra o esquema do processo fermentativo com as principais variáveis. Aplicando balanço de massa em partes do sistema obtêm-se as equações abaixo:

$$F_w = \frac{F_0}{(1 - RR)} \quad \text{Equação 3.20}$$

$$F_R = F_w - F_0 \quad \text{Equação 3.21}$$

$$F_{L1} = \frac{F_R X_R}{X_L} \quad \text{Equação 3.22}$$

$$F_a = F_R - F_{L1} \quad \text{Equação 3.23}$$

$$F_V = F_w \frac{X_L - X_f}{X_L - X_V} \quad \text{Equação 3.24}$$

$$F_L = F_w - F_V \quad \text{Equação 3.25}$$

$$F_S = F_L - F_{L1} \quad \text{Equação 3.26}$$

$$S_R = \frac{F_{L1} S_f}{F_R} \quad \text{Equação 3.27}$$

$$S_w = \frac{F_R S_R + F S_0}{F_w} \quad \text{Equação 3.28}$$

$$P_R = \frac{F_{L1} P_f}{F_R} \quad \text{Equação 3.29}$$

$$P_w = \frac{F_R P_R}{F_w} \quad \text{Equação 3.30}$$

Assim, o processo descrito na Figura 3.1 é constituído de sete equações diferenciais para cada reator e mais onze equações obtidas do balanço de massa no sistema. As equações são resolvidas pelo método de Runge-Kutta de 4^a ordem.

3.1.1.4. Rendimento e Produtividade

As variáveis apresentadas neste capítulo até o momento são observadas diretamente no processo. No entanto, existem variáveis indiretas que são importantes para análise do processo, destacando rendimento do processo e produtividade de etanol.

$$REND = \frac{F_v \cdot P(4)}{F_0 \cdot S_0} \cdot \frac{100}{0,511} \quad \text{Equação 3.31}$$

$$PROD = \frac{F_v \cdot P(4)}{V} \quad \text{Equação 3.32}$$

Os valores de REND e PROD, nos perfis dinâmicos, são valores médios referentes à uma hora de processo. DECHECHI (1998) utilizou o artifício de colocar os valores da última hora passada para que os valores fossem os mais representativos possíveis dinamicamente.

3.1.2. Processo de Fermentação Alcoólica

Extrativo

O processo mostrado a seguir foi proposto por SILVA (1998) e tem como objetivo a simulação de condições industriais como apresentadas por ANDRIETTA e MAUGERI (1994). SILVA (1998) propõe um sistema em que somente um fermentador é usado ao invés de um sistema em cascata (Item 3.1.1), sendo que o tanque "flash" é usado para extrair

parte do etanol formado. Segundo SILVA et al. (1999) o sistema proposto apresenta um melhor desempenho do que o processo convencional.

3.1.2.1. Etapas do Bioprocesso

Como mostrado na Figura 3.4 o processo possui quatro unidades:

- Fermentador (unidade de produção de etanol)
- Centrífuga (unidade de separação de células)
- Cuba (unidade de tratamento do fermento)
- Tanque "flash" a vácuo (unidade de separação da mistura etanol-água).

O processo inicia-se com a alimentação do substrato no fermentador, que já contém uma concentração inicial de células de levedura. Dentro do fermentador, o substrato é consumido e etanol é produzido. A corrente de saída do fermentador, contendo substrato, células e etanol, é enviada para a centrífuga, onde é separada em duas fases, uma pesada contendo a maior parte das células, e outra leve, praticamente isenta de células. A fase que contém as células é enviada para a unidade de tratamento do fermento (cuba), após se fazer uma sangria para remover uma pequena parte do fermento. Na cuba, o creme de leveduras é diluído com água, na proporção de um volume de água para um volume de creme, e adiciona-se ácido sulfúrico sob forte agitação, até que se atinja pH entre 2,0 e 2,5. Este tratamento ácido tem o objetivo de diminuir a contaminação por bactérias. O fermento tratado é, então, enviado para o fermentador para um novo ciclo do processo. O tempo ideal de repouso do fermento na cuba está entre uma e duas horas.

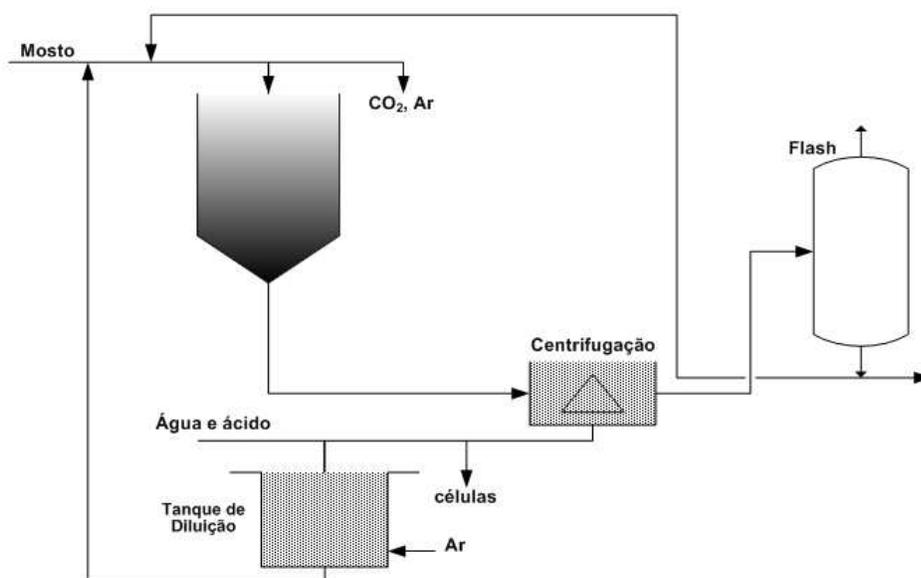


Figura 3.4: Esquema do processo Fermentação Alcoólica Extrativo.

Antes de se atingir o estado estacionário, a operação do processo extrativo é semelhante ao processo convencional, ou seja, o mosto delevedurado (fase leve de saída da centrífuga) é enviado para a destilaria (para a separação da mistura etanol-água). Quando se atinge o estado estacionário do processo convencional, o sistema de separação a vácuo é acionado. O mosto delevedurado é conduzido para o tanque "flash", onde ocorre parte da separação da mistura etanol-água. O tanque "flash" é operado numa temperatura entre 28 e 30°C. Esta faixa de temperatura é escolhida com o objetivo de eliminar a necessidade de um trocador de calor, o que reduz drasticamente os custos fixos e de manutenção. A faixa de pressão associada é de 30 a 40 mmHg, porém na prática não se consegue estes valores. A porção vaporizada é enviada para uma coluna de retificação juntamente com uma parte do líquido e a outra parte do líquido retorna ao fermentador. Este retorno de uma parte do líquido tem como objetivo manter a concentração de etanol no fermentador em um valor no qual ele possa atuar como anti-séptico. De acordo com o conhecimento prático nas unidades industriais, esta concentração de álcool é em torno de 40 g/l, que tem um

baixo efeito inibitório para leveduras que produzem álcool, mas é altamente inibitória para grande parte dos microrganismos contaminantes (SILVA et al., 1999).

3.1.2.2. Modelo matemático

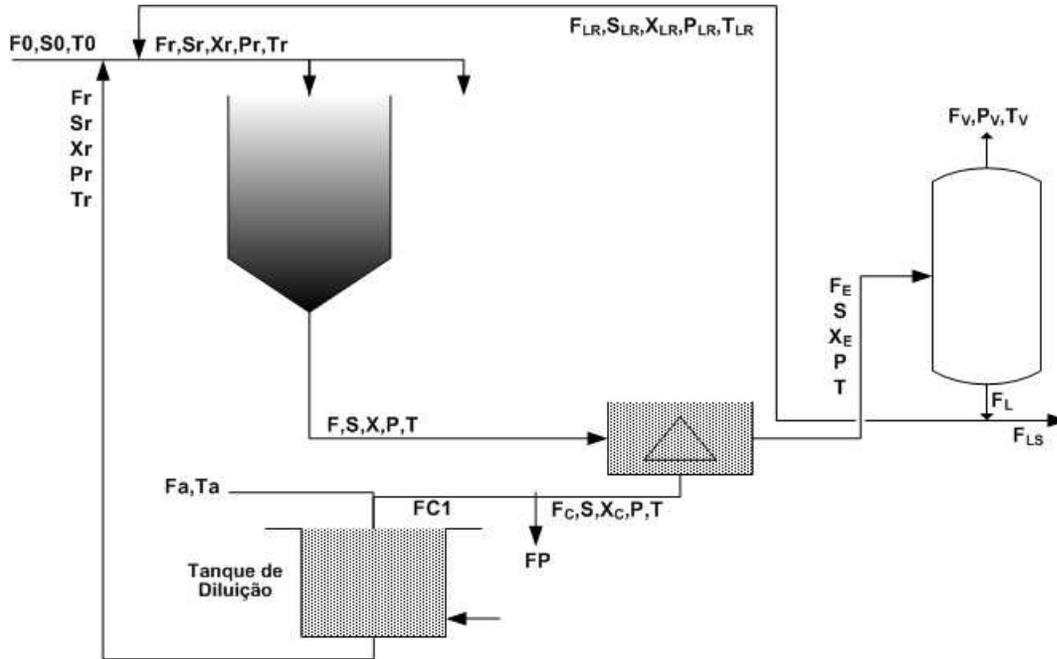


Figura 3.5: Fluxograma do processo Fermentação Alcoólica Extrativo com variáveis.

A taxa de crescimento é descrita na Equação 3.33. Esta equação foi usada por SIQUEIRA FILHO (1997) para descrever os dados experimentais de batelada alimentada estendida.

$$r_x = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \exp(-K_i S) \left(1 - \frac{X_t}{X_{\max}}\right)^m \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n X_v \quad \text{Equação 3.33}$$

A taxa de morte celular utilizada foi descrita por DALE et al. (1990) conforme a Equação 3.34 e é considerada uma função da temperatura e concentração de etanol.

$$r_d = (K_{dT} \exp(K_{dP}P)) X_v \quad \text{Equação 3.34}$$

A taxa de produção de etanol é descrita na Equação 3.35 e taxa de consumo de substrato na Equação 3.36.

$$r_p = Y_{pX} r_x + m_p X_v \quad \text{Equação 3.35}$$

$$r_s = \frac{r_x}{Y_x} + m_x X_v \quad \text{Equação 3.36}$$

As concentrações e vazões de entrada no fermentador foram determinadas através de um balanço de massa global no processo. Entretanto, visando à simplificação, foram realizadas as aproximações abaixo:

- As concentrações de substrato e produto na saída da centrífuga, tanto na fase leve quanto na pesada, são iguais às concentrações na saída do fermentador.
- A concentração de células de levedura no reciclo é fixa. Para isto deve-se variar a vazão de água (F_a) que dilui o creme de levedura.
- A vazão F_r é mantida constante no valor fixado pela taxa de reciclo de células (RR) através da variação da vazão de purga (F_p).

As seguintes equações foram obtidas:

$$F_r = FR \quad \text{Equação 3.37}$$

$$F = F_0 + F_{LR} + F_r \quad \text{Equação 3.38}$$

Através da substituição da Equação 3.37 na Equação 3.38 obtém-se a equação que descreve a vazão de alimentação do fermentador.

$$F = \frac{F_0 + F_{LR}}{(1-R)} \quad \text{Equação 3.39}$$

O tempo de residência pode ser descrito por:

$$t_{re} = \frac{V}{F} \quad \text{Equação 3.40}$$

Realizando-se um balanço de biomassa na centrífuga obtém-se a Equação 3.41 e um balanço global leva a Equação 3.42.

$$FX = F_E X_E + F_c X_c \quad \text{Equação 3.41}$$

$$F_c = F - F_E \quad \text{Equação 3.42}$$

Substituindo-se a Equação 3.41 na Equação 3.42 obtém-se a vazão de alimentação do tanque "flash".

$$F_E = \frac{F(X - X_c)}{X_E - X_c} \quad \text{Equação 3.43}$$

A vazão de alimentação da cuba é obtida através do balanço de biomassa na cuba de tratamento conforme a equação abaixo:

$$F_{c1} = \frac{F_r X_r}{X_c} \quad \text{Equação 3.44}$$

Através de um balanço global na cuba pode-se obter a vazão de água alimentada (Equação 3.45) e de um balanço de massa para substrato obtém-se a concentração de substrato no reciclo da cuba (Equação 3.46).

$$F_a = F_r - F_{c1} \quad \text{Equação 3.45}$$

$$S_r = \frac{F_{c1} S}{F_r} \quad \text{Equação 3.46}$$

A concentração de produto no reciclo da cuba é obtida por um balanço para produto:

$$P_r = \frac{F_{c1} P}{F_r} \quad \text{Equação 3.47}$$

Do balanço de massa para substrato no tanque "flash" obtém-se a concentração de substrato no reciclo do "flash"

$$S_{LR} = \frac{F_E S}{F_L} \quad \text{Equação 3.48}$$

Pelo balanço para biomassa obtém-se a concentração de biomassa no reciclo do tanque "flash":

$$X_{LR} = \frac{F_E X_E}{F_L} \quad \text{Equação 3.49}$$

Já a vazão de reciclo do "flash" pode ser calculada por:

$$F_{LR} = r F_L \quad \text{Equação 3.50}$$

A concentração de substrato na alimentação é determinada por um balanço para substrato na alimentação do fermentador, conforme a Equação 3.51. A Equação 3.52 mostra a concentração de produto na alimentação obtida pelo balanço para produto:

$$S_F = \frac{F_0 S_0 + F_{LR} S_{LR} + F_r S_r}{F} \quad \text{Equação 3.51}$$

$$P_F = \frac{F_r P_r + F_{LR} P_{LR}}{F} \quad \text{Equação 3.52}$$

O balanço para biomassa determina a concentração de biomassa na alimentação do fermentador:

$$X_F = \frac{F_r X_r + F_{LR} X_{LR}}{F} \quad \text{Equação 3.53}$$

A temperatura da corrente de reciclo da cuba (Equação 3.54) é calculada através de um balanço de energia na cuba e a temperatura da corrente de alimentação é obtida através de um balanço de energia na alimentação do fermentador (Equação 3.55).

$$T_r = \frac{F_A T_A + F_{cl} T}{F_r} \quad \text{Equação 3.54}$$

$$T_F = \frac{F_0 T_0 + F_r T_r + F_{LR} T_{LR}}{F} \quad \text{Equação 3.55}$$

Modelo do Fermentador

As equações de balanço no fermentador são dadas por:

$$\frac{dX_v}{dt} = r_x - r_d - D(X_v - X_{vF}) \quad \text{Equação 3.56}$$

$$\frac{dX_d}{dt} = r_d - D(X_d - X_{dF}) \quad \text{Equação 3.57}$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{D(S_F - S) - r_s + \frac{r_x}{\rho} S}{1 - \frac{X_t}{\rho}} \quad \text{Equação 3.58}$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{r_p - D(P - P_F) + \frac{(1-\gamma)}{\rho} r_x P}{1 - \frac{X_t}{\rho} + \frac{\gamma}{\rho} X_t} \quad \text{Equação 3.59}$$

$$\frac{dT}{dt} = D(T_F - T) + \frac{\Delta H r_s}{\rho_m C_p} \quad \text{Equação 3.60}$$

onde: ρ é a taxa de peso de célula seco por volume de célula úmida (Kg.m^{-3}), γ a taxa de concentração de etanol intracelular e extracelular (Kg.m^{-3}), X_{vF} a concentração de células viáveis na alimentação (Kg.m^{-3}), X_{dF} a concentração de células mortas na alimentação (Kg.m^{-3}) e S_F a Concentração de substrato na alimentação (Kg.m^{-3}).

Os valores das constantes físicas da equação de balanço de energia (Equação 3.60) são mostrados na Tabela 3.7 (SILVA, 1998).

Tabela 3.7: Valores das constantes físicas.

ΔH	51.76 Kcal/Kg ART
ρ_m	1000 kg/m ³
C_p	1 Kcal/Kg °C

Como a dinâmica do tanque "flash" é considerada bastante rápida em comparação com a da fermentação pode-se assumir uma condição de estado pseudo-estacionário neste tanque. Os balanços de massa no tanque "flash" são dados por:

$$F_E = F_V + F_L \quad \text{Equação 3.61}$$

$$F_E x_{Ei} = F_V y_i + F_L x_i \quad \text{Equação 3.62}$$

O equilíbrio líquido-vapor da mistura etanol-água é calculado por:

$$K_i = \frac{y_i}{x_i} = \gamma_i \frac{p_i^{\text{sat}}}{p} \quad \text{Equação 3.63}$$

onde o valor de p_i^{sat} é calculado pela equação de Antoine e o valor de γ_i foi calculado usando o modelo NRTL (Non-random Two-Liquid) (SILVA, 1998). Sabe-se que a mistura é mais complexa que uma simples mistura líquido-vapor.

3.1.2.3. Rendimento e Produtividade

O rendimento e a produtividade são definidos como:

$$REND = \frac{F_v \cdot P_v + F_{LS} \cdot P_{LR}}{F_0 \cdot S_0 \cdot 0.511} \quad \text{Equação 3.64}$$

$$PROD = \frac{F_v \cdot P_v + F_{LS} \cdot P_{LR}}{V} \quad \text{Equação 3.65}$$

A vazão de entrada de substrato (F_0) foi considerada constante, sendo que as variações no tempo de residência causam variações no volume do fermentador, ou seja, o volume do fermentador é dado pela Equação 3.66 sendo (F) calculada pela Equação 3.39.

$$V = F \cdot \tau \quad \text{Equação 3.66}$$

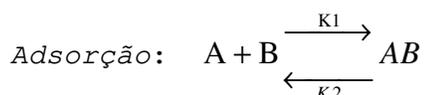
3.2. PRODUÇÃO DE DEXTRANA

3.2.1. Introdução

O modelo para produção de dextrana é baseado no processo CARE (*Continuous Affinity Recycle Extraction*). Foi adaptado por SOUZA (1993) e estudado por CURRALERO (2000) e FLORIDO (2001). O próximo item, 3.2.2, mostra a modelagem do processo CARE original seguido do item 3.2.3 que mostra a modelagem do processo para produção de dextrana.

3.2.2. O Processo CARE

Os estágios de adsorção e lavagem (Figura 2.13) são representados como uma reação de segunda ordem reversível, enquanto o estágio de dessorção é assumido como sendo reação de primeira ordem irreversível (CHASE, 1984 a, b):



Onde A , B e AB é a proteína alvo, o adsorvente e complexo proteína adsorvida, respectivamente.

A taxa de adsorção pode ser expressa pela Equação 3.67, onde Q é a concentração de proteína na fase sólida e E é a concentração de proteína na fase líquida.

$$\frac{dQ}{dt} = k_1 E (Q_m - Q) - k_2 Q \quad \text{Equação 3.67}$$

No equilíbrio, $dQ/dt = 0$, logo a Equação 3.67 pode ser reescrita resultando a Equação 3.68, um modelo isotérmico do tipo *Langmuir*, como segue:

$$Q^* = Q_m \frac{E^*}{k_2/k_1 + E^*} \quad \text{Equação 3.68}$$

Onde o sobrescrito * representa o valor no equilíbrio.

3.2.3. Processo CARE modificado para produção de dextrana

Consiste de dois tanques de mesmo volume, semelhantes aos do sistema CARE original proposto por PUNGOR et al. (1987). A diferença reside justamente no fato do CARE não trabalhar com reação ocorrendo simultaneamente, como no caso estudado aqui. No estágio de dessorção do sistema estudado também não há retirada de material como no CARE original.

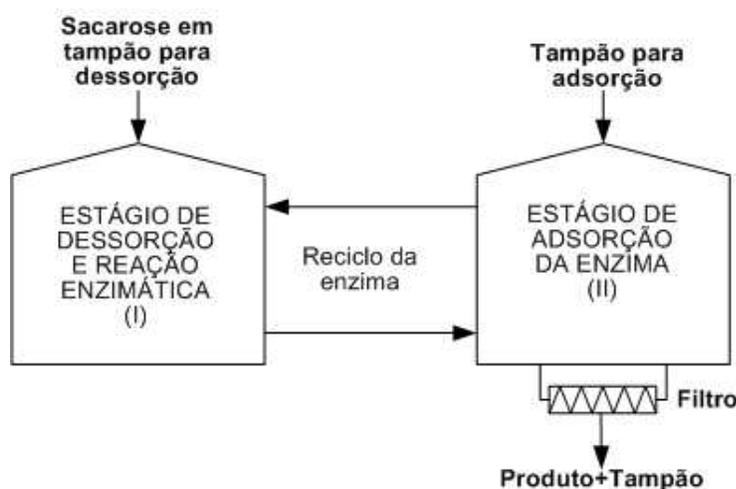


Figura 3.6: Esquema do reator de síntese de dextrana.

De acordo com o esquema mostrado na Figura 3.6, a enzima é fornecida ao sistema no início do processo. A alimentação de substrato em solução tamponada ocorre no estágio (I) onde ocorre dessorção da enzima ligada à resina, pelo uso do tampão adequado, e reação enzimática com produção de dextrana. Todos os compostos presentes no estágio (I) são reciclados continuamente ao estágio (II), onde a enzima é adsorvida pela resina sob condições favoráveis. Desta forma a enzima não é eliminada, retornando ao estágio (I) junto a outros compostos. Enquanto isso o produto, já isento de enzima, deixa o reator após passar através do filtro presente no estágio (II).

3.2.4. Considerações sobre o sistema

O sistema foi descrito matematicamente por um processo simultâneo de adsorção, dessorção e reação enzimática com um balanço de massa. Os parâmetros cinéticos foram estimados em experimentos batelada por SOUZA (1993). O processo de adsorção foi considerado uma reação reversível de segunda ordem e o de dessorção, como reação irreversível de primeira ordem (CHASE, 1984b).

O esquema do reator proposto contendo indicação dos fluxos é mostrado na Figura 3.7.

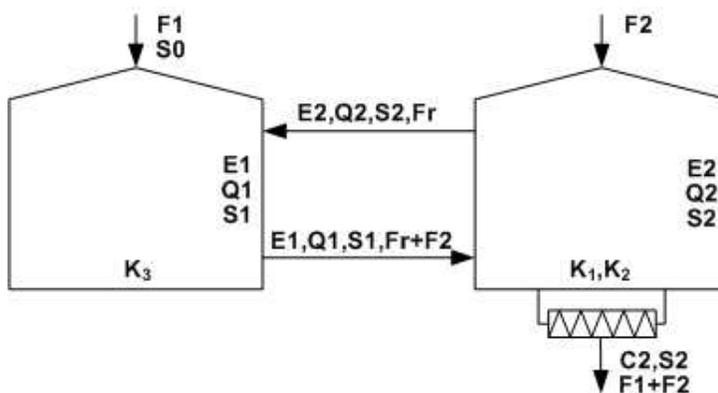


Figura 3.7: Esquema do reator de síntese de dextrana, com indicação dos fluxos.

3.2.5. Hipóteses do modelo

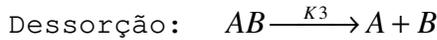
- Ambos os tanques são perfeitamente agitados; PUNGOR et al. (1987).
- Os efeitos térmicos são desprezíveis;
- Os fluxos de entrada, F_1 e F_2 , não contêm sólidos (isto é, todo o adsorvente presente no sistema circula continuamente);
- A dessorção ocorre somente no estágio (I);
- A adsorção ocorre somente no estágio (II);
- A reação enzimática ocorre nos dois estágios, principalmente no (I);
- Os dois tanques apresentam mesmo volume.

Para simplificação das equações, serão utilizadas as seguintes correlações:

$$\tau_1 = \frac{V_1}{F_1} \quad \tau_2 = \frac{V_2}{F_1} \quad \psi = \frac{F_R}{F_1} \quad \gamma = \frac{F_1}{F_2}$$

3.2.6. Desenvolvimento do modelo

Estágio I - Reação Enzimática e Dessorção



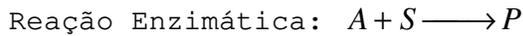
AB \equiv complexo (proteína + adsorvente)

A \equiv enzima livre (Proteína a ser adsorvida)

B \equiv adsorvente

A dessorção é tida como uma reação irreversível de 1ª ordem:

$$r_{C_1} = -r_{Q_1} = k_3 Q_1$$



S \equiv substrato

P \equiv produto

A reação enzimática geralmente é descrita pela cinética de Michaelis-Menten:

$$\left. \frac{dS}{dt} \right)_{\text{reação}} = -V_{\max} \frac{S}{K_m + S} \quad \text{Equação 3.69}$$

onde $V_{\max} = K [E]$

a) Balanço de massa da enzima na fase líquida

$$\begin{aligned} V_1 \frac{dE_1}{dt} &= \varepsilon F_R E_2 - \varepsilon F_R E_1 - F_1 E_1 + r_{E_1} V_1 \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \Rightarrow \\ \Rightarrow \frac{dE_1}{dt} &= \frac{\varepsilon F_R E_2}{V_1} - \frac{\varepsilon F_R E_1}{V_1} - \frac{F_1 E_1}{V_1} + r_{E_1} \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \end{aligned} \quad \text{Equação 3.70}$$

Após o rearranjo, tem-se:

$$\frac{dE_1}{dt} = \frac{\psi \varepsilon}{\tau_1} (E_2 - E_1) - \frac{E_1}{\tau_1} + k_3 Q_1 \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \quad \text{Equação 3.71}$$

b) Balanço de massa da enzima na fase sólida

$$V_{s1} \frac{dQ_1}{dt} = (1-\varepsilon)F_R Q_2 - (1-\varepsilon)F_R Q_1 - \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)F_1 Q_1 + r_{Q_1} V_{s1} \Rightarrow$$

$$\Rightarrow \frac{dQ_1}{dt} = \frac{(1-\varepsilon)F_R Q_2}{V_{s1}} - \frac{(1-\varepsilon)F_R Q_1}{V_{s1}} - \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)\frac{F_1 Q_1}{V_{s1}} + r_{Q_1}$$

Equação 3.72

A fração líquida ε é dada por

$$\varepsilon = \frac{V_1}{V_1 + V_{s1}} = \frac{V_2}{V_2 + V_{s2}}$$

Equação 3.73

Pois o volume de sólido é idêntico nos dois tanques (assim como o de líquido). Isolando os termos referentes aos volumes de sólido nos dois estágios, chega-se a:

$$V_{s1} = V_1 \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)$$

Equação 3.74

$$V_{s2} = V_2 \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)$$

Equação 3.75

Rearranjando os termos:

$$\frac{dQ_1}{dt} = \frac{\psi\varepsilon}{\tau_1}(Q_2 - Q_1) - \frac{Q_1}{\tau_1} - k_3 Q_1$$

Equação 3.76

c) Balanço de massa do substrato

$$V_1 \frac{dS_1}{dt} = F_1 S_0 + \varepsilon F_R S_2 - \varepsilon F_R S_1 - F_1 S_1 - \left(V_{max} \frac{S_1}{K_m + S_1}\right) V_1$$

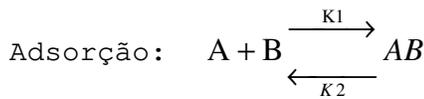
Equação 3.77

Utilizando as correlações dadas no início e agrupando os termos:

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{\psi\varepsilon}{\tau_1}(S_2 - S_1) + \frac{S_0 - S_1}{\tau_1} - V_{max} \frac{S_1}{K_m + S_1}$$

Equação 3.78

Estágio II - Adsorção



A adsorção é tida como uma reação reversível de 2ª ordem:

$$r_{E_2} = -r_{Q_2} = k_2 Q_2 - k_1 E_2 (Q_m - Q_2)$$

a) Balanço de massa da enzima na fase líquida

$$V_2 \frac{dE_2}{dt} = \varepsilon F_R E_1 - \varepsilon F_R E_2 + F_1 E_1 - (F_1 + F_2) E_2 + r_{E_2} V_2 \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \Rightarrow$$

$$\Rightarrow \frac{dE_2}{dt} = \frac{\varepsilon F_R E_1}{V_2} - \frac{\varepsilon F_R E_2}{V_2} + \frac{F_1 E_1}{V_2} - \frac{(F_1 + F_2) E_2}{V_2} + r_{E_2} \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right)$$

Equação 3.79

Após o rearranjo dos termos e substituições, tem-se:

$$\frac{dE_2}{dt} = \frac{\psi \varepsilon}{\tau_2} (E_1 - E_2) + \frac{E_1 - E_2}{\tau_2} - \frac{E_2}{\gamma \tau_2} + [k_2 Q_2 - k_1 E_2 (Q_m - Q_2)] \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right)$$

Equação 3.80

b) Balanço de massa da enzima na fase sólida

$$V_{s2} \frac{dQ_2}{dt} = (1-\varepsilon) F_R Q_1 - (1-\varepsilon) F_R Q_2 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) F_1 Q_1 + r_{Q_2} V_{s2} \Rightarrow$$

$$\Rightarrow \frac{dQ_2}{dt} = \frac{(1-\varepsilon) F_R Q_1}{V_{s2}} - \frac{(1-\varepsilon) F_R Q_2}{V_{s2}} + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{F_1 Q_1}{V_{s2}} + r_{Q_2}$$

Equação 3.81

Substituindo e rearranjando os termos:

$$\frac{dQ_2}{dt} = \frac{\psi \varepsilon}{\tau_2} (Q_1 - Q_2) + \frac{Q_1}{\tau_2} + k_1 E_2 (Q_m - Q_2) - k_2 Q_2$$

Equação 3.82

c) Balanço de massa do substrato

$$V_2 \frac{dS_2}{dt} = \varepsilon F_R S_1 - \varepsilon F_R S_2 + F_1 S_1 - (F_1 + F_2) S_2 - \left(V_{max} \frac{S_2}{K_m + S_2} \right) V_2$$

Equação 3.83

Utilizando as correlações dadas no início e agrupando os termos:

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{\psi \varepsilon}{\tau_2} (S_1 - S_2) + \frac{S_1 - S_2}{\tau_2} - \frac{S_2}{\gamma \tau_2} - V_{max} \frac{S_2}{K_m + S_2}$$

Equação 3.84

Simulações da operação deste sistema SOUZA (1993) mostraram que o regime permanente não é atingido, pois há perda da enzima na saída do segundo estágio. Assim, deve-se operar o sistema de modo a minimizar esta perda, acarretando em maior eficiência.

3.2.7. Observações sobre as constantes cinéticas

Alguns dos parâmetros cinéticos empregados, como k_1 , k_2 , Q_m e V_{max} , foram retirados do trabalho de mestrado de SOUZA (1993), obtidos a partir do tratamento de dados gerados em laboratório. Outros, como o K_m , foram retirados de MARTINEZ-ESPÍNDOLA e LOPES-MUNGUÍA (1985).

Os parâmetros cinéticos são dependentes de pH, temperatura e concentração de sais e, portanto considerados constantes em primeira instância. Os valores empregados foram:

- Capacidade máxima de adsorção: $Q_m = 519,751 \text{ g.l}^{-1}$
- Constantes cinéticas das reações de adsorção e dessorção: $k_1 = 426,6 \text{ l.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, $k_2 = 212,22 \text{ h}^{-1}$, $k_3 = 10^3 \text{ h}^{-1}$
- Constante de Michaelis-Menten: $K_m = 5,12 \text{ g.l}^{-1}$
- Velocidade máxima da reação enzimática: $V_{\max} = K \cdot C = 186,98 \cdot C$ (em $\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Não são consideradas a presença de eluente e sua influência sobre os parâmetros cinéticos da reação enzimática.

Condições iniciais para resolução do Runge Kutta de quarta ordem: $E_1=E_0$, $Q_1=0$, $S_1=S_0$, $E_2=0$, $Q_2=0$ e $S_2=0$.

Este modelo foi implementado no Bio-PSA, maiores detalhes sobre a funcionalidade são encontrados no capítulo 5.

3.2.8. Rendimento e Produtividade

A Equação 3.85 e Equação 3.86 mostram as relações para cálculo do rendimento e da produtividade do sistema.

$$REND = \frac{S_0 - S_2}{S_0} \cdot 100 \quad \text{Equação 3.85}$$

$$PROD = (S_0 - S_2) \cdot \frac{(F_1 + F_2)}{(V_{l1} + V_{l2})} \cdot \epsilon \quad \text{Equação 3.86}$$

3.3. PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS UTILIZANDO O PROCESSO CARE

3.3.1. Introdução

No item 3.2.2 foi explanado o modelo CARE. RIBAS (1999) adaptou o modelo CARE para ser utilizado na purificação de proteínas. Seguem-se nos próximos tópicos os sistemas propostos por RIBAS (1999) e que foram implementados no software Bio-PSA. Os sistemas são:

- Sistema CARE com dois estágios
- Sistema CARE modificado de três estágios
- Sistema CARE modificado de dois estágios com eluição em reator pistonado
- Sistema CARE modificado de três estágios com eluição em reator pistonado

3.3.2. Sistema CARE com dois estágios (CARE2)

O sistema (Figura 3.8) é constituído de tanques de mistura, perfeitamente agitados, que dispõem de uma membrana que permite a passagem das macromoléculas, mas não a passagem da matriz. A alimentação da solução a ser purificada é feita no primeiro tanque, onde ocorre a adsorção da enzima ao ligante acoplado covalentemente à matriz, e os contaminantes são eliminados após permearem através da membrana de ultrafiltração. As enzimas que não adsorveram e estão na fase líquida também são eliminados através da membrana. O estágio intermediário de lavagem é semelhante ao estágio inicial de adsorção. No último tanque é feita a dessorção da enzima, promovida por uma mudança no pH. A enzima após a dessorção permeia através da membrana enquanto que a matriz é recirculada para o primeiro tanque.

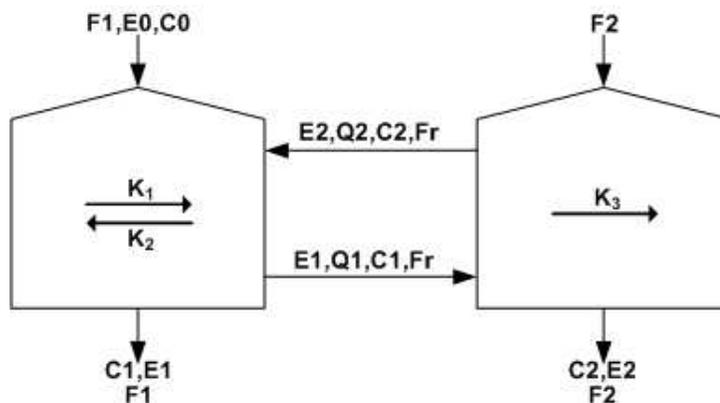


Figura 3.8: Representação esquemática do sistema CARE com 2 estágios.

Balço de massa no estágio 1:

$$\frac{dE_1}{dt} = \frac{F_1}{V \cdot \varepsilon} (E_0 - E_1) + \frac{FR}{V} (E_2 - E_1) - [k_1 E_1 \cdot (Q_m - Q_1) - k_2 Q_1] \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) \quad \text{Equação 3.87}$$

$$\frac{dQ_1}{dt} = \frac{FR}{V} (Q_2 - Q_1) + [k_1 E_1 (Q_m - Q_1) - k_2 Q_1] \quad \text{Equação 3.88}$$

$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{F_1}{V \cdot \varepsilon} (C_0 - C_1) + \frac{FR}{V} (C_2 - C_1) \quad \text{Equação 3.89}$$

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{F_1}{V \cdot \varepsilon} (S_0 - S_1) + \frac{FR}{V} (S_2 - S_1) \quad \text{Equação 3.90}$$

Balço de massa no estágio 2:

$$\frac{dE_2}{dt} = \frac{F_2}{V \cdot \varepsilon} (-E_2) + \frac{FR}{V} (E_1 - E_2) + [k_3 Q_2] \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) \quad \text{Equação 3.91}$$

$$\frac{dQ_2}{dt} = \frac{FR}{V} (Q_1 - Q_2) - [k_3 Q_2] \quad \text{Equação 3.92}$$

$$\frac{dC_2}{dt} = \frac{F_2}{V \cdot \varepsilon} (-C_2) + \frac{FR}{V} (C_1 - C_2) \quad \text{Equação 3.93}$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{F_2}{V \cdot \varepsilon} (-S_2) + \frac{FR}{V} (S_1 - S_2) \quad \text{Equação 3.94}$$

A fração líquida do meio é definida como:

$$\varepsilon = \frac{Vl}{Vl + Vs} \quad \text{Equação 3.95}$$

3.3.3. Sistema CARE modificado de três estágios (CARE3)

É incluído um estágio intermediário de lavagem semelhante ao estágio de adsorção como descrito na Figura 3.9.

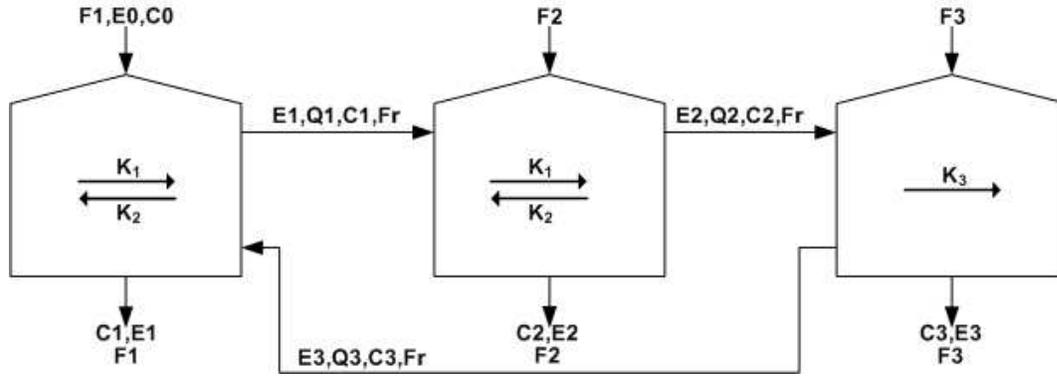


Figura 3.9: Representação esquemática do sistema CARE com 3 estágios.

Balço de massa no estágio 1:

$$\frac{dE_1}{dt} = \frac{F_1}{V \cdot \varepsilon} (E_0 - E_1) + \frac{F_R}{V} (E_3 - E_1) - [k_1 E_1 \cdot (Q_m - Q_1) - k_2 Q_1] \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) \quad \text{Equação 3.96}$$

$$\frac{dQ_1}{dt} = \frac{F_R}{V} (Q_3 - Q_1) + [k_1 E_1 (Q_m - Q_1) - k_2 Q_1] \quad \text{Equação 3.97}$$

$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{F_1}{V \cdot \varepsilon} (C_0 - C_1) + \frac{F_R}{V} (C_3 - C_1) \quad \text{Equação 3.98}$$

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{F_1}{V \cdot \varepsilon} (S_0 - S_1) + \frac{F_R}{V} (S_3 - S_1) \quad \text{Equação 3.99}$$

Balço de massa no estágio 2:

$$\frac{dE_2}{dt} = \frac{F_2}{V \cdot \varepsilon} (-E_2) + \frac{F_R}{V} (E_1 - E_2) - [k_1 E_2 \cdot (Q_m - Q_2) - k_2 Q_2] \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) \quad \text{Equação 3.100}$$

$$\frac{dQ_2}{dt} = \frac{FR}{V} (Q_1 - Q_2) + [k_1 E_2 (Q_m - Q_2) - k_2 Q_2] \quad \text{Equação 3.101}$$

$$\frac{dC_2}{dt} = \frac{F_2}{V \cdot \varepsilon} (-C_2) + \frac{FR}{V} (C_1 - C_2) \quad \text{Equação 3.102}$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{F_2}{V \cdot \varepsilon} (S_0 - S_2) + \frac{FR}{V} (S_1 - S_2) \quad \text{Equação 3.103}$$

Balço de massa no estágio 3:

$$\frac{dE_3}{dt} = \frac{F_3}{V \cdot \varepsilon} (-E_3) + \frac{FR}{V} (E_2 - E_3) + [k_3 Q_3] \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) \quad \text{Equação 3.104}$$

$$\frac{dQ_3}{dt} = \frac{FR}{V} (Q_2 - Q_3) - [k_3 Q_3] \quad \text{Equação 3.105}$$

$$\frac{dC_3}{dt} = \frac{F_3}{V \cdot \varepsilon} (-C_3) + \frac{FR}{V} (C_2 - C_3) \quad \text{Equação 3.106}$$

$$\frac{dS_3}{dt} = \frac{F_3}{V \cdot \varepsilon} (-S_3) + \frac{FR}{V} (S_2 - S_3) \quad \text{Equação 3.107}$$

3.3.4. Sistema CARE modificado de dois estágios com eluição em reator pistonado (CARE2pfr)

Modificação do reator de lavagem e eluição para um reator de membrana na forma de um duto tubular (Figura 3.10) onde a suspensão flui de forma pistonada ao longo do reator, enquanto os tampões de lavagem e eluição fluem perpendicularmente a membrana promovendo a lavagem e eluição.

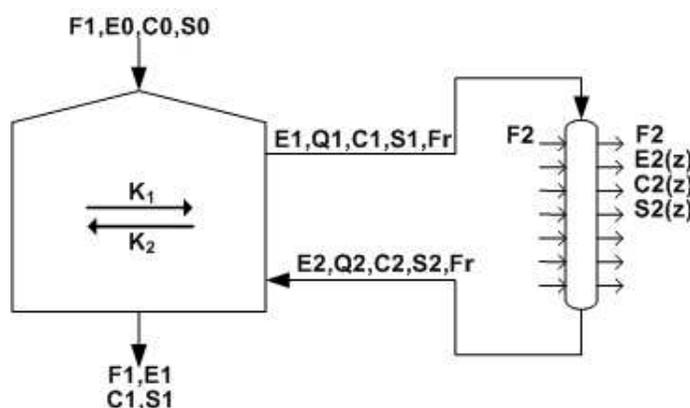


Figura 3.10: Representação esquemática do sistema CARE2pfr.

Balço de massa no estágio 1:

$$\frac{dE_1}{dt} = \frac{F_1}{V \cdot \varepsilon} (E_0 - E_1) + \frac{FR}{V} (E_2|_{z=L} - E_1) - [k_1 E_1 \cdot (Q_m - Q_1) - k_2 Q_1] \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) \quad \text{Equação 3.108}$$

$$\frac{dQ_1}{dt} = \frac{FR}{V} (Q_2|_{z=L} - Q_1) + [k_1 E_1 (Q_m - Q_1) - k_2 Q_1] \quad \text{Equação 3.109}$$

$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{F_1}{V \cdot \varepsilon} (C_0 - C_1) + \frac{FR}{V} (C_2|_{z=L} - C_1) \quad \text{Equação 3.110}$$

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{F_1}{V \cdot \varepsilon} (S_0 - S_1) + \frac{FR}{V} (S_2|_{z=L} - S_1) \quad \text{Equação 3.111}$$

Balço de massa no estágio 2:

$$\frac{\partial E_2}{\partial t} = \frac{F_2}{V \cdot \varepsilon} (-E_2) + \frac{FR}{V} \left(-L \frac{\partial E_2}{\partial z} \right) + [k_3 Q_2] \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) \quad \text{Equação 3.112}$$

$$\frac{dQ_2}{dt} = \frac{FR}{V} \left(-L \frac{dQ_2}{dz} \right) - [k_3 Q_2] \quad \text{Equação 3.113}$$

$$\frac{\partial C_2}{\partial t} = \frac{F_2}{V \cdot \varepsilon} (-C_2) + \frac{FR}{V} \left(-L \frac{\partial C_2}{\partial z} \right) \quad \text{Equação 3.114}$$

$$\frac{\partial S_2}{\partial t} = \frac{F_2}{V \cdot \varepsilon} (-S_2) + \frac{FR}{V} \left(-L \frac{\partial S_2}{\partial z} \right) \quad \text{Equação 3.115}$$

3.3.5. Sistema CARE modificado de três estágios com eluição em reator pistonado (CARE3pfr)

Idem ao anterior com a adição de mais uma etapa com um reator de membrana na forma de um duto tubular conforme mostra a Figura 3.11.

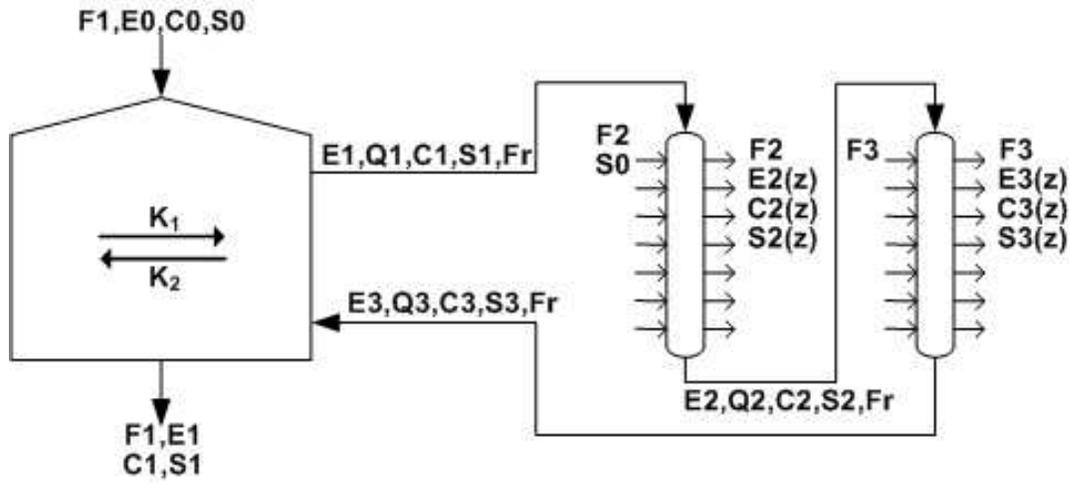


Figura 3.11: Representação esquemática do sistema CARE3pfr.

Balço de massa no estágio 1:

$$\frac{dE_1}{dt} = \frac{F_1}{V \cdot \varepsilon} (E_0) + \frac{FR}{V} (E_3|_{z=L} - E_1) - [k_1 E_1 \cdot (Q_m - Q_1) - k_2 Q_1] \left[\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right] \quad \text{Equação 3.116}$$

$$\frac{dQ_1}{dt} = \frac{FR}{V} (Q_3|_{z=L} - Q_1) + [k_1 E_1 (Q_m - Q_1) - k_2 Q_1] \quad \text{Equação 3.117}$$

$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{F_1}{V \cdot \varepsilon} (C_0) + \frac{FR}{V} (C_3|_{z=L} - C_1) \quad \text{Equação 3.118}$$

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{F_1}{V \cdot \varepsilon} (S_0 - S_1) + \frac{FR}{V} (S_3|_{z=L} - S_1) \quad \text{Equação 3.119}$$

Balço de massa no estágio 2:

$$\frac{\partial E_2}{\partial t} = \frac{F_2}{V \cdot \varepsilon} (-E_2) + \frac{FR}{V} \left(-L \frac{\partial E_2}{\partial z} \right) - [k_1 E_2 \cdot (Q_m - Q_2) - k_2 Q_2] \left[\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right] \quad \text{Equação 3.120}$$

$$\frac{\partial Q_2}{\partial t} = \frac{FR}{V} \left(-L \frac{\partial Q_2}{\partial z} \right) + [k_1 E_2 (Q_m - Q_2) - k_2 Q_2] \quad \text{Equação 3.121}$$

$$\frac{\partial C_2}{\partial t} = \frac{F_2}{V \cdot \varepsilon} (-C_2) + \frac{FR}{V} \left(-L \frac{\partial C_2}{\partial z} \right) \quad \text{Equação 3.122}$$

$$\frac{\partial S_2}{\partial t} = \frac{F_2}{V \cdot \varepsilon} (S_0 - S_2) + \frac{FR}{V} \left(-L \frac{\partial S_2}{\partial z} \right) \quad \text{Equação 3.123}$$

Balanco de massa no estágio 3:

$$\frac{\partial E_3}{\partial t} = \frac{F_3}{V \cdot \varepsilon} (-E_3) + \frac{FR}{V} \left(-L \frac{\partial E_3}{\partial z} \right) + [k_3 Q_3] \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) \quad \text{Equação 3.124}$$

$$\frac{\partial Q_3}{\partial t} = \frac{FR}{V} \left(-L \frac{\partial Q_3}{\partial z} \right) - [k_3 Q_3] \quad \text{Equação 3.125}$$

$$\frac{\partial C_3}{\partial t} = \frac{F_3}{V \cdot \varepsilon} (-C_3) + \frac{FR}{V} \left(-L \frac{\partial C_3}{\partial z} \right) \quad \text{Equação 3.126}$$

$$\frac{\partial S_3}{\partial t} = \frac{F_3}{V \cdot \varepsilon} (-S_3) + \frac{FR}{V} \left(-L \frac{\partial S_3}{\partial z} \right) \quad \text{Equação 3.127}$$

Para cada caso de estudo avaliou-se o rendimento (REND), o fator de purificação (FP) e a produtividade (PROD) definidas pelas seguintes fórmulas:

$$REND = 100 \cdot \frac{F_f \cdot E_f}{F_1 \cdot E_0} \quad \text{Equação 3.128}$$

$$PROD = F_f \cdot E_f \quad \text{Equação 3.129}$$

$$FP = \frac{E_f / E_0}{C_f / C_0} \quad \text{Equação 3.130}$$

3.3.6. Lisozima e Lipase

Duas proteínas estão incluídas para purificação: Lisozima e Lipase.

CHASE (1984a,b) e COWAN et al. (1986) estudaram os parâmetros da lisozima adsorvida em Cibracom-Blue. Os parâmetros cinéticos k_1 , k_2 e k_3 são constantes. K_1 e k_2 se referem a adsorção e k_3 a eluição.

- $K_1 = 10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ litro}$
- $k_2 = 1,80 \text{ h}^{-1}$
- $k_3 = 10^3 \text{ h}^{-1}$
- $Q_m = 1,0 \times 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \text{ litro}$

TABOADA (1999) estudou a adsorção de lipase em resina de interação hidrofóbica (Bytil-Sepharose) cuja adsorção é favorecida com o aumento da concentração de cloreto de sódio

(NaCl) e a dessorção é favorecida pela redução da concentração de NaCl presente no meio, Os parâmetros cinéticos (k_1 , k_2 , Q_m) foram então obtidos em função da concentração de NaCl e as diferentes etapas, adsorção, lavagem e eluição puderam ser simuladas computacionalmente em função do teor de sal presente nos tampões utilizados em cada estágio (RIBAS, 1999).

As equações matemáticas que representam a variação dos parâmetros cinéticos em função da concentração de sal, são apresentadas a seguir:

$$Q_m = 13467 \cdot [\text{NaCl}] \cdot \exp(-0,1623[\text{NaCl}]^2 + 1,7477) \quad R^2=0,9596 \quad \text{Equação 3.131}$$

$$k_1 = 0,0001656 + 0,000216[\text{NaCl}] \quad R^2=0,9988 \quad \text{Equação 3.132}$$

$$k_2 = 2,601 - \frac{1,8114[\text{NaCl}]^7}{128,13 + [\text{NaCl}]^7} \quad R^2=0,9869 \quad \text{Equação 3.133}$$

3.3.7. Hipóteses do modelo

- Processo de adsorção é isotérmico;
- Os coeficientes de transferência de massa da enzima são dependentes da concentração de sal (cinética de adsorção de lipase);
- Apenas a enzima é adsorvida pela resina adsorvente enquanto que as impurezas não são: o transporte da biomolécula alvo (enzima) e impurezas através da membrana são desimpedidos (100% de transmissão - exceto nos casos em que a membrana só permite a passagem de tampão e seu conteúdo salino);
- Diâmetro de corte da membrana impede a passagem da resina adsorvente e por isso não há fluxo de enzima adsorvida através da membrana;
- Volume dentro de cada módulo é mantido constante pela igualdade de adição e remoção de tampão;
- A concentração por polarização da molécula ligante na superfície da membrana é desprezível nas condições de operação;

- A porosidade da partícula não está sendo considerada, mas apenas a porosidade do meio.
- Para os sistemas que utilizam tanques de mistura com membranas assume-se que as condições de mistura existentes dentro do tanque são ideais.
- Para os sistemas com reatores de fluxo pistonado, considerou-se fluxo pistonado ideal e apenas a variação das concentrações axiais ao longo do duto tubular.

O capítulo 6 apresenta a explicação do funcionamento do módulo 2 do Bio-PSA onde foram implementados os quatro modelos acima descritos.

3.4. CONCLUSÕES

Os modelos matemáticos utilizados possuem diferentes níveis de complexidade e abrangem os principais processos implementados no software Bio-PSA. Os processos fermentativos para produção de etanol possuem cinética para o microrganismo *Saccharomyces cerevisiae*. O processo com quatro reatores em série e reciclo foi validado industrialmente e o extrativo é baseado neste. O processo de produção de dextrana e as configurações elaboradas para purificação de proteínas são baseadas no processo CARE. Todos os modelos foram extraídos de trabalhos estudados e analisados pela literatura sugerida, sendo sua utilização justificada no software Bio-PSA.

CAPÍTULO 4

4 . INTRODUÇÃO AO SOFTWARE BIO-PSA

Prefácio

O objetivo deste capítulo é apresentar uma introdução do software Bio-PSA desenvolvido neste trabalho. O item 4.1 relata as características básicas do software e sua forma de construção com a descrição de cada módulo. São apresentadas também as caixas de diálogo (CxDlg) que interagem com o usuário ao se inicializar o software. O Bio-PSA conta com um sistema de ajuda ao usuário que será mostrado no item 4.3.

4.1. INTRODUÇÃO

O Bio-PSA, (*BioProcess Simulation Assistant*), é um software constituído de quatro módulos cuja função é atuar como um assistente, auxiliando na simulação de Bioprocessos. Nesta primeira versão que será apresentada nos próximos capítulos procurou-se focar a construção dos módulos e criar a base para o seu aperfeiçoamento em futuras versões. Novos processos e base de dados poderão ser acrescentados de

modo a criar um software didático e também com aplicações industriais através do uso separado de cada módulo.

Para construção do software utilizaram-se os seguintes softwares:

- Compilador Borland Delphi Professional 6.0, da Borland Software Corporation.
- Compilador Compaq Visual Fortran Professional Edition 6.6, da Compaq Visual Corporation.
- HTML Help, da Microsoft.
- Biblioteca Expert SINTA. Laboratório de Inteligência Artificial (LIA), Departamento de Computação, Universidade Federal do Ceará (UFC).

As partes relativas ao cálculo matemático dos modelos apresentados no capítulo 3 e das R.N.As foram realizadas com o compilador FORTRAN. As demais partes do software como interfaces, chamadas e o Sistema Especialista foram desenvolvidas em Delphi.

O Delphi é um ambiente de desenvolvimento de softwares, orientado a objeto, que permite o desenvolvimento de complexos softwares baseados no MS Windows com o mínimo de codificação. Ele é baseado na linguagem Pascal, ou mais especificamente, em Object Pascal, que é um variante da linguagem Pascal da Borland orientada a objetos. O Delphi permite a utilização de um conjunto de componentes e fornece códigos gerados "automaticamente" que agilizam o processo de desenvolvimento aumentando a produtividade. Utiliza um ambiente integrado para o desenvolvimento rápido de aplicações também denominado RAD (*Rapid Application Development*). Assim o programador poderá concentrar seus esforços em outras partes de seus softwares. Para isto o Delphi possui a Biblioteca de Componentes Visuais (*VCL - Visual Component Library*) que consiste de objetos reutilizáveis incluindo, por exemplo, objetos padrão de interface com o usuário, gerenciamento de dados, gráficos e

multimídia, gerenciamento de arquivos e caixa de diálogo padrão.

Maiores detalhes sobre a utilização do HTML Help e Expert SINTA VCL se encontram no item 4.3 e Capítulo 8 respectivamente. Foi utilizada a língua inglesa na interface para facilitar a divulgação internacional do Bio-PSA.

4.2. APRESENTAÇÃO DO BIO-PSA

Visando facilitar o entendimento do Bio-PSA de modo global a Figura 4.1 mostra um fluxograma geral do funcionamento do Bio-PSA. Como já demonstrado o Bio-PSA possui quatro módulos descritos resumidamente abaixo:

- MÓDULO 1: A Simulação de processos biotecnológicos.
- MÓDULO 2: Funcionalidade para simulação de processos para purificação de proteínas.
- MÓDULO 3: Sistema Especialista para auxílio na operação e design de processos biotecnológicos.
- MÓDULO 4: Funcionalidade para treinamento de Redes Neurais Artificiais.

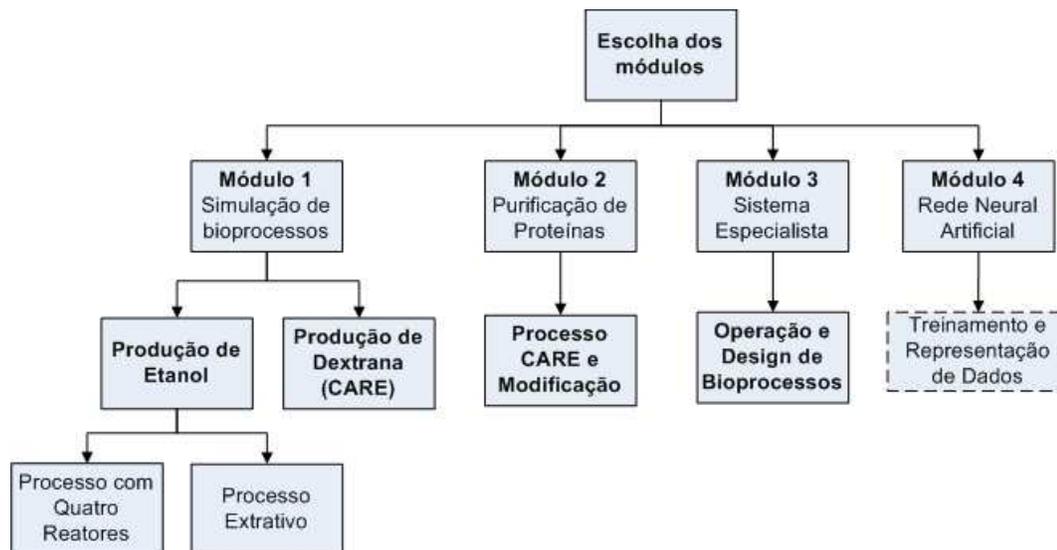


Figura 4.1: Fluxograma geral do funcionamento do Bio-PSA.

A primeira Caixa de diálogo (CxDlg) do Bio-PSA permite ao usuário decidir qual módulo deseja utilizar. No canto inferior esquerdo um botão permite acesso às informações do

sistema. A Figura 4.2 apresenta a cxDlg de abertura e a de informações.



Figura 4.2: Janelas de abertura do Bio-PSA.

O primeiro módulo do Bio-PSA é dedicado à simulação de Bioprocessos pré-existentes. No estágio atual de desenvolvimento possui funcionalidades para simulação de produção de etanol (com os dois processos, mostrados no capítulo 3) e dextrana conforme mostrado na Figura 4.3. Maiores detalhes sobre estas funcionalidades serão apresentados no próximo capítulo.

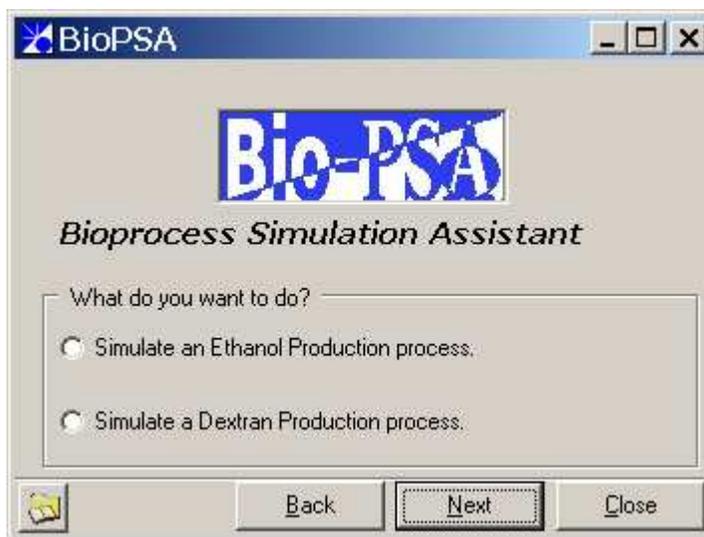


Figura 4.3: Caixa de diálogo inicial do módulo 1.

O módulo 2 tem a finalidade de englobar funcionalidades para simulação de processos para purificação de proteínas. A Figura 4.4 apresenta a CxDlg que dá acesso aos processos de purificação baseados no modelo CARE. No capítulo 3 se encontra a modelagem matemática destes processos e no capítulo 6 a funcionalidade será demonstrada de forma mais detalhada.

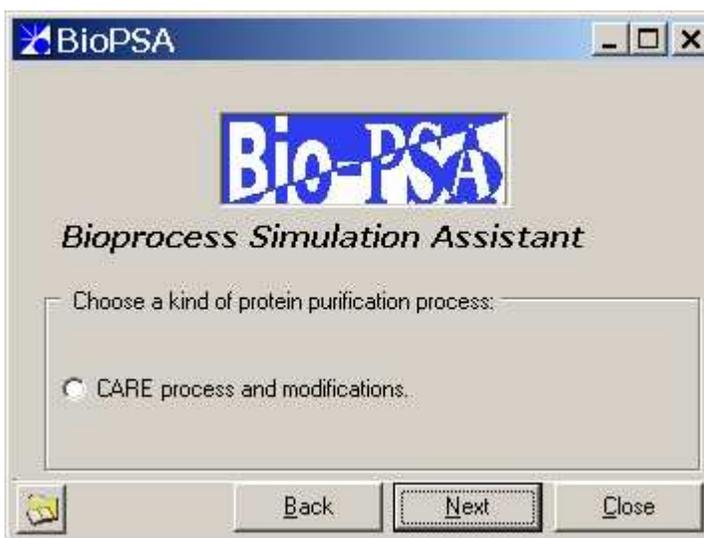


Figura 4.4: Caixa de diálogo inicial do módulo 2.

No terceiro módulo do Bio-PSA é possível a criação e utilização de Sistemas Especialistas. A atual versão do software possui um Sistema Especialista para auxílio no

projeto e design de Bioprocessos. Neste S.E podem ser adicionadas novas regras para seu aperfeiçoamento além da edição das regras existentes através dos dados. Outros S.E relacionados a Bioprocessos podem ser criados em trabalhos futuros e adicionados ao Bio-PSA.

Como a finalidade de se treinar R.N.As para o uso, principalmente, em modelos híbridos foi encorpado ao Bio-PSA a funcionalidade para treinamento de Redes Neurais Artificiais. Esta funcionalidade pode ser acessada diretamente da opção "*Training an Artificial Neural Network*" na CxDlg mostrada na Figura 4.2.

O Bio-PSA possui um sistema de ajuda para cada módulo que será discutido no próximo item.

4.3. DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA DE AJUDA PARA OS MÓDULOS

A grande maioria dos softwares desenvolvidos contém o chamado "*Help*" ou sistema de ajuda, embutidos. Toda a documentação sobre a utilização de ferramentas e conhecimentos teóricos de um software pode ser disponibilizada em um arquivo texto distribuído separadamente ao software, através de formato *post-script* ou *pdf*, por exemplo. No entanto o uso de um sistema de ajuda embutido dá praticidade e agilidade à orientação ao usuário.

Tendo em vista o caráter de instrução do projeto desenvolveu-se, com a utilização do software gratuito HTML Help da Microsoft, um sistema de ajuda para cada módulo desenvolvido. O HTML Help é um ambiente visual para criação de ajuda em HTML ("*Hyper Text Markup Language*" - Linguagem de Marcação de Hipertexto). Todos os arquivos de ajuda da nova geração de softwares da Microsoft utilizam o HTML *Help*.

HTML é uma coleção de estilos que define os vários componentes de um documento *Word Wide Web* (como formatação,

hiperlinks clicáveis, imagens gráficas, documentos multimídia, formulários, etc.). O código-fonte será interpretado, posteriormente, pelo navegador o qual se encarregará de interpretar os comandos ou *tags*, como são usualmente chamados.

Foi desenvolvido um sistema de ajuda básico. Posteriormente poderá se acrescentar procura por índices e uma documentação mais detalhada de todo o software. Uma demonstração deste sistema de ajuda por ser visualizada na Figura 4.5 e na Figura 4.6.

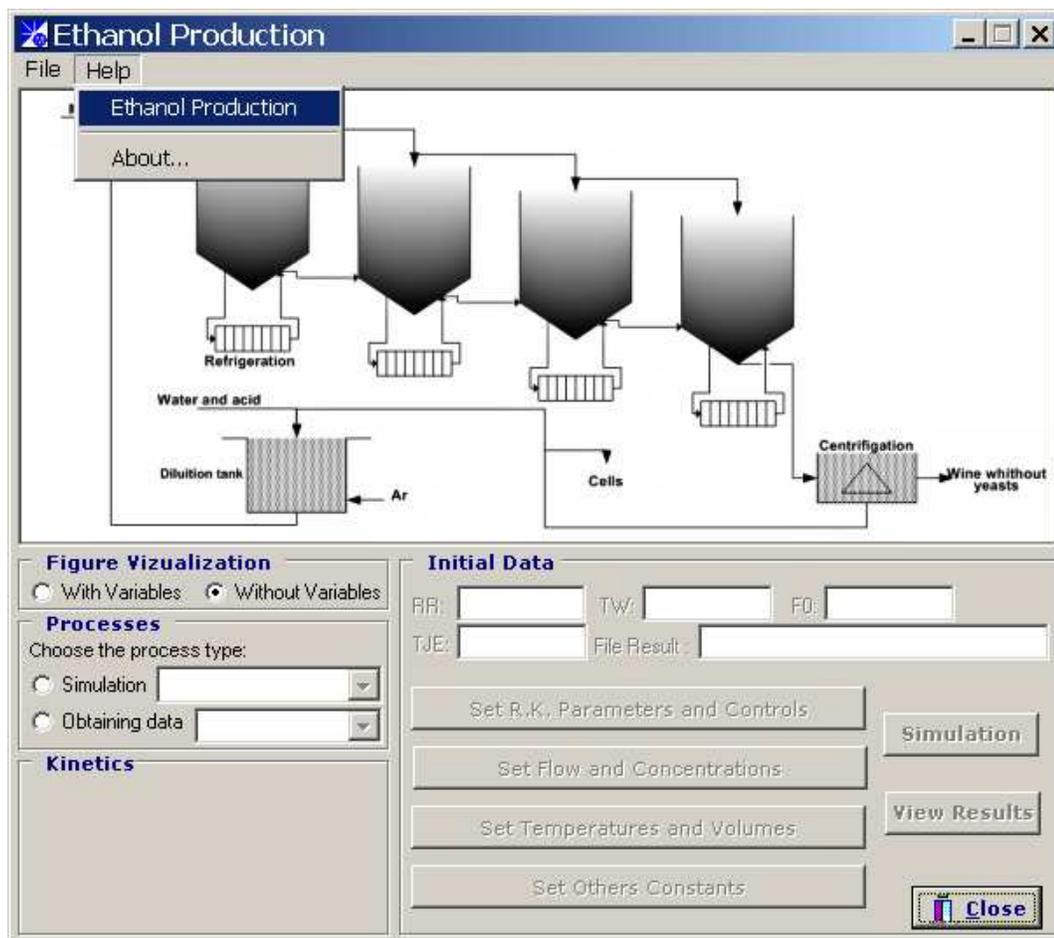


Figura 4.5: Janela principal da funcionalidade produção de etanol- Sistema de Ajuda.

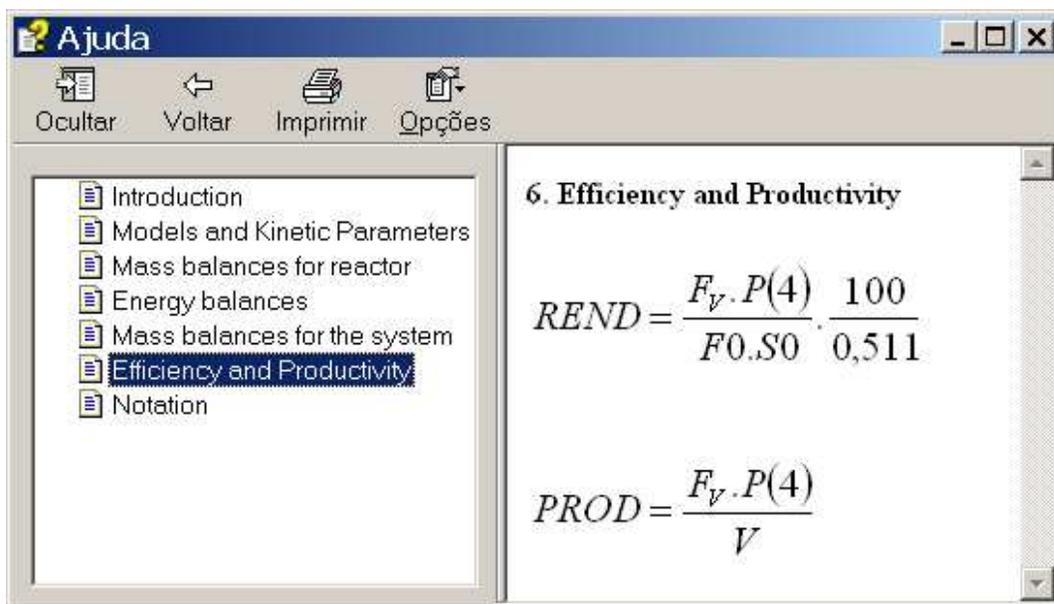


Figura 4.6: Sistema de ajuda da funcionalidade de produção de etanol.

4.4. CONCLUSÕES

Neste capítulo foi apresentada uma introdução sobre o software Bio-PSA desenvolvido, com fluxograma do software e introdução dos módulos. Foi realizada uma demonstração do sistema de ajuda ao usuário e seu modo de criação. Com estas informações iniciais apresenta-se nos próximos capítulos uma visão mais detalhada dos módulos existentes.

CAPÍTULO 5

5. BIO-PSA: MÓDULO 1

SIMULAÇÃO DE BIOPROCESSOS

Prefácio

Na versão atual do Bio-Psa, o módulo dedicado à simulação de Bioprocessos pré-existentes contém três processos. Os dois primeiros são apresentados no item 5.1 e tratam da produção via fermentativa de etanol. Será apresentada uma demonstração de como estas funcionalidades trabalham através de fluxogramas e de CxDlg (Caixas de Diálogo). O item 5.2 é dedicado ao segundo Bioprocessos, a produção de dextrana por um processo semelhante ao CARE. Todos Bioprocessos tiveram seus modelos matemáticos apresentados no capítulo 3. Estas funcionalidades, com exceção do modelo extrativo de produção de etanol, contém também a opção de simulação de modelos híbrido com a utilização de R.N.As na substituição da cinética dos Bioprocessos.

5.1. CASO 1: PRODUÇÃO FERMENTATIVA DE ETANOL

5.1.1. Processo com quatro reatores e reciclo.

5.1.1.1. Introdução e Fluxogramas.



Figura 5.1: Janela de Apresentação. Módulo 1.

A funcionalidade desenvolvida para simulação do primeiro processo fermentativo para produção de etanol (ver apresentação na Figura 5.1) está configurada para a cinética da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. O software simula o processo normal e também um modelo híbrido onde a cinética foi substituída por uma Rede Neural Artificial. O usuário pode treinar uma R.N.A, através do módulo 4, e utilizar os dados de treinamento neste módulo. A funcionalidade permite também:

- Gerar dados para treinamento de uma R.N.A que substitui a cinética. Modelo Híbrido ou caixa cinza;
- Gerar dados para treinamento de uma R.N.A que simula o processo em que as variáveis de entradas são S_0 (Concentração de substrato inicial) e F_0 (Fluxo na entrada do sistema) e as de saídas: $S(4)$, $P(4)$, rendimento e produtividade no final do processo. Modelo tipo caixa preta;
- Gerar dados para treinamento de uma rede dinâmica onde a variável de entrada é F_0 e se saída são

S(4), X(4) e P(4) em cada tempo. Modelo tipo caixa preta.

Maiores detalhes sobre o treinamento deste tipo de R.N.As e discussão de resultados obtidos nestas modelagens e simulações podem ser obtidos em GOUVÊIA (2000) e GOUVÊIA E MACIEL FILHO (2003a).

Os fluxogramas contidos na Figura 5.2, Figura 5.3, Figura 5.4, Figura 5.5 e Figura 5.6 mostram, de forma resumida, a lógica desta funcionalidade do programa em Fortran. O fluxograma geral (Figura 5.2) foi dividido em partes para facilitar a manipulação das imagens. As caixas em tom de cinza são referentes aos fluxogramas contidos nas outras figuras.

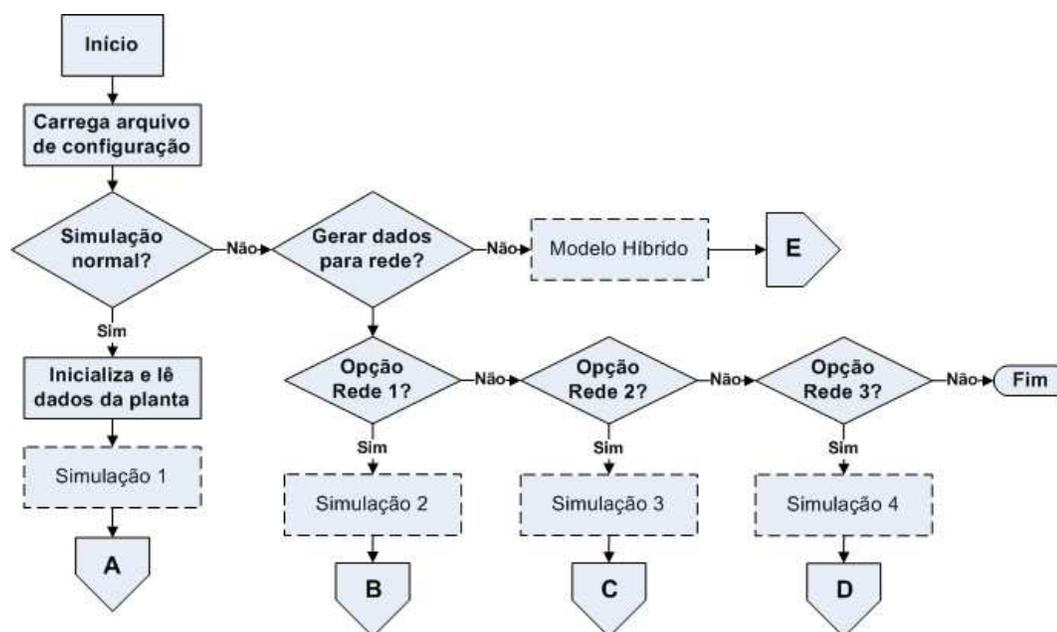


Figura 5.2: Fluxograma geral. Módulo 1:Etanol(1)

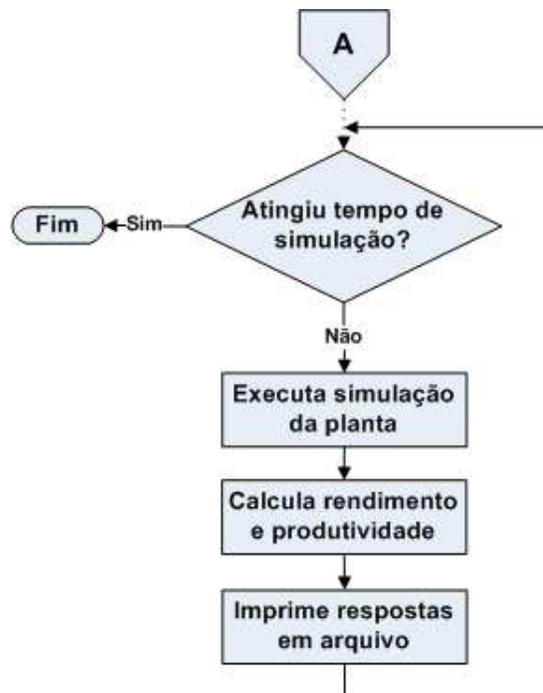


Figura 5.3: Fluxograma: Simulação 1.

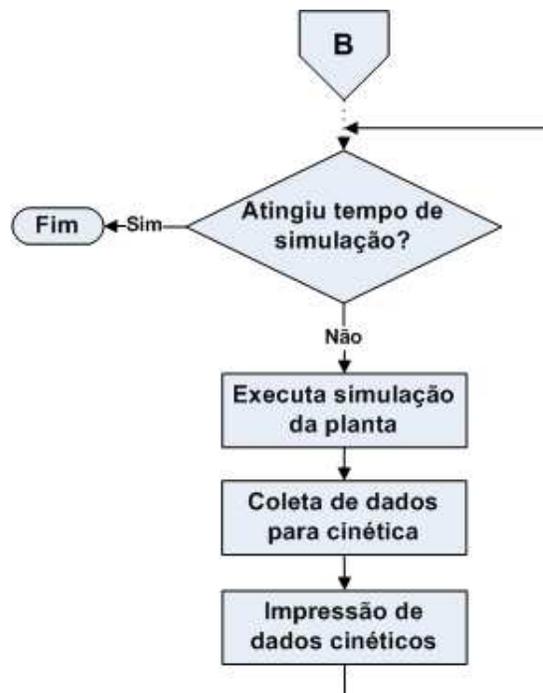


Figura 5.4: Fluxograma. Simulação 2. Módulo 1: Etanol (1)

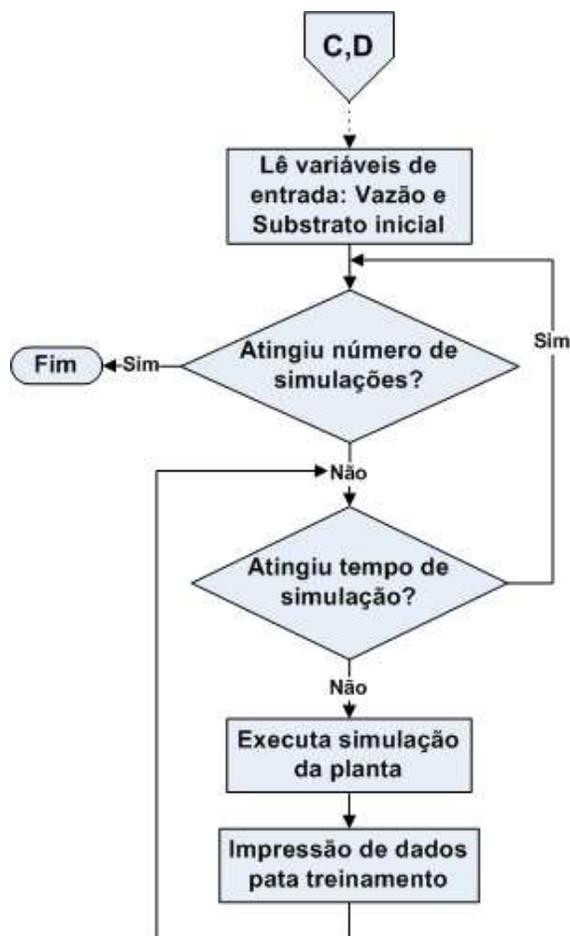


Figura 5.5: Fluxograma. Simulação 3 e 4. Módulo 1: Etanol (1)

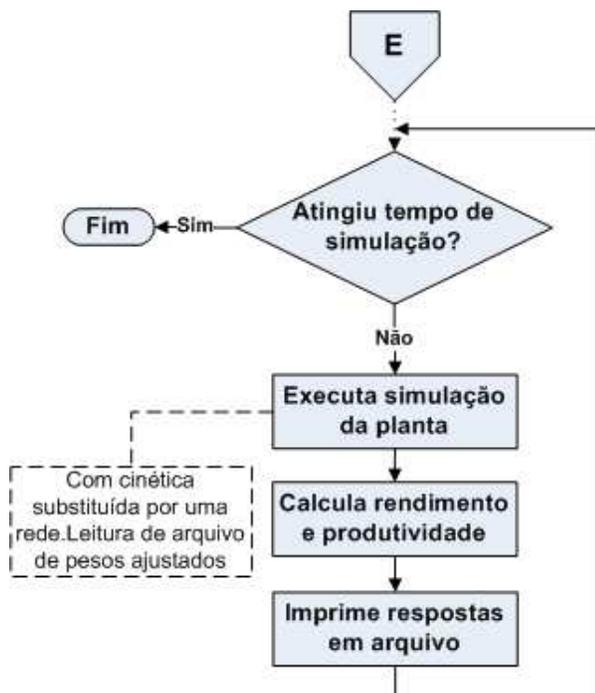


Figura 5.6: Fluxograma. Modelo Híbrido. Módulo 1: Etanol (1)

5.1.1.2. Dados iniciais e simulação.

A Figura 5.7 mostra a janela principal do software para simulação do modelo normal, ou seja, sem uso de R.N.As (Simulação 1). O usuário pode escolher o nome do arquivo de saída dos resultados, sendo o padrão "Simulation.dat". A figura do processo pode ser visualizada com e sem a presença das principais variáveis. Os quatro botões no canto inferior direito permitem acesso a um maior número de variáveis do processo, como mostrado na Figura 5.8.

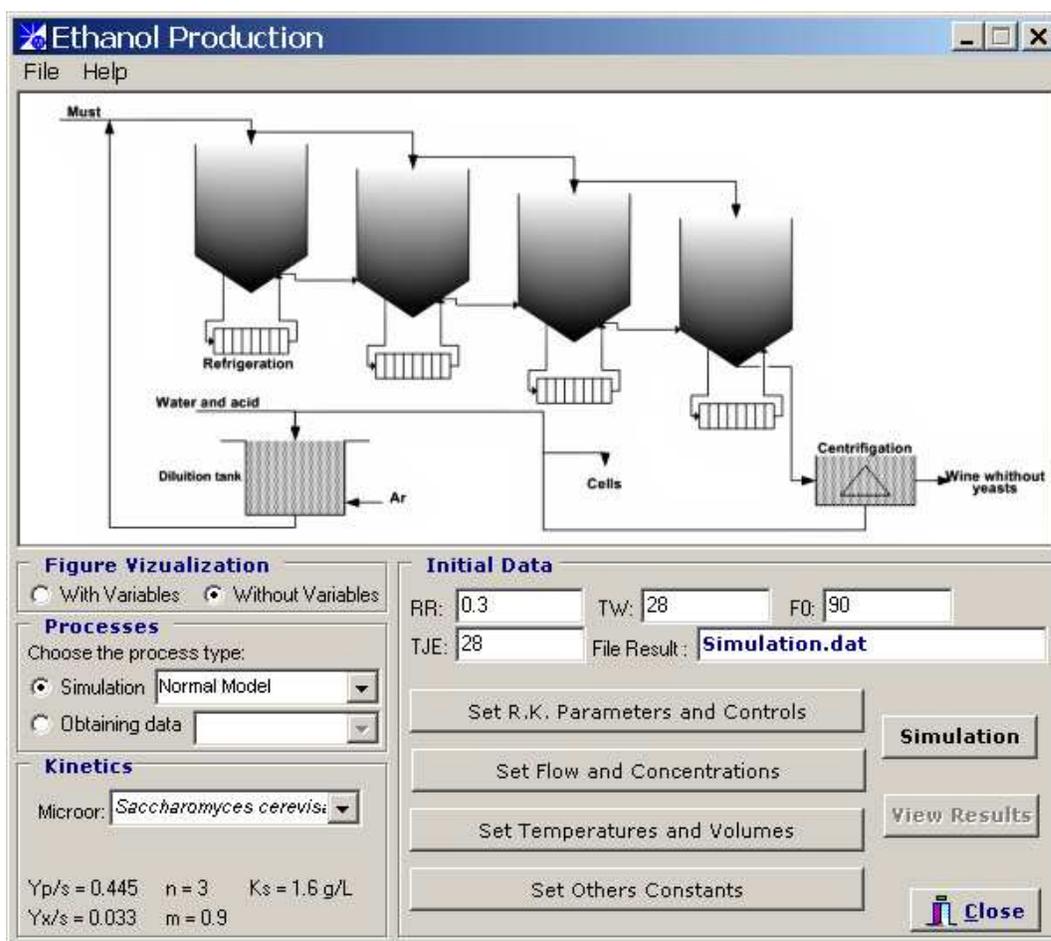


Figura 5.7: Janela principal da funcionalidade de produção de etanol (1). Simulação Normal.

Runge Kutta Parameters and Controls

R.K. Parameters

Simulation Time (h): 20 Step: 0.005
 Initial Time (h): 0.0 Print Interval: 0.20

Flow PI Controller

KCT(1): 20 KCT(3): 10 KCT(i): Proportional gain in reactor i.
 KCT(2): 30 KCT(4): 2 Flow of Cooling fluid.

Cancel OK

Flow and Concentrations Set

Cells Concentrations [g/l] **Substrate Conc. [g/l]**

X(1): 29.382 X(3): 31.002 S(1): 53.927 S(3): 4.8428
 X(2): 30.465 X(4): 31.135 S(2): 21.130 S(4): 0.82438

Product Conc. [g/l] **Flow [m3/h]**

P(1): 41.967 P(3): 63.810 FC(1): 407.72 FC(3): 176.86
 P(2): 56.562 P(4): 65.598 FC(2): 350.09 FC(4): 53.434

Concentrations [g/l] **Cooling Fluid Flow [m3/h]**

Initial Substrate: 180 FJ(1): 407.72 FJmax(1): 800.
 Max. Product: 103. FJ(2): 350.09 FJmax(2): 700.
 XR: 90. FJ(3): 176.86 FJmax(3): 360.
 XL: 180. FJ(4): 53.434 FJmax(4): 120.
 XV: 3.0
 Xmax: 100.

Cancel OK

Temperatures and Volumes Set

Reactor Volume [m3] **Fluid Reagent Volume [m3]**

V(1): 210.34 V(3): 316.663 VC(1): 20 VC(3): 20
 V(2): 268.037 V(4): 208.208 VC(2): 20 VC(4): 20

Cooling Fluid Volume [m3] **Reactor Temperature [°C]**

WJ(1): 20 VJ(3): 20 T(1): 33.5 T(3): 33.5
 WJ(2): 20 VJ(4): 20 T(2): 33.5 T(4): 33.5

Cooling Fluid and Set Control Temperatures [°C] **Reagent Fluid Temp.[°C]**

TJ(1): 30.155 TSET(1): 33.5 TC(1): 31.231
 TJ(2): 30.1088 TSET(2): 33.5 TC(2): 31.28
 TJ(3): 30.0729 TSET(3): 33.5 TC(3): 31.318
 TJ(4): 29.6928 TSET(4): 33.5 TC(4): 31.718

Cancel OK

Others Constants

Constants

Specific heat fo reagent fluid (Cp): 1 [cal.g-1.°C-1]
 Specific heat fo cooling fluid (Cp): 1 [cal.g-1.°C-1]
 Reagent fluid density [Ro]: 950 [Kg.m-3]
 Cooling fluid density [Roi]: 1000 [Kg.m-3]
 Reaction heat: -157.57 [Kcal.Kg-1]

Thermal change Coefficient **Settlement Constants* [°C]**

U(1): 3500. U(3): 3500. A(1): 76.361 A(3): 31.061
 U(2): 3500. U(4): 3500. A(2): 63.242 A(4): 6.869

Units: [Kcal.h-1.°C-1.m-2] * Maximum specific growth rate dependence with the temperature

Cancel OK

Figura 5.8: Caixas de diálogo das variáveis. Módulo 1:Etanol (1)

No modelo híbrido os dados cinéticos são substituídos por uma Rede Neural Artificial com arquivo de pesos ajustados na fase de treinamento da rede (Figura 5.9). No exemplo é utilizado o arquivo de pesos e dados da R.N.As provindos do módulo 3 (Capítulo 7).

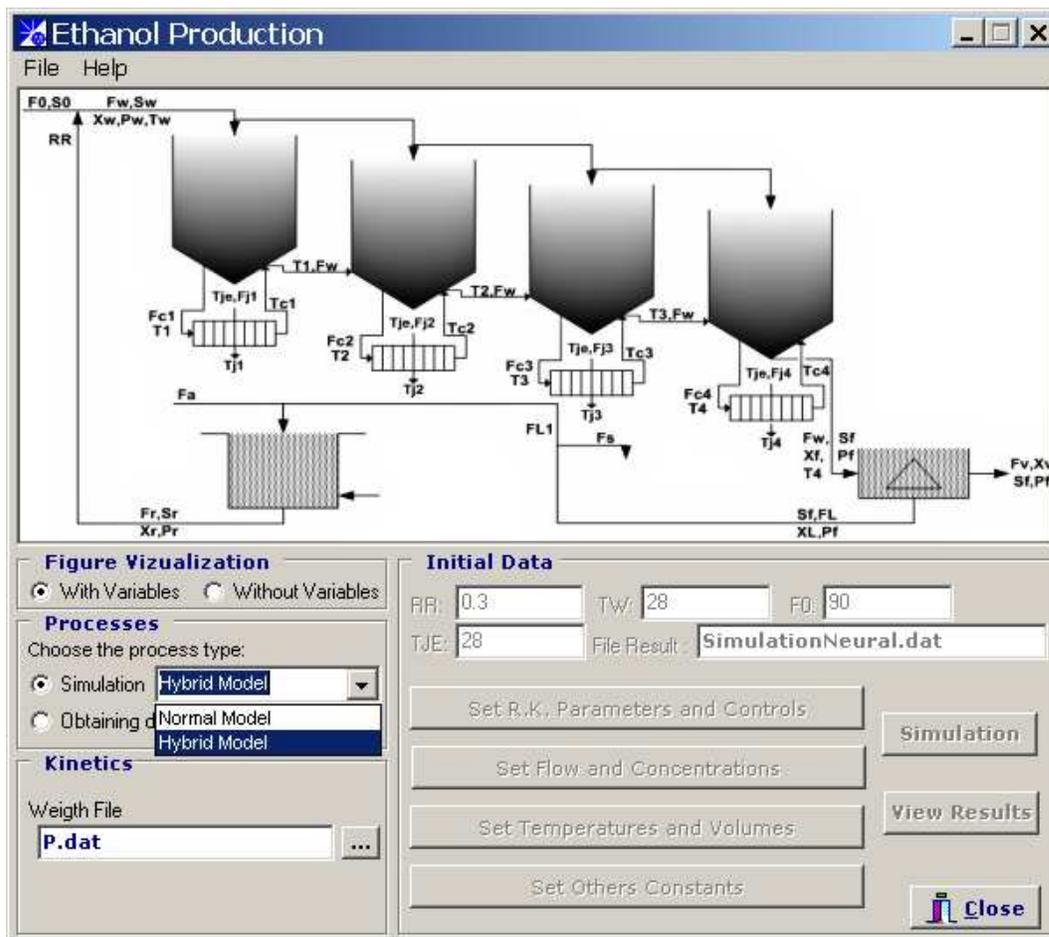


Figura 5.9: Janela principal da funcionalidade de produção de etanol (1). Simulação Híbrida.

Como dito anteriormente é possível também gerar dados para posterior treinamento de R.N.As para serem utilizadas em modelos híbridos ou "Caixa Preta". Esta obtenção de dados é mostrada na Figura 5.10, Figura 5.11 e Figura 5.12. Neste caso não há opção para análise dos resultados.

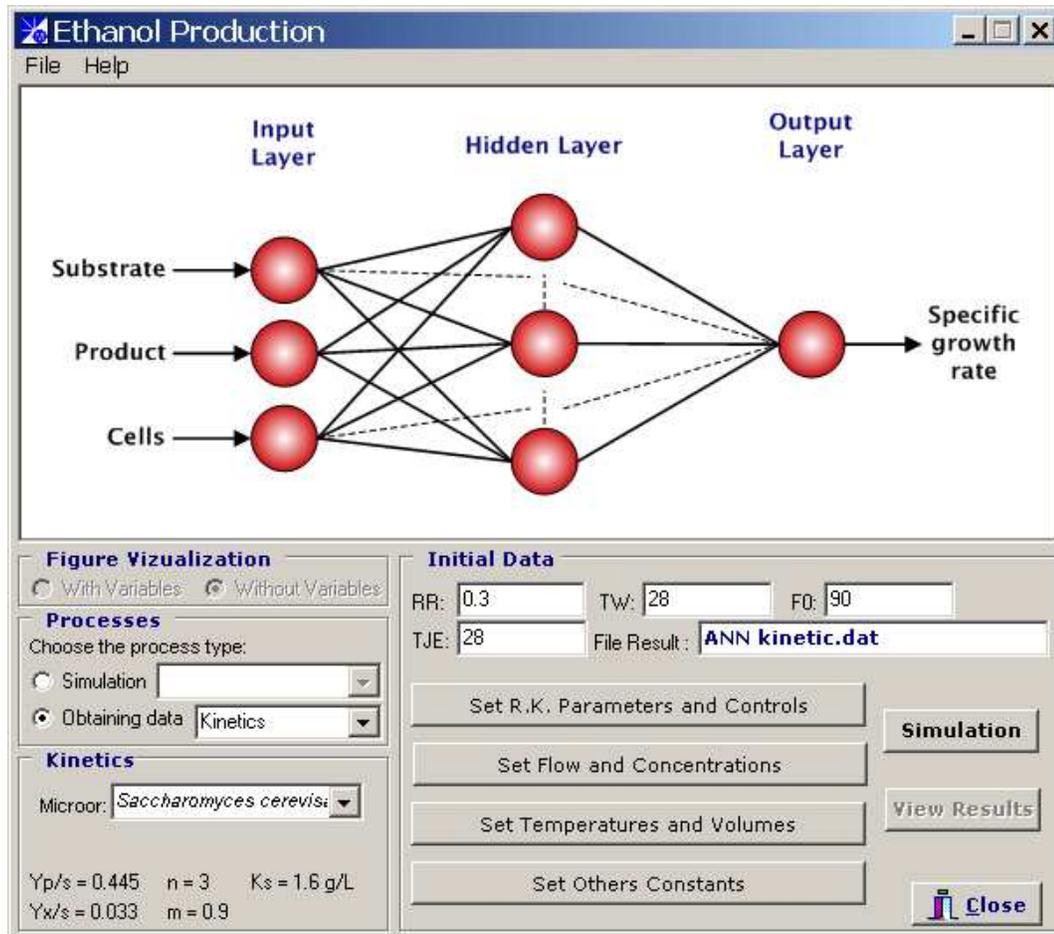


Figura 5.10: Obtenção de dados cinéticos. Módulo 1:Etanol (1)

O arquivo de resultado gerado contém dados da concentração de substrato, células, produtos e a respectiva taxa específica de crescimento. O usuário deverá fazer uma análise dos dados gerados para posterior treinamento seguindo os passos indicados no capítulo 2.

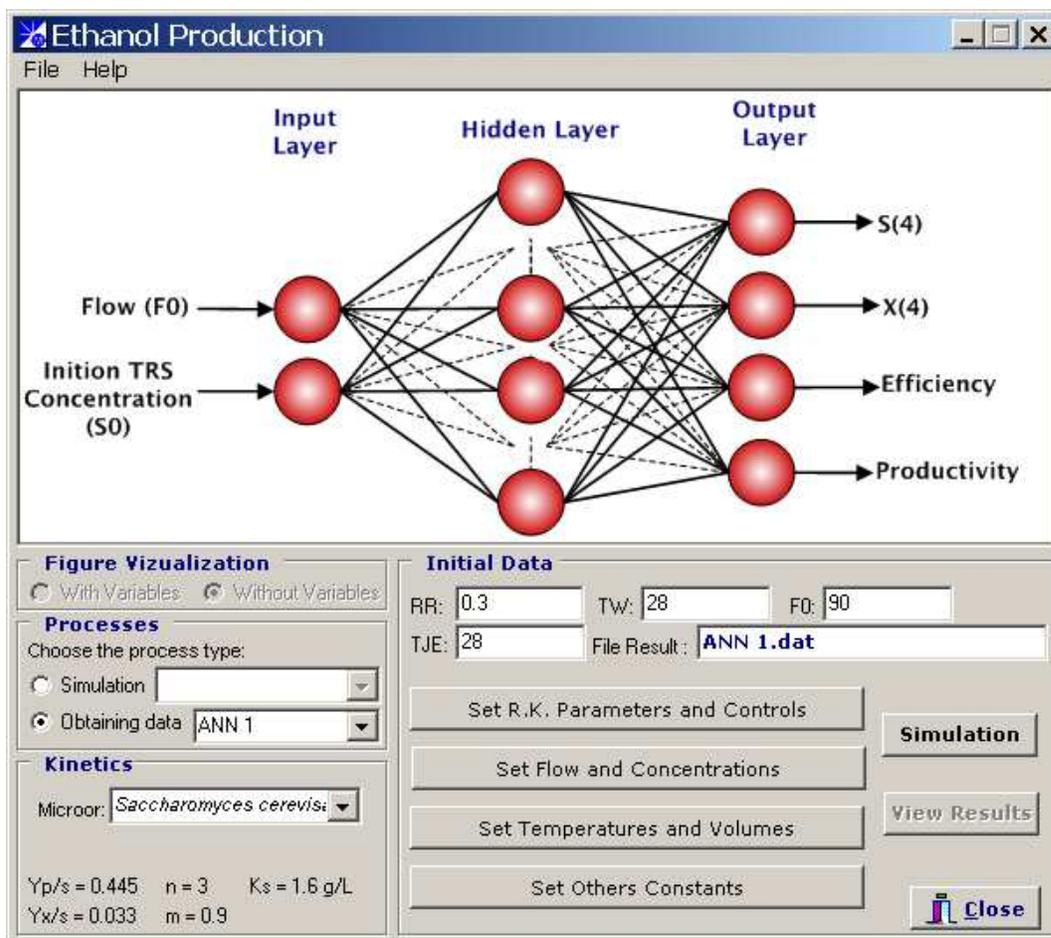


Figura 5.11: Obtenção de dados para R.N.A. Módulo 1:Etanol (1)

Para coleta dos dados da Figura 5.11 o usuário deverá fornecer um arquivo necessariamente denominado "F0S0.dat" contendo os dados, em coluna, do fluxo inicial no processo (F0) e da concentração de substrato inicial (S0). Este arquivo deve estar no mesmo diretório do executável. O arquivo gerado, no exemplo "ANN 1.dat", terá os dados de F0 e S0 seguidos dos valores de S(4), P(4), Rendimento e produtividade dispostos em colunas.

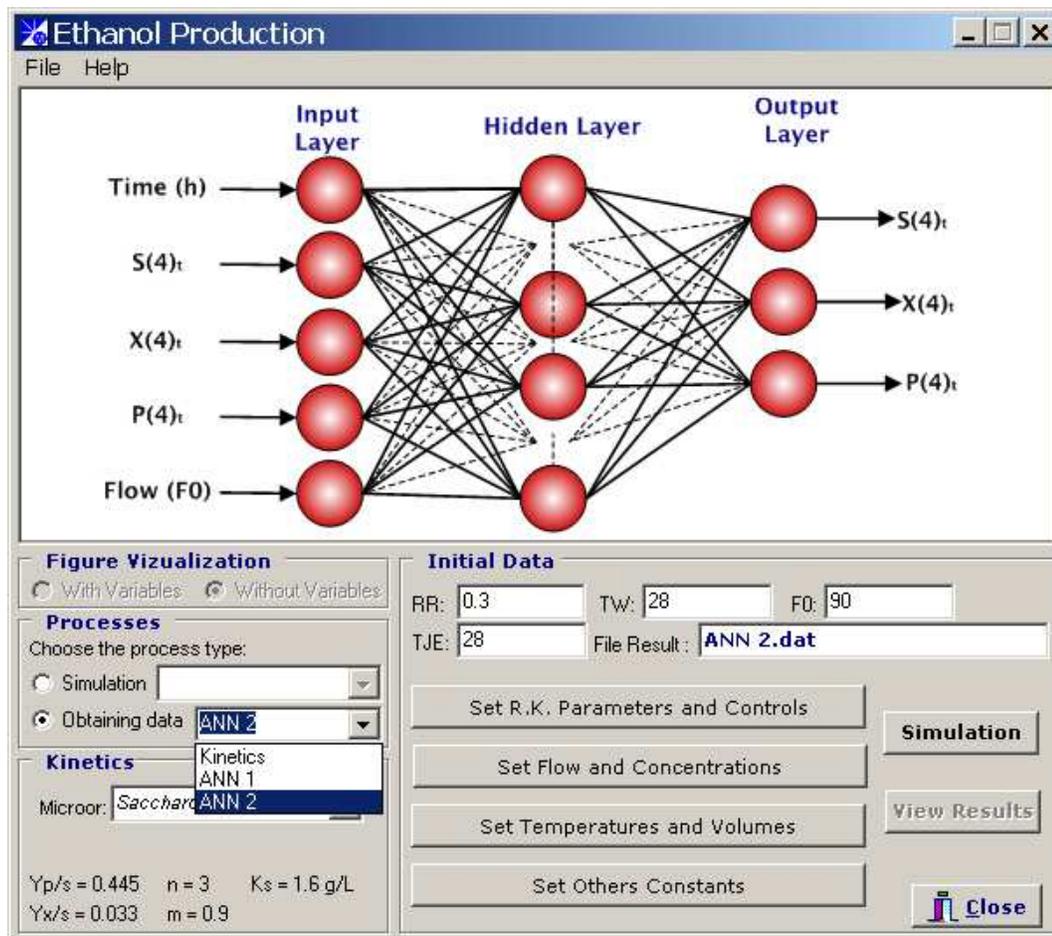


Figura 5.12: Obtenção de dados para R.N.A dinâmica. Módulo 1:Etanol (1)

Para coleta de dados para a rede dinâmica mostrada na Figura 5.12 o usuário deverá fornecer um arquivo chamado "F0.dat" contendo os dados, em coluna, do fluxo inicial no processo (F0). O arquivo gerado "ANN 2.dat", terá os dados de F0 seguidos dos valores de tempo, no instante t , $S(4)_t$, $X(4)_t$, $P(4)_t$, $S(4)_{t+1}$, $X(4)_{t+1}$ e $P(4)_{t+1}$ dispostos em colunas. Novamente deve haver uma análise dos resultados gerados anteriormente ao treinamento. Após a inserção dos dados iniciais e escolha do que se deseja fazer (simular modelos ou gerar dados de treinamento) inicia-se a simulação através do botão "Simulation" no canto inferior direito da tela. A Figura 5.13 mostra a CxDlg para uma simulação com geração de dados. No caso de simulação normal ou híbrida o usuário poderá analisar os resultados através de informações em texto e gráficos conforme será mostrado no próximo item.

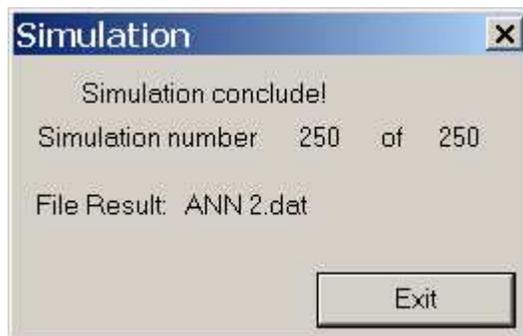


Figura 5.13: Conclusão de geração de dados. Módulo 1:Etanol (1)

5.1.1.3. Resultados

Após a simulação, tanto na modelagem normal como na híbrida, os resultados são mostrados conforme a Figura 5.14 e o usuário escolhe os tipos de gráficos que deseja. Podendo exportá-los ou copiá-los. Bem como utilizar os arquivos em formato texto gerados. A Figura 5.15 contém uma amostra dos gráficos produzidos.

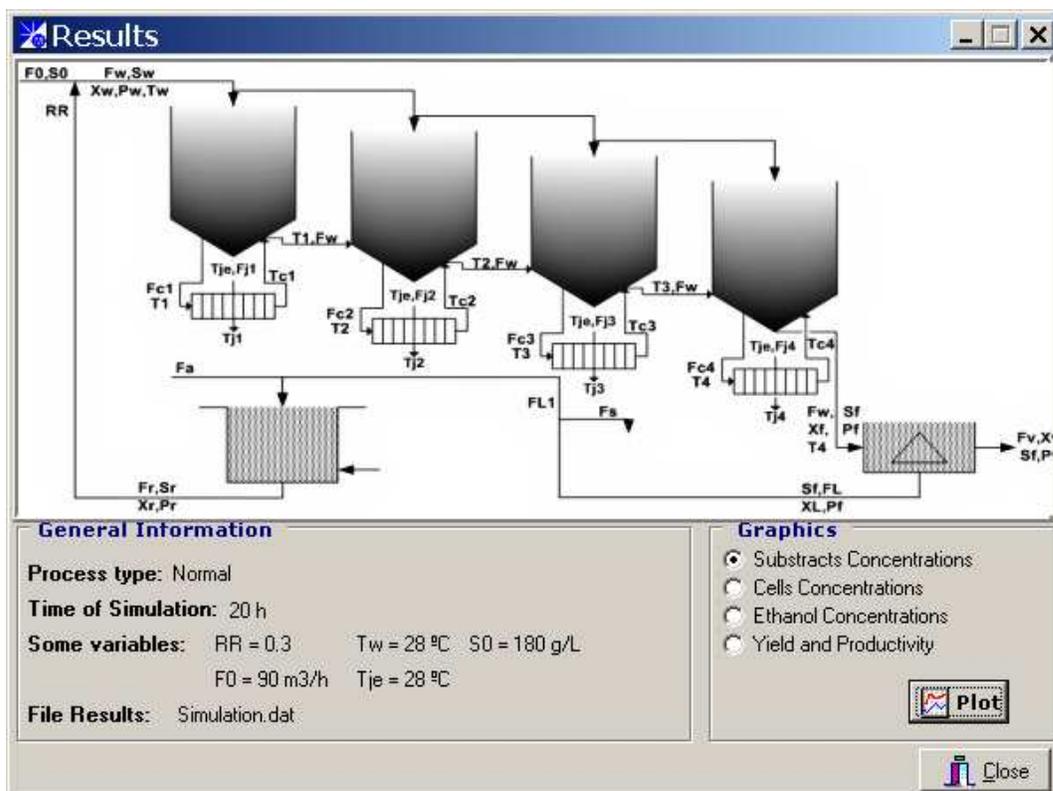


Figura 5.14: Caixa de diálogo dos resultados para simulação normal. Módulo 1:Etanol (1)

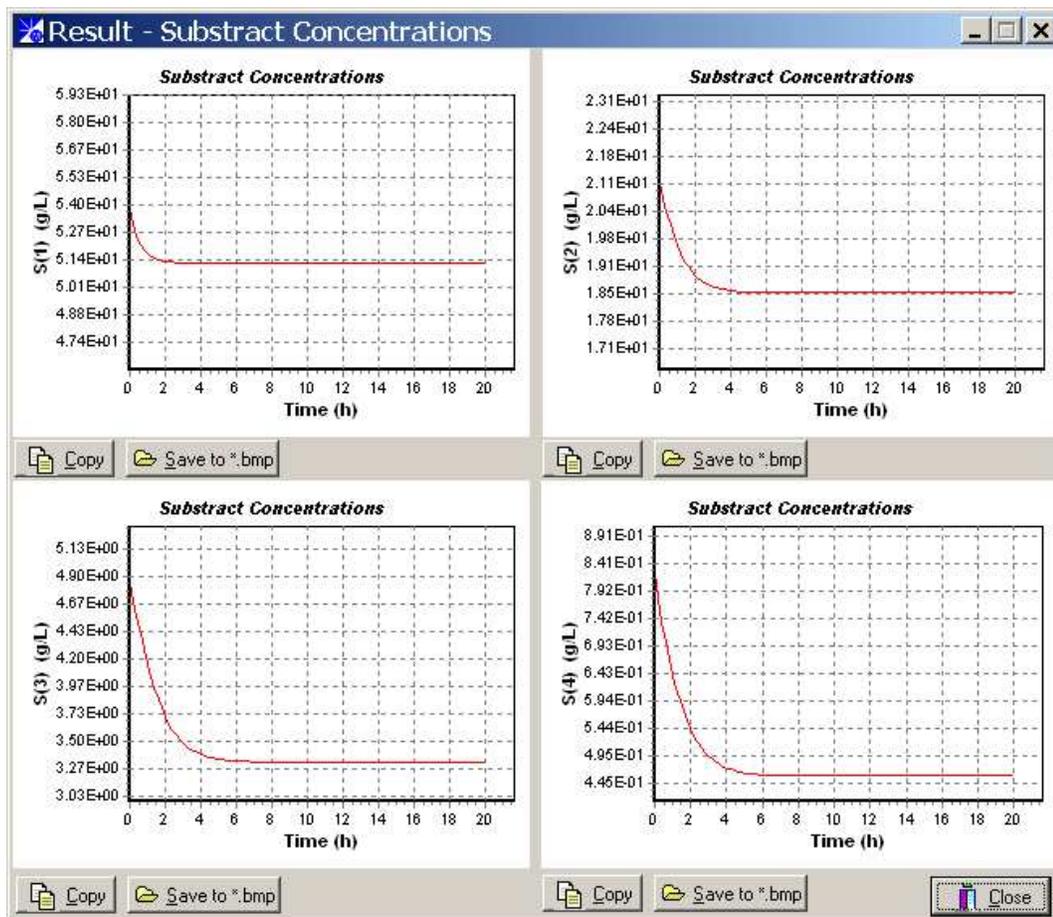


Figura 5.15: Gráficos de resultados para simulação normal.
Módulo 1:Etanol (1)

5.1.2. Processo de Fermentação Alcoólica

Extrativo.

5.1.2.1.Introdução e fluxogramas.

Esta é a segunda funcionalidade para simulação de um processo fermentativo de produção de etanol. A cinética utilizada no estágio atual esta configurada para levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta funcionalidade não trabalha com o modelo híbrido, apenas simulando o modelo determinístico.

A Figura 5.16 apresenta o fluxograma geral para esta funcionalidade do software desenvolvida totalmente utilizando o compilador Delphi.

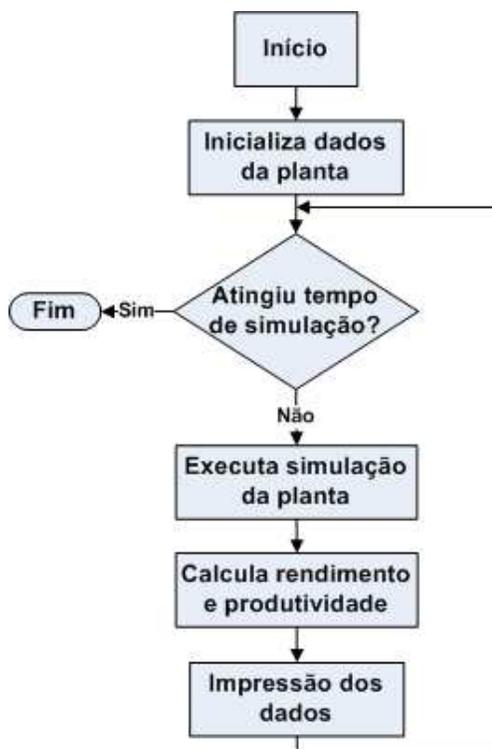


Figura 5.16: Fluxograma da funcionalidade de produção de etanol (2).

5.1.2.2. Dados iniciais e simulação.

A Figura 5.17 mostra a janela principal do software para simulação do modelo normal, sempre com o Flash operando. O usuário pode escolher o nome do arquivo de saída dos resultados, sendo o padrão "Simulation_Extrat.dat". Os dois botões no canto inferior direito permitem acesso a um maior número de variáveis do processo, como mostrado na Figura 5.18.

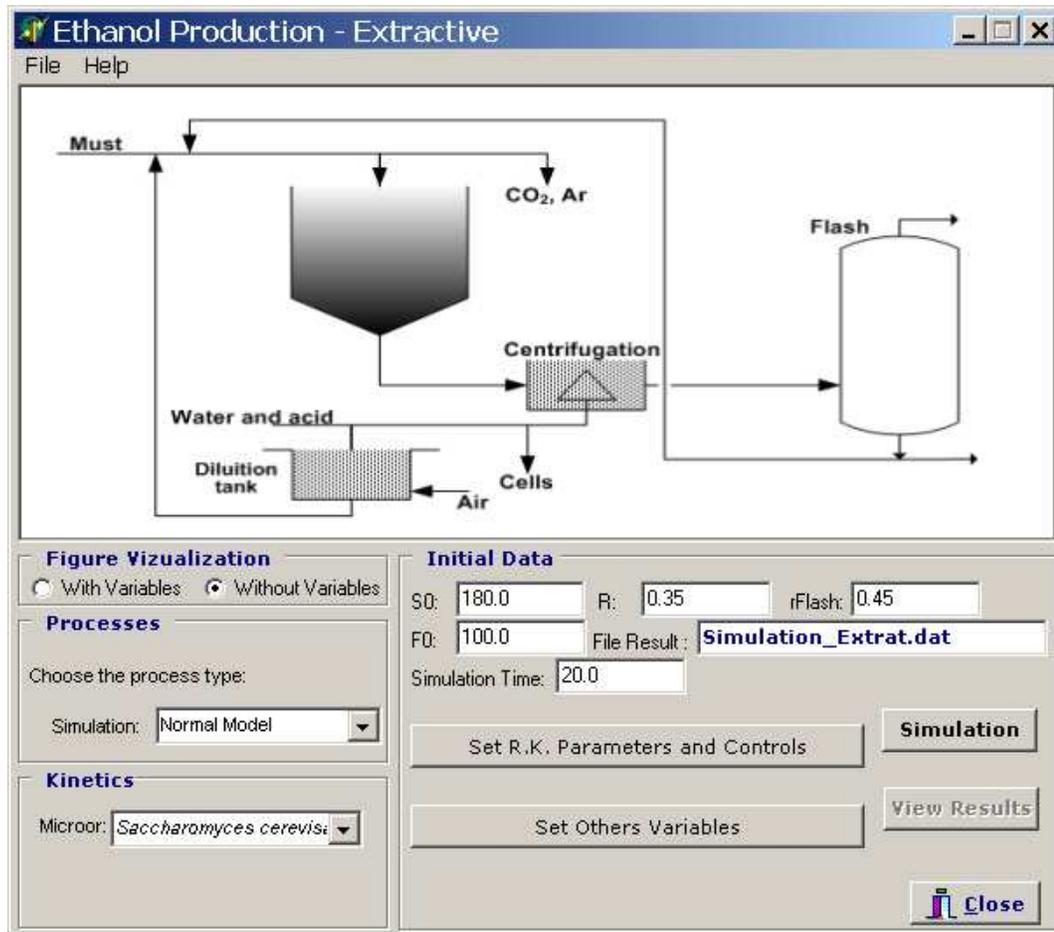


Figura 5.17: Janela principal da funcionalidade de produção de etanol (2).

Constants		
Heat capacity (Cp):	1.0	[Kcal.(Kg.°C)-1]
Density (Ro):	1.0E3	[Kg.m-3]
Reaction heat (H):	51.76	[Kcal.(Kg.ART)-1]
Substrate conc. into the fermentor (S):	1.47	[Kg.m-3]
Reactor volume (V):	383.0	[m3]

Temperatures [°C]		
Into the fermentor (T):	33.1	
In the light phase from centrifuge (TLR):	30.0	
Inlet temperature of the fresh medium (T0):	30.0	
Feed Temperature (TA):	28.0	

Biomass concentration [Kg.m-3]		
Cell recycling concentration (Xr):	90.0	
In the heavy phase from centrifuge (Xc):	180.0	
In the light phase flow rate to flash tank (Xe):	3.0	
Viable biomass concentration into the fermentor (Xv):	34.0	
Dead biomass concentration into the fermentor (Xd):	0.5	

Product concentration [Kg.m3]		
Into the fermentor (P):	39.24	
In the light phase from centrifuge (PLR):	22.6	
In the vapor phase from the flash tank (Pv):	210.30	

Flow rate [m3.h-1]		
Liquid phase recycling (FLR):	107.8288	
Vapor outflow from the vacuum flash tank (Fv):	13.9	
Liquid outflow from the vacuum flash tank (FL):	112.9	

Figura 5.18: Caixa de diálogo de variáveis. Módulo 1:Etanol
(2)

Após a inserção dos dados iniciais inicia-se a simulação através do botão "Simulation" no canto inferior direito da tela. A Figura 5.19 mostra a CxDlg para a simulação. O usuário poderá analisar os resultados através de informações em texto e gráficos conforme será mostrado no próximo item.



Figura 5.19: Conclusão de geração de dados. Módulo 1:Etanol (2)

5.1.2.3. Resultados

Os resultados são mostrados conforme a Figura 5.20 e o usuário escolhe os tipos de gráficos que deseja conforme mostrado na Figura 5.21.

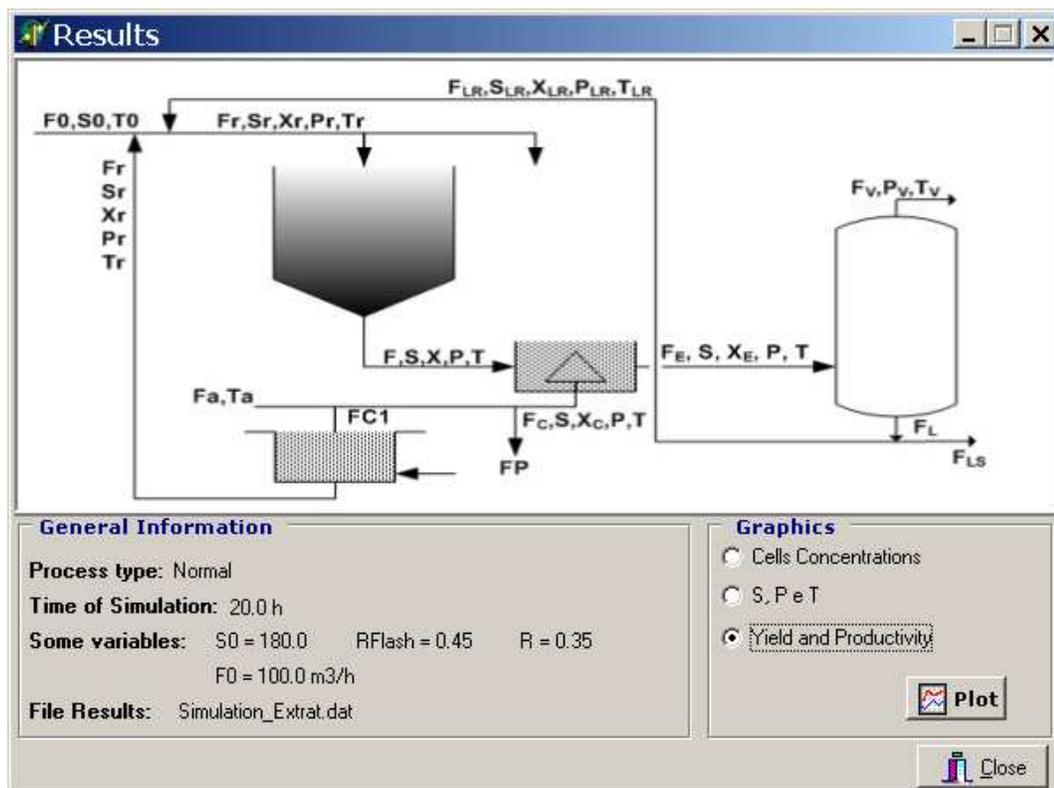


Figura 5.20: Caixa de diálogo dos resultados para simulação normal. Módulo 1:Etanol (2)

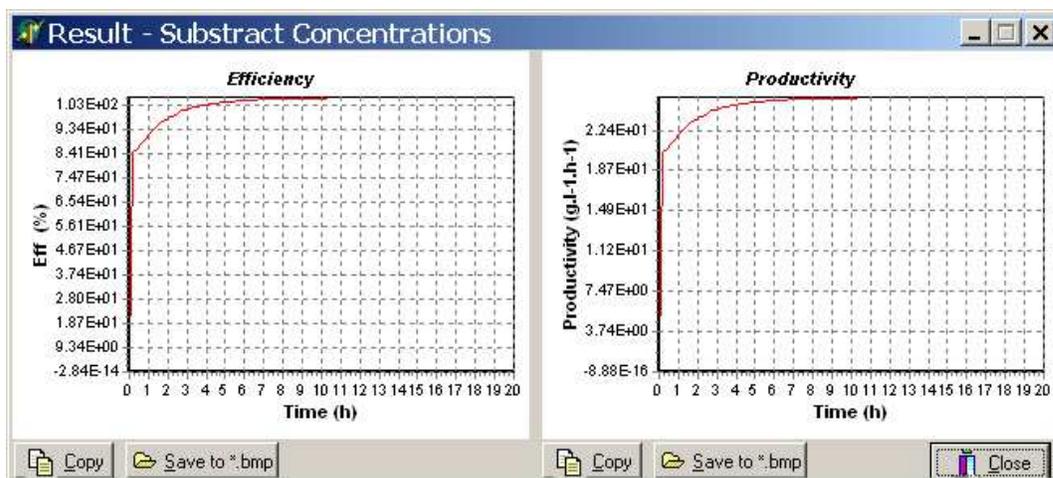


Figura 5.21: Gráficos de resultados para simulação normal.
Módulo 1:Etanol (2)

5.2. CASO 2: PRODUÇÃO DE DEXTRANA

5.2.1. Introdução e Fluxograma.

O processo de produção de dextrana implementado está descrito nos capítulo 2 e 3. Foram inclusos três tipos de controladores P (Proporcional), PI (Proporcional Integral) e PID (Proporcional Integras Derivativos) que dão ao software também um caráter educativo.

O fluxograma do software desenvolvido é similar ao encontrado na Figura 5.2 com opção para simulação normal, híbrida e coleta de dados para treinamento de R.N.As.

5.2.2. Dados iniciais e simulação.

A Figura 5.22 mostra a janela inicial desta funcionalidade.

Assim como na produção de etanol, também é possível a simulação de modelo normal e híbrido além de obtenção de dados para treinamento de R.N.As. A janela principal do software contém o painel "Processes" onde é possível simular ou obter dados para treinamento das R.N.As. A simulação pode ser realizada com o modelo normal (Figura 5.22) ou o híbrido (Figura 5.24). Os botões no canto inferior direito permitem

acesso a outras variáveis e ao sistema de controladores como mostrado na Figura 5.23.

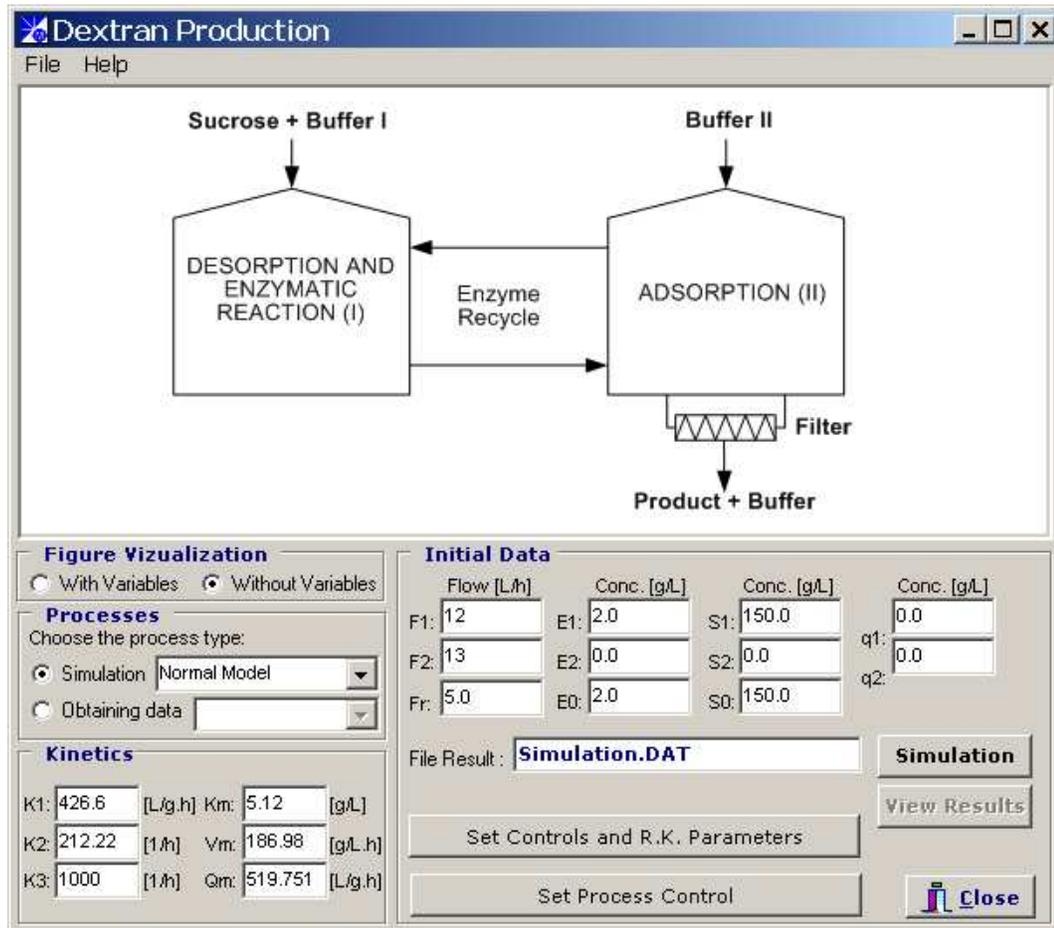


Figura 5.22: Janela principal da funcionalidade para produção de dextrana. Módulo 1:Dextrana.

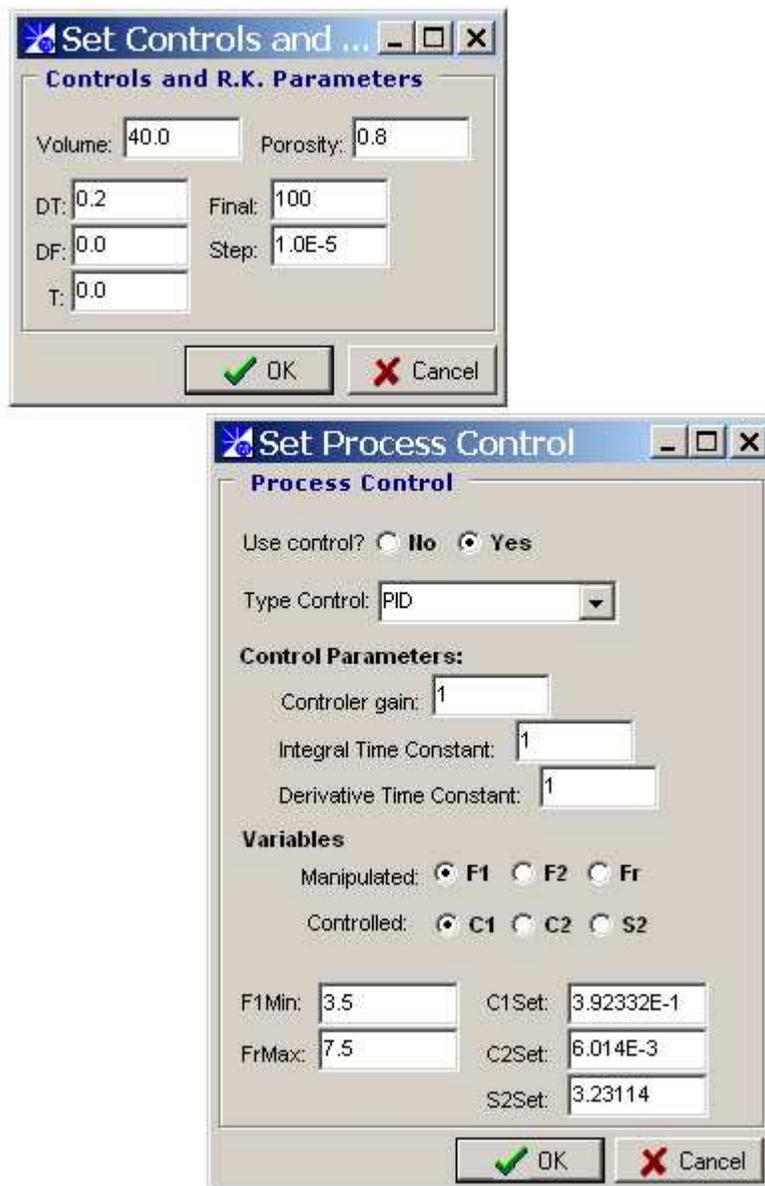


Figura 5.23: Caixas de diálogo das variáveis. Módulo 1:Dextrana

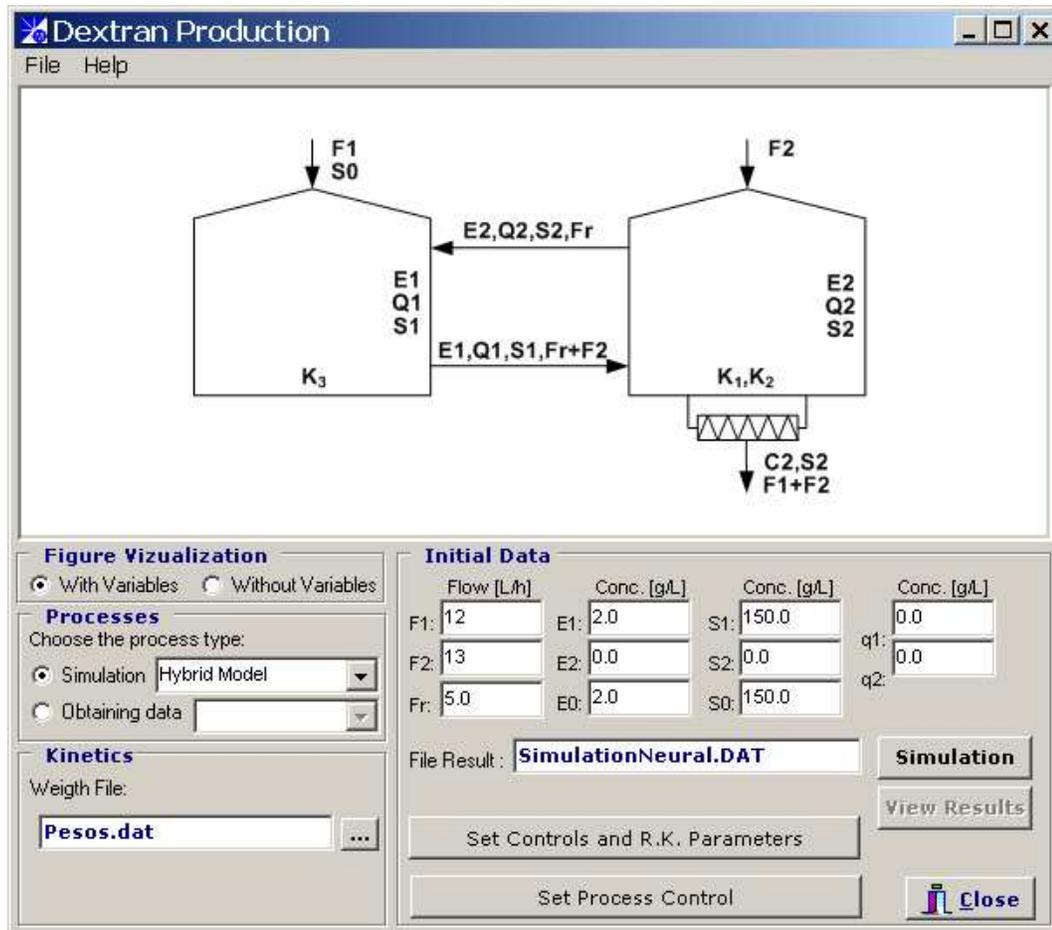


Figura 5.24: Janela principal da funcionalidade de produção de dextrana. Simulação Híbrida.

A função de obtenção de dados habilita o usuário a adquirir dados para treinamento de 3 tipos de Redes Neurais Artificiais conforme mostra a Figura 5.25, Figura 5.26 e Figura 5.27. A Rede Neural Artificial esquematizada na Figura 5.25 é utilizada para formar o modelo híbrido. Uma Rede Neural Artificial tipo "caixa preta" também pode ser treinada com os dados adquiridos. Sua topologia é mostrada na Figura 5.13. A Rede Neural Artificial da Figura 5.14 é chamada de rede dinâmica, pois com sua utilização é possível simular dinamicamente o processo, sendo t o tempo. Em GOUVÊIA et al. (2003b) pode-se encontrar maiores detalhes sobre dados de treinamento do modelo híbrido.

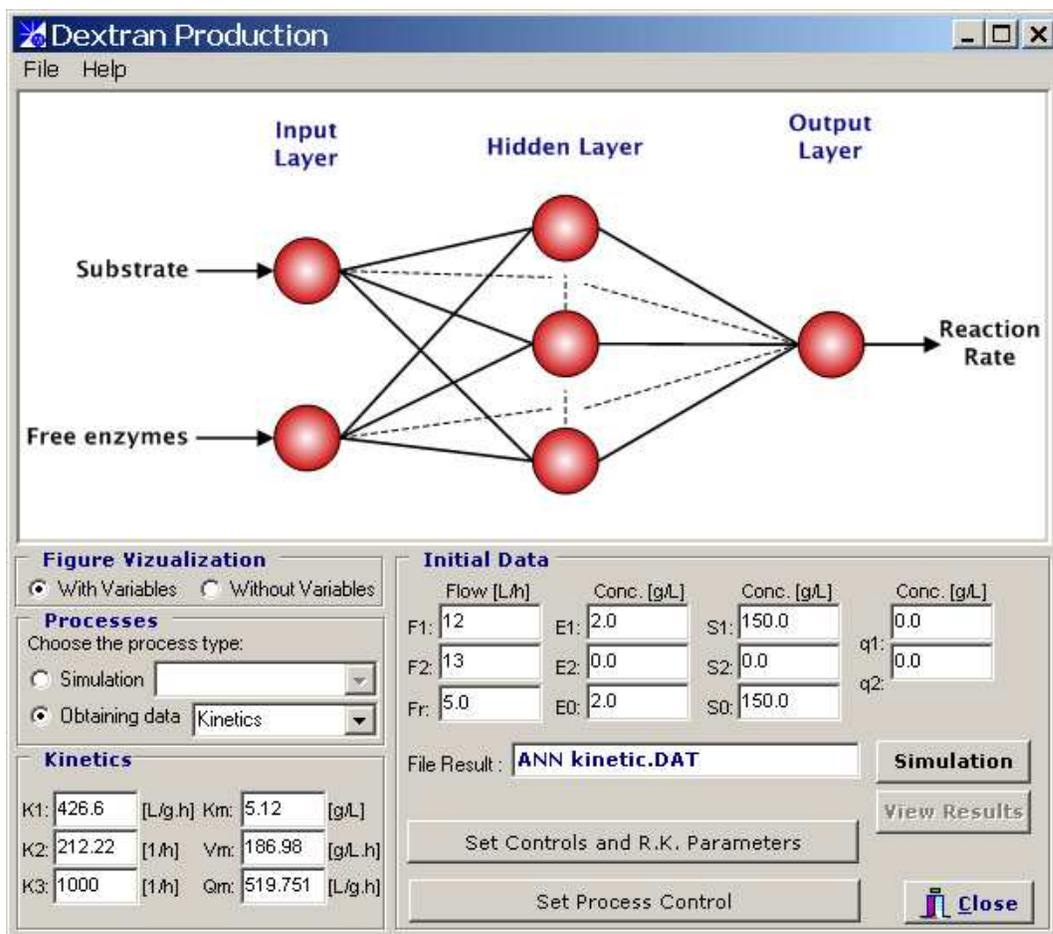


Figura 5.25: Obtenção de dados cinéticos. Módulo 1:Dextrana.

Os dados da concentração de substrato, concentração de enzima livre e taxa de reação são adicionados ao arquivo "ANN Kinetic.dat" conforme mostra a Figura 5.25. Conforme explanado no capítulo 2 todos os dados gerados devem passar por um tratamento antes de ser utilizado no treinamento de R.N.As.

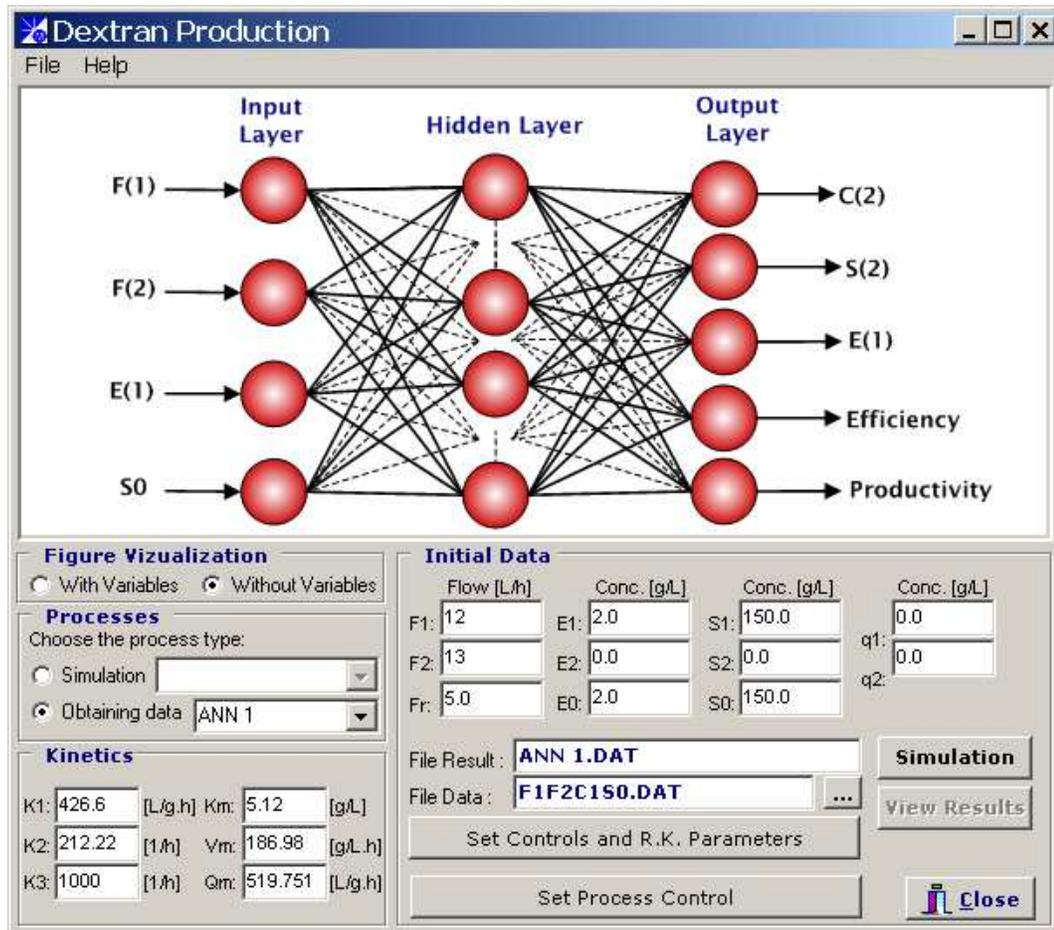


Figura 5.26: Obtenção de dados para R.N.A. Módulo 1: Dextrana.

Antes de se inicializar a simulação para coleta de dados o usuário deve fornecer em um arquivo separado (no exemplo, "F1F2C1S0.DAT") os dados iniciais para a simulação. Serão impressos no arquivo de dados "ANN 1.DAT" os dados iniciais e finais após o término do processo. O modelo gerado por este tipo de rede recebe o nome de "caixa preta" como mostrado no capítulo 2.

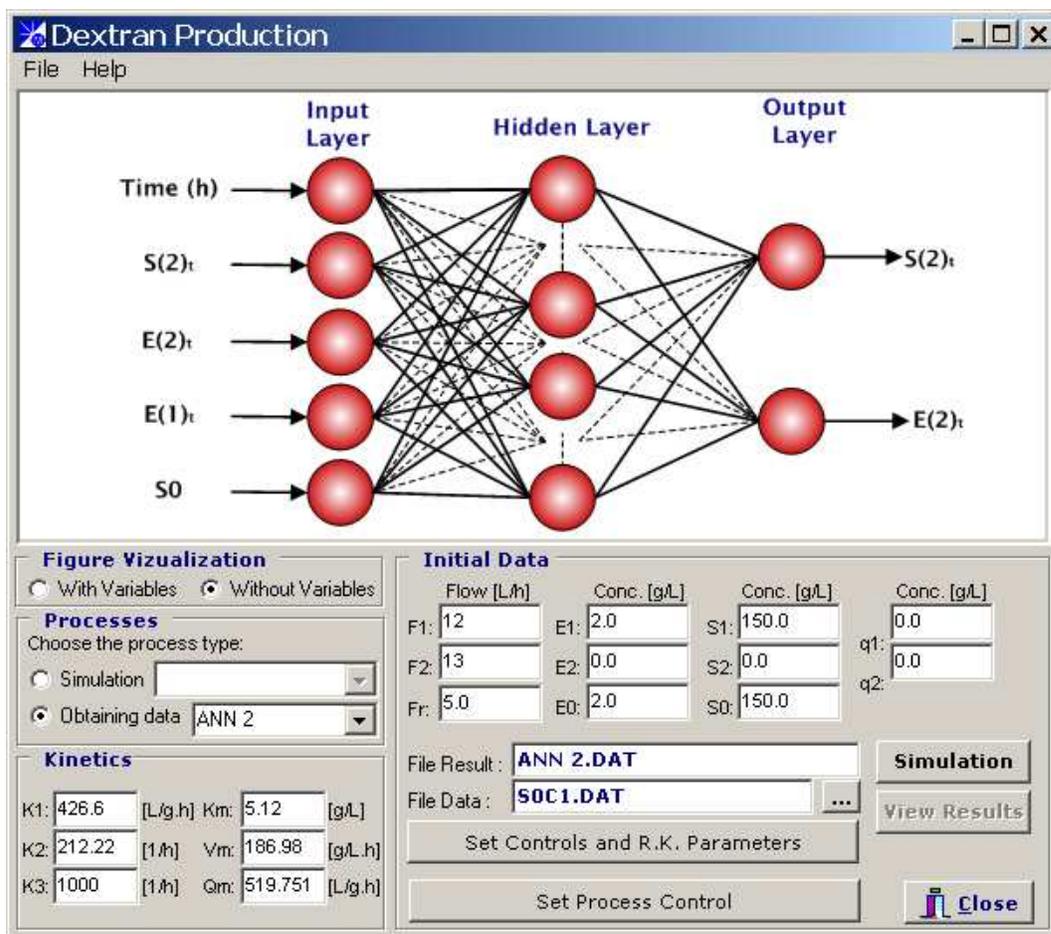


Figura 5.27: Obtenção de dados para R.N.A dinâmica. Módulo 1: Dextrana.

No processo mostrado na Figura 5.27, além dos dados iniciais o usuário deverá fornecer um arquivo chamado, no exemplo, "SOC1.dat" contendo os dados, em coluna, a concentração inicial de enzimas nos dois reatores e concentração inicial de substrato. A variável tempo é gerada pelo modelo. O arquivo texto de saída, no exemplo, "ANN 2.dat" conterà todos os dados necessários para o treinamento da R.N.A. Este treinamento poderá ser realizado no módulo 4 do Bio-PSA.

Após a definição do que se deseja executar e completa definição das variáveis iniciais o botão "simulation" ficará habilitado para usuário. A Figura 5.28 mostra a CxDlg de conclusão de uma simulação normal do processo. Deve-se tomar cuidado para que a opção de controlador esteja desligada. Se for escolhida a

opção simulação de modelo normal ou híbrido o usuário poderá analisar os dados conforme mostrado no tópico seguinte.

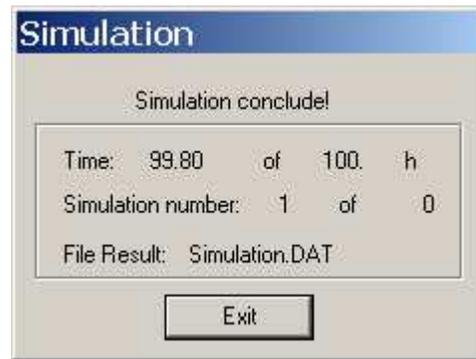


Figura 5.28: Conclusão de geração de dados. Módulo 1:Dextrana

5.2.3. Resultados

A análise dos resultados pode ser feita através da CxDlg mostrada na Figura 5.29. O usuário poderá conferir os principais dados da simulação e plotar gráficos que poderão ser copiados na forma de imagem para outros softwares. A Figura 5.30 mostra alguns dados plotados.

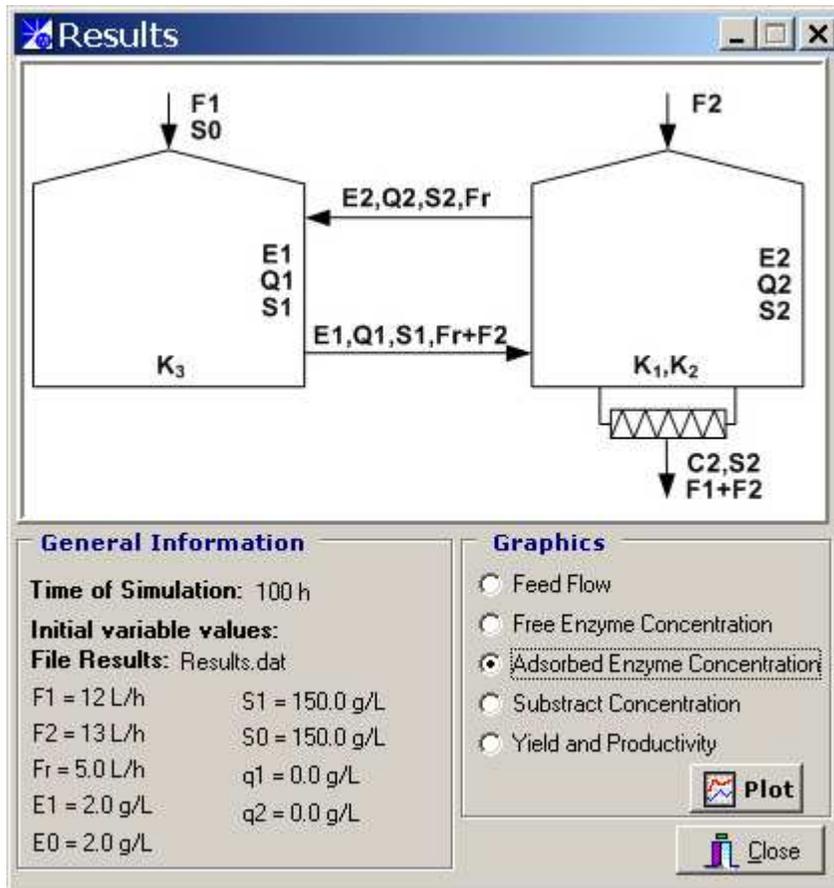


Figura 5.29: Caixa de diálogo dos resultados para simulação normal. Módulo 1:Dextrana

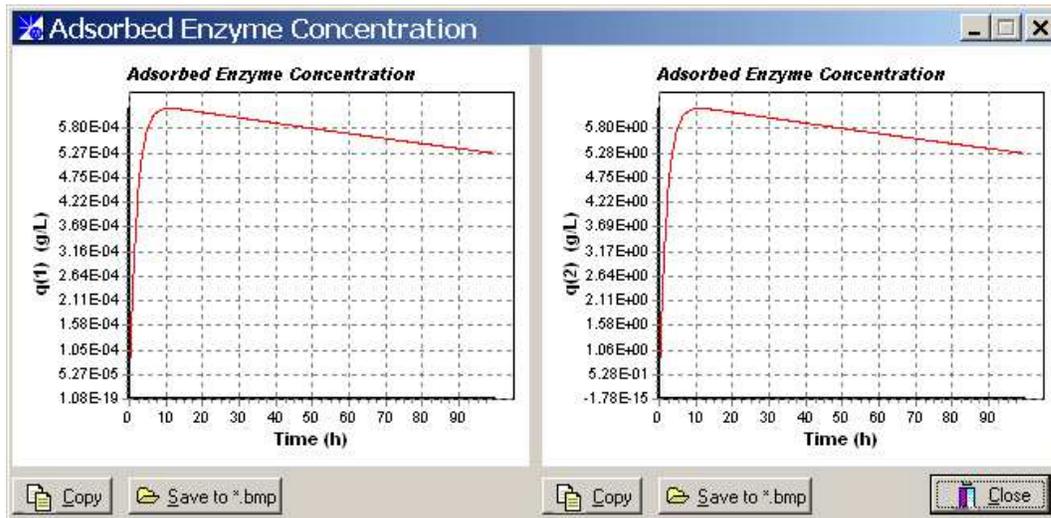


Figura 5.30: Gráficos de resultados para simulação normal. Módulo 1: Dextrana

5.3. CONCLUSÕES

O módulo 1 do Bio-PSA contém as funcionalidades de simulação de Bioprocessos pré-existentes permitindo ao usuário total acesso às informações geradas por meio de gráficos e arquivo texto. Além disto, o usuário tem acesso total à modificação dos dados iniciais em todos os processos implementados. Nos processos que a modelagem híbrida é implementada, R.N.As treinadas a partir de dados experimentais podem ser analisadas. A implementação de novos Bioprocessos pode ser efetuada e acoplada ao módulo tornando seu uso mais amplo.

O capítulo 6 mostrado a seguir detalha o módulo 2 do Bio-PSA que contém funcionalidades para purificação de proteínas.

CAPÍTULO 6

6. BIO-PSA: MÓDULO 2

PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

Prefácio

O módulo 2 é dedicado a processos de purificação de proteínas. Na versão atual do Bio-PSA está implementada a funcionalidade de purificação de proteínas baseada no modelo CARE discutido com maiores detalhes nos capítulos 2 e 3. O usuário tem a opção de simular quatro configurações de biorreatores para purificação de dois tipos de proteínas, conforme será visto nos itens 6.1.1 e 6.1.2.

6.1. CASO 1: PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA PELO PROCESSO CARE

6.1.1. Introdução e Fluxograma.



Figura 6.1: Janela de Apresentação. Módulo 2. Proteína

A Figura 6.1 mostra a CxDlg "About" da funcionalidade do software Bio-PSA que possui opção para simulação de quatro configurações baseadas no modelo CARE que podem ser melhor analisadas no trabalho de DECHECHI et al. (1997). As configurações são: Sistema CARE modificado de dois e três estágios e Sistema CARE modificado de dois e três estágios com eluição em reator pistonado. A Figura 6.1 apresenta o fluxograma do programa.

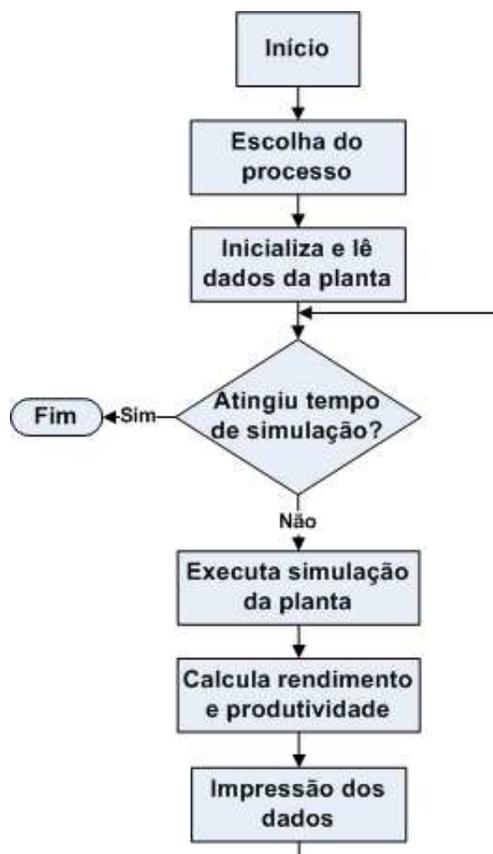


Figura 6.2: Fluxograma geral. Módulo 2. Proteína

6.1.2. Dados iniciais e simulação.

As principais funções podem ser acessadas através do painel "Processes" mostrado na Figura 6.3. Cada configuração pode ser simulada para purificação de duas enzimas: Lipase e Lisozima. Todas as variáveis iniciais podem ser editadas pela janela principal e pelos botões disponíveis no canto inferior direito, apresentados na Figura 6.4. O acesso a variáveis é habilitado ou desabilitado conforme o requerimento da configuração a ser simulada. Os valores iniciais sugeridos foram extraídos de RIBAS (1999).

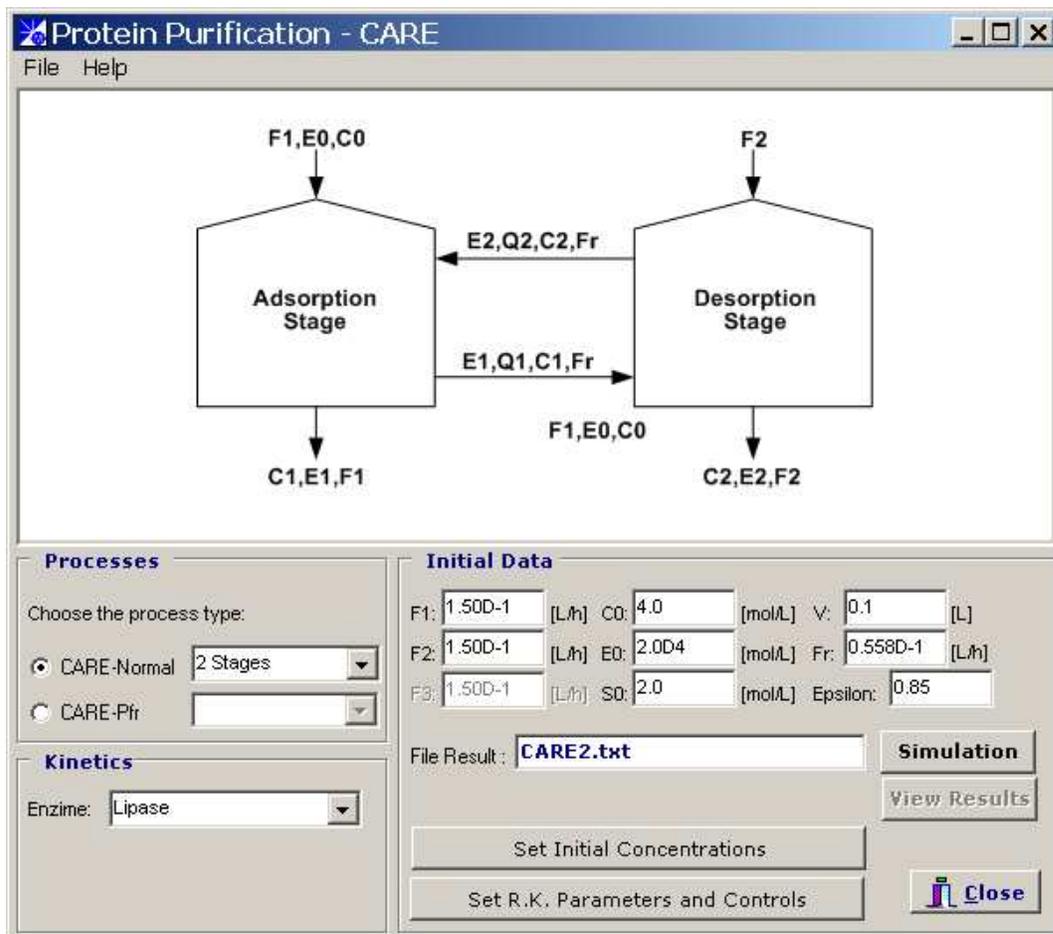


Figura 6.3: Janela principal da funcionalidade de purificação de proteínas.

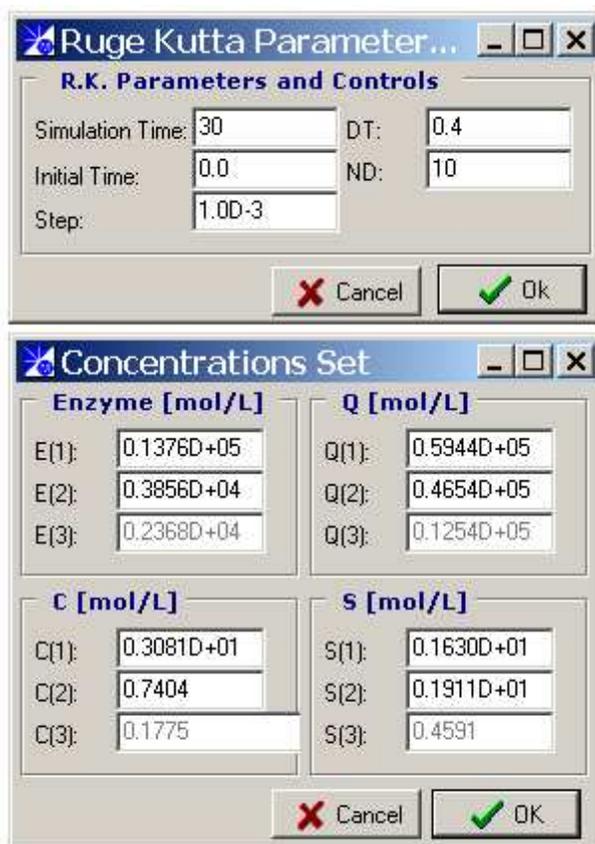


Figura 6.4: Caixas de diálogo das variáveis. Módulo 2: Proteína.

Segue-se na Figura 6.5, Figura 6.6 e Figura 6.7 imagens da janela principal do módulo 2 para diferentes configurações. Relembrando as siglas:

- Sistema CARE modificado de dois estágios (CARE2)
- Sistema CARE modificado de três estágios (CARE3)
- Sistema CARE modificado de dois estágios com eluição em reator pistonado (CARE2pfr)
- Sistema CARE modificado de três estágios com eluição em reator pistonado (CARE3pfr)

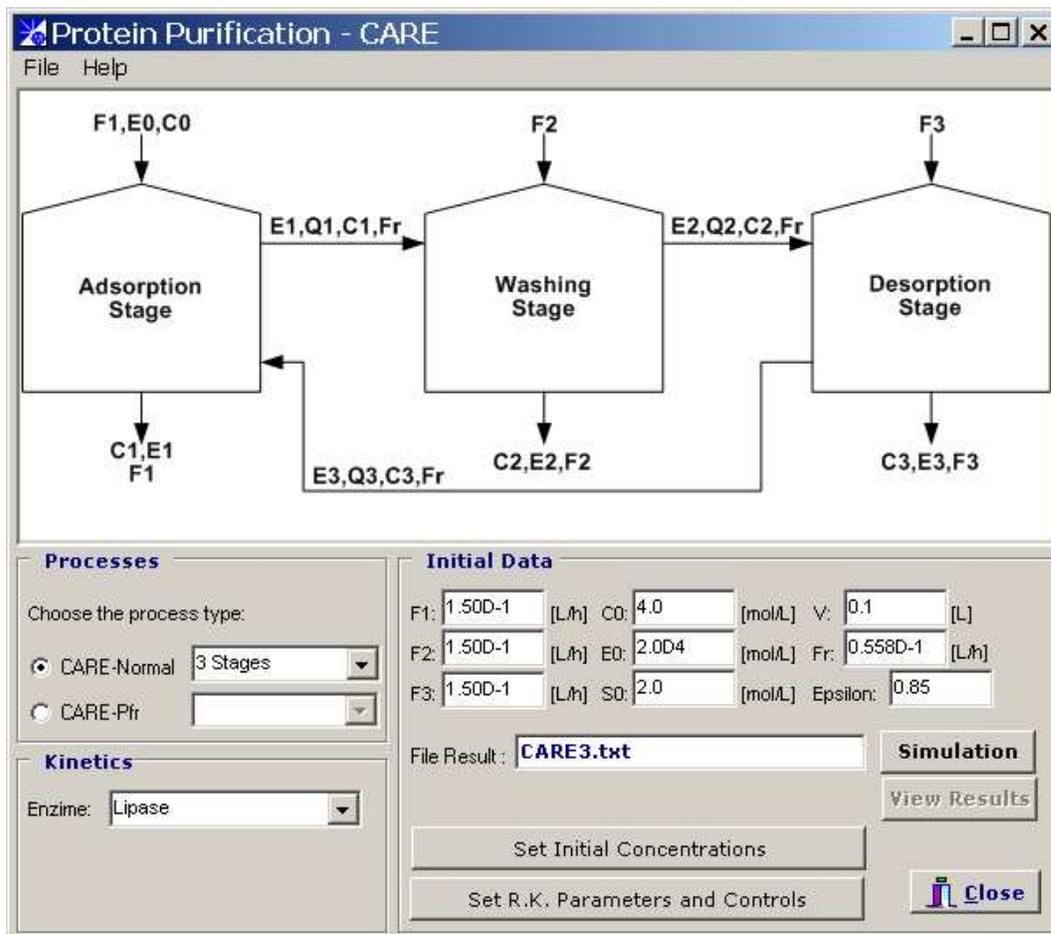


Figura 6.5: Janela principal. Módulo 2: Proteína - CARE3/Lipase.

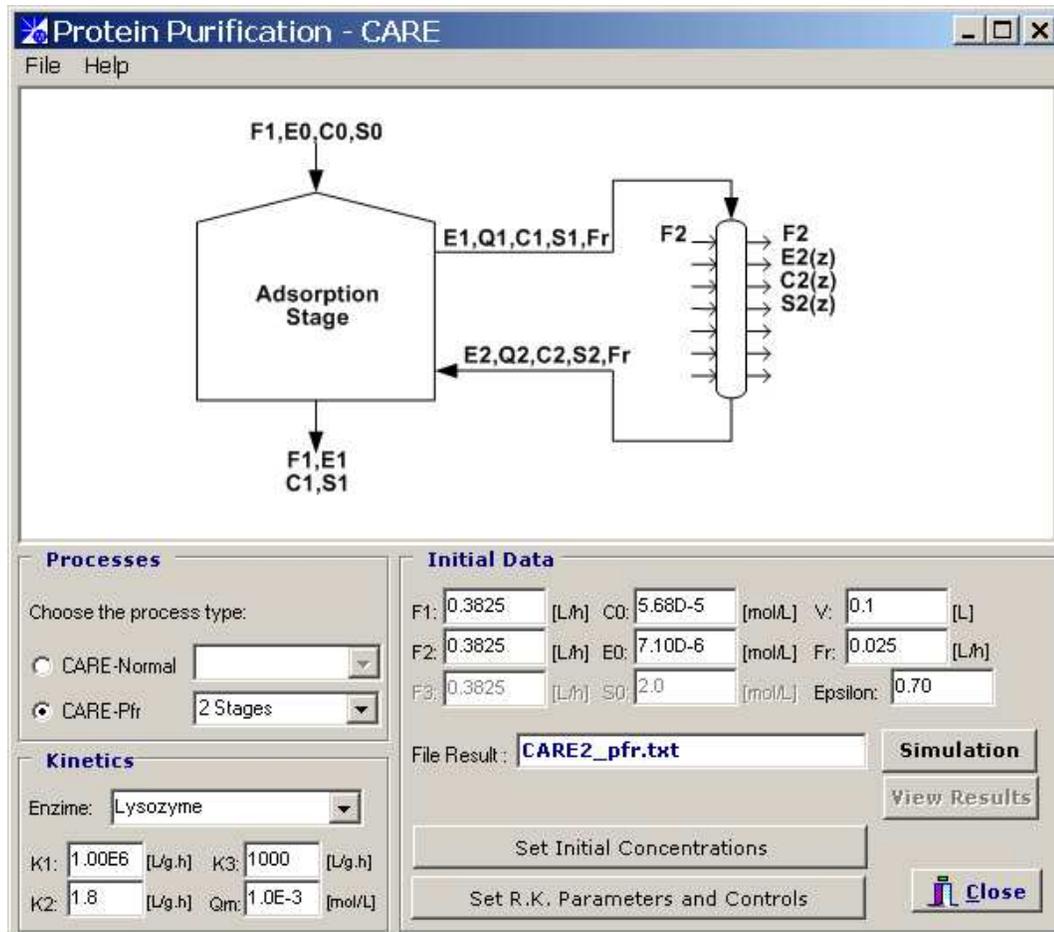


Figura 6.6: Janela principal. Módulo 2: Proteína - CARE2pfr/Lisozima.

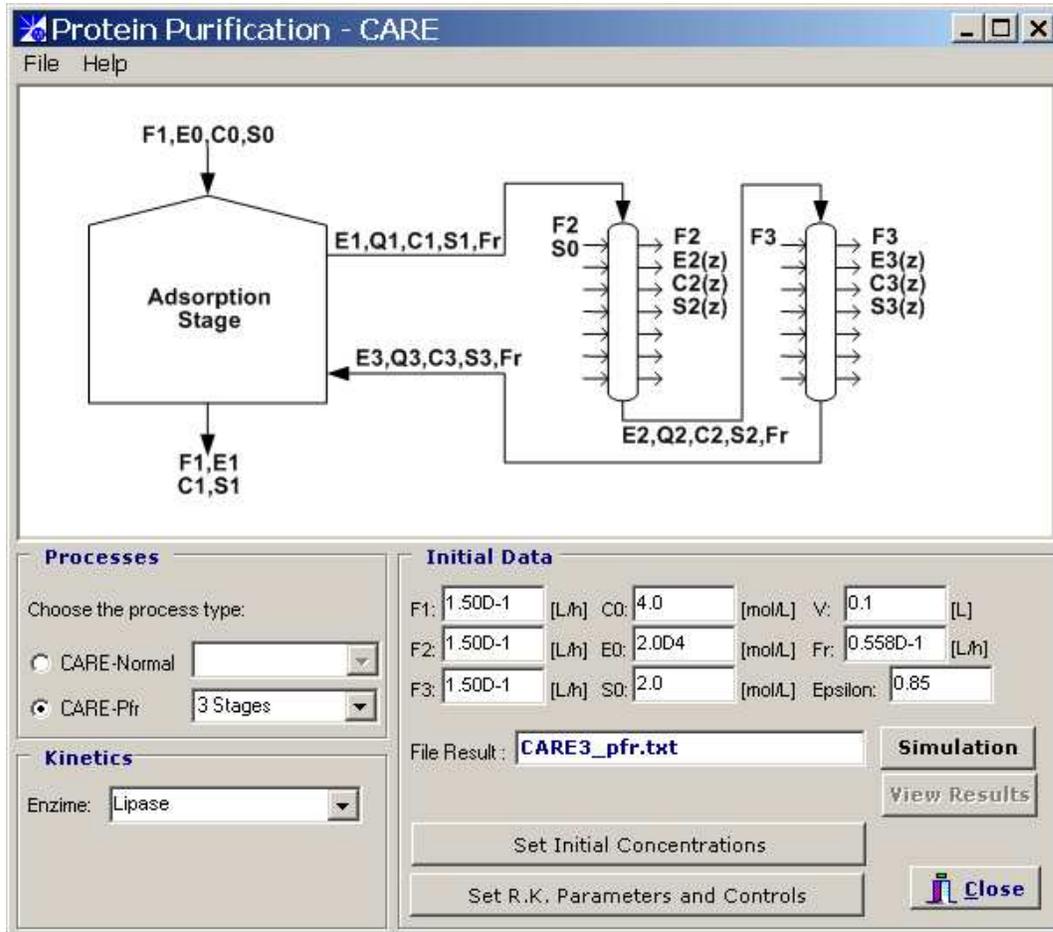


Figura 6.7: Janela principal. Módulo 2: Proteína - CARE3pfr/Lipase.

Após todos os parâmetros iniciais serem definidos inicia-se a simulação e em seguida a análise dos resultados que serão mostrados no item 6.1.3.

6.1.3. Resultados

A Figura 6.8 mostra a CxDlg dos resultados. É confirmado qual o processo foi simulado e para qual enzima e o arquivo de resultados é mostrado em uma caixa de edição. O usuário pode copiar todos os dados para uma análise diferenciada caso necessite. É possível plotar gráficos para cada variável de resposta. Basta o usuário escolher e clicar no botão "Plot".

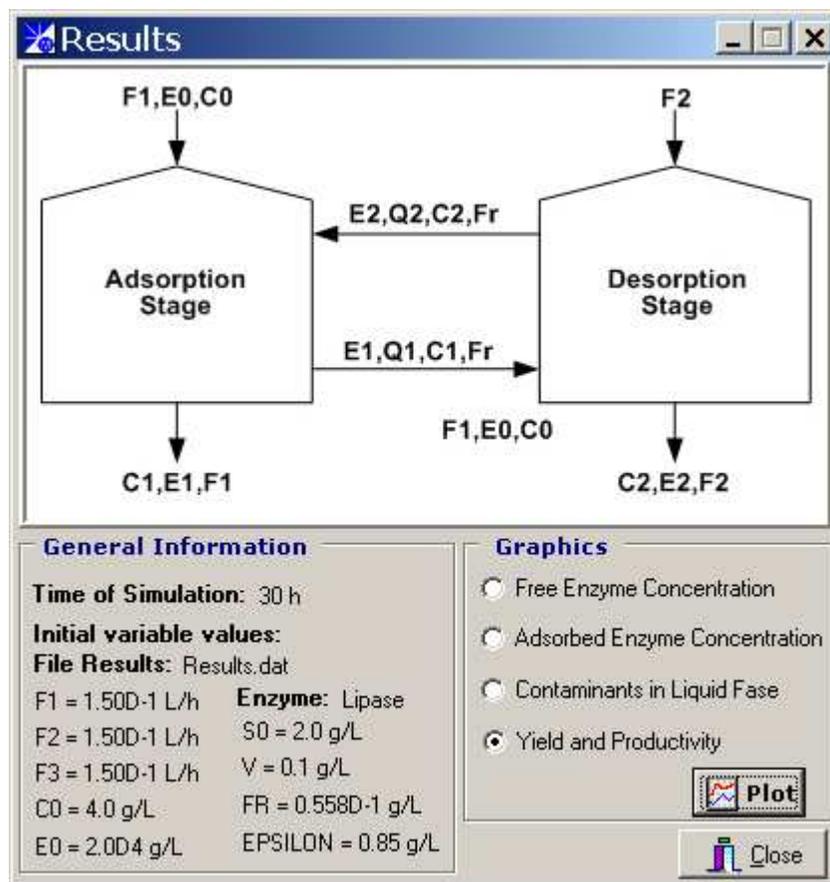


Figura 6.8: Caixa de diálogo dos resultados. Módulo2: Proteína CARE2/Lipase.

Na Figura 6.9 tem-se os dados de rendimento e produtividade para o processo Lisozima/CARE.

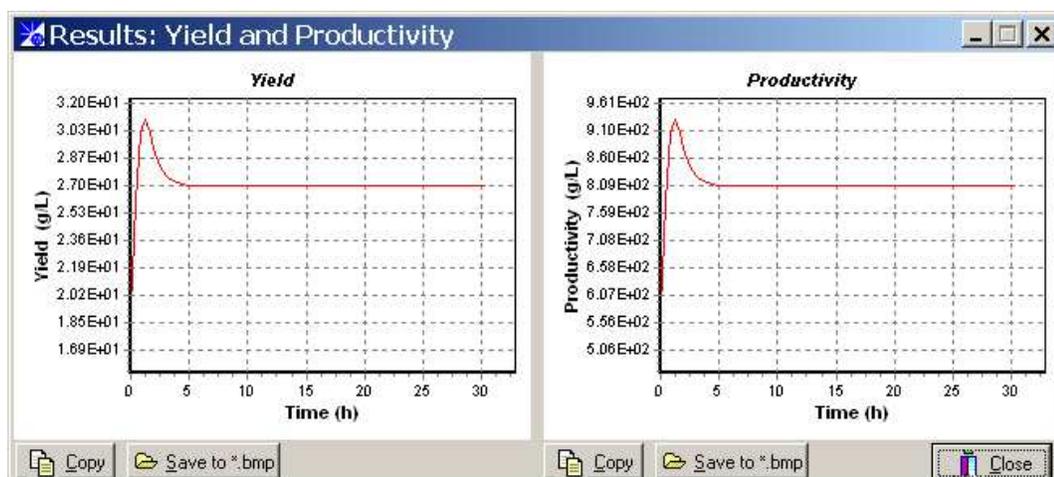


Figura 6.9: Caixa de diálogo dos resultados para purificação de lipase .

6.2. CONCLUSÕES

Este módulo que aborda funcionalidades para purificação de proteínas, contém modelos baseados no processo CARE. No estágio atual não permite generalizações e todos os processos são simulados para as proteínas Lisozima e Lipase. Assim como no módulo 1, o usuário tem acesso aos dados gerados por gráficos e arquivos texto.

Os dois próximos capítulos apresentam os módulos que utilizam técnicas de Inteligência Artificial. Uma funcionalidade de S.E é mostrado no capítulo 7 e a funcionalidade de R.N.As no capítulo 8.

CAPÍTULO 7

7. BIO-PSA: MÓDULO 3

SISTEMA ESPECIALISTA

Prefácio

O terceiro módulo do Bio-PSA visa disponibilizar ao usuário ferramentas para o desenvolvimento de Sistemas Especialistas de interesse. Na versão atual do Bio-PSA esta funcionalidade apresenta a opção de desenvolvimento de uma base de conhecimento ou a consulta a uma base disponível. A base de conhecimento disponível cria um S.E que visa auxiliar o estudo e análise de Bioprocessos através da aquisição de informações iniciais. O item 7.1 apresenta uma introdução das ferramentas utilizadas para desenvolvimento desta funcionalidade (denominada Bio-PSA Expert) sendo sua apresentação realizada no item 7.4. A base de conhecimento desenvolvida é mostrada no item 7.2 onde são apresentadas suas variáveis, objetivo e confecção das regras. O item 7.3 apresenta uma ferramenta aqui denominada "Base Builder" para a criação de novos S.Es.

7.1. BIO-PSA EXPERT

Ao se clicar na opção "Use the Expert System" da CxDlg mostrada na Figura 7.1 é acionada a funcionalidade de consulta a base de conhecimento mostrada na Figura 7.3. A Figura 7.2 mostra a CxDlg "About" desta funcionalidade denominada *Bio-PSA Expert*.

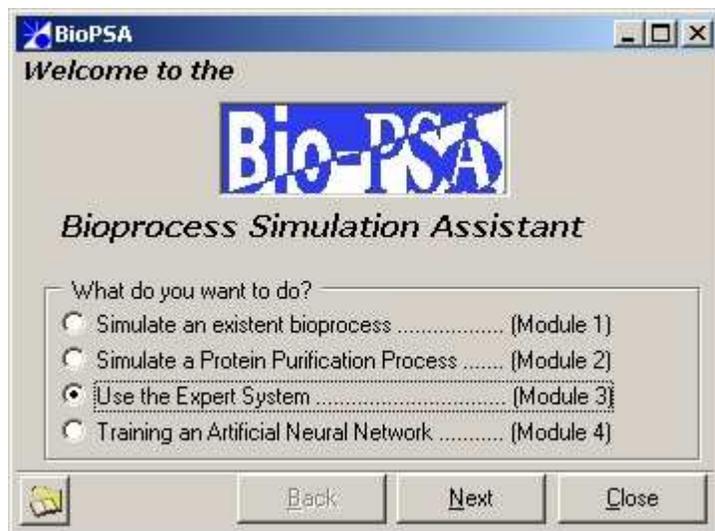


Figura 7.1: Janela de abertura do *Bio-PSA*.



Figura 7.2: Janela de Apresentação. Módulo 3. *Bio-PSA Expert*

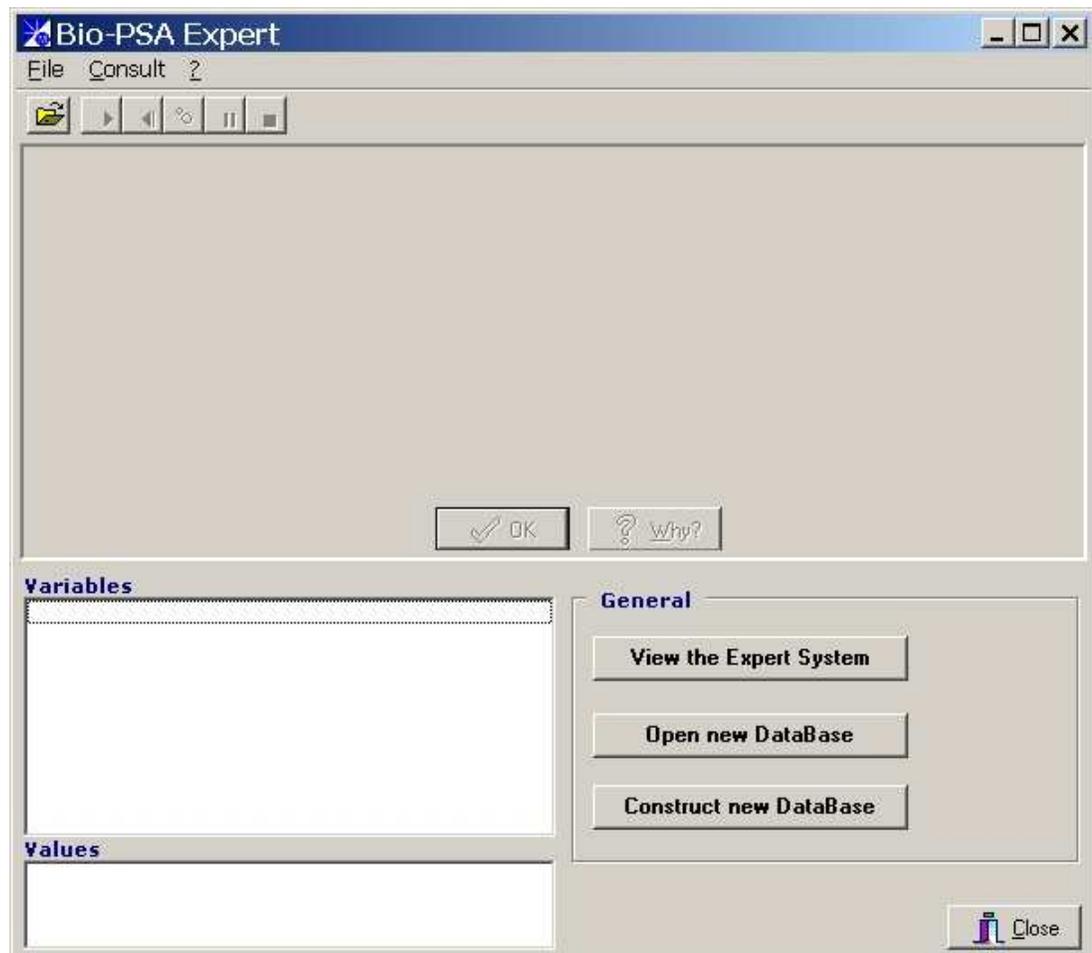


Figura 7.3: Janela principal do *Bio-PSA Expert*.

Com esta funcionalidade o usuário pode consultar uma base de conhecimento e desenvolver e/ou modificar bases através da ferramenta denominada *Base Builder*. Este editor é acessível no botão “*Construct new DataBase*” (Figura 7.3). O “*Base Builder*” permite que variáveis e regras sejam adicionadas ou eliminadas de acordo com a necessidade do usuário e no formato apropriado para uso do mecanismo de inferência. Durante uma consulta os valores atribuídos a todas variáveis do S.E são apresentados no canto inferior esquerdo do *Bio-PSA Expert* conforme Figura 7.3.

Em todo procedimento foi utilizada uma Biblioteca de Componentes Visuais ou VCL (*Visual Components Library*) para o Delphi que auxilia no desenvolvimento de S.E. Esta biblioteca foi construída a partir de um Shell desenvolvido por pesquisadores do Laboratório de Inteligência Artificial

(LIA), localizado no Departamento de Computação da Universidade Federal do Ceará (UFC) e distribuído. O Shell Expert SINTA original distribuído gratuitamente pelo LIA (Laboratório de Inteligência Artificial, Departamento de Computação da Universidade Federal do Ceará) foi elaborado pelo grupo Sistemas INTeligentes Aplicados (SINTA) desta instituição. Esta biblioteca virtual é "open source", ou seja, permite acesso livre ao seu código. Um Shell é um software contendo um conjunto de ferramentas que permitem ao criador do S.E preocupar-se somente com a representação do conhecimento. O Shell interpreta o conhecimento representado e o executa, além de permitir depurações e explicações de como o computador chegou àquela(s) conclusão (ões).

O editor de base "*Base Builder*" é baseado no Shell Expert Sinta e desenvolvido com a utilização da Expert SINTA VCL. Esta nada mais é que uma biblioteca de componentes para programação de sistemas especialistas baseados em regras de produção, fatores de confiança e encadeamento para trás ("*backward chaining*"), de forma semelhante ao clássico MYCIN (LIA, 1998). O encadeamento para trás é melhor explicado no item 7.1.1.2. Um sistema baseado em regras que utiliza o encadeamento para trás pode fazer hipóteses de conclusão e usar regra antecedente/conseqüente para trabalhar para trás em direção a fatos que apóiem a hipótese (WINSTON, 1988).

Entre as tarefas desempenhadas pela VCL utilizada, tem-se:

- Encapsular a máquina de inferência e a estrutura de dados que representa o conhecimento (regras de produção);
- Fornecer mecanismos para entrada de dados do usuário;
- Fornecer mecanismos de depuração;
- Permitir personalização da aplicação final;

Este último item sobre a personalização da aplicação é muito interessante uma vez que permite a criação de um S.E

próprio com diminuição do tempo de programação para tarefas que são globais a todo S.E.

A VCL utilizada foi desenvolvida para uma versão muito antiga do Delphi (2.0). Devido à facilidade de acesso ao código pôde-se recompilar estes componentes para a versão utilizada neste trabalho (Delphi 6.0), corrigindo assim a incompatibilidade de versões que ocasionaram muitos erros no início do trabalho. Vale ressaltar que os códigos distribuídos no *website* do projeto apresentaram alguns erros ocasionados pela diferença de leitura de alguns dados pela VCL.

Para se entender a funcionalidade de S.E implementada é feita no próximo item uma explicação da arquitetura de um S.E no Expert SINTA.

7.1.1. Arquitetura de um S.E no Expert SINTA

O conteúdo deste item é baseado no manual fornecido com o Shell Expert Sinta (LIA, 1998) que foi desenvolvido, como já citado, utilizando-se a Expert SINTA VCL.

Os S.Es gerados pelo Expert SINTA seguem a arquitetura mostrada na Figura 7.4.

Podendo-se dizer que:

- **Base de conhecimentos:** representa a informação (fatos e regras) que um especialista utiliza, representada computacionalmente;
- **Editor de bases:** é o meio pelo qual o Shell permite a implementação das bases desejadas;
- **Máquina de inferência:** é a parte do S.E responsável pelas deduções sobre a base de conhecimentos;
- **Banco de dados global:** são as evidências apontadas pelo usuário do sistema especialista durante uma consulta.

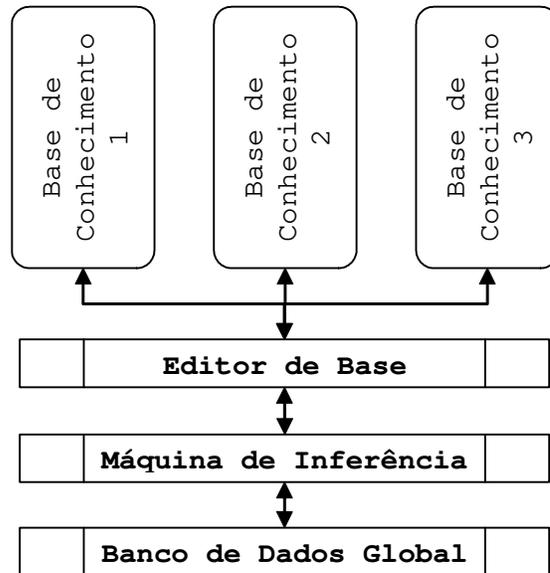


Figura 7.4: Arquitetura simplificada do Expert SINTA.

O objetivo do Shell Expert SINTA é simplificar ao máximo as etapas de criação de um S.E completo. Para tanto, oferece uma máquina de inferência básica, fundamentada no encadeamento para trás (*backward chaining*).

7.1.1.1.As regras no Expert SINTA

Como dito no capítulo 2 a característica que difere a programação comum da programação com inteligência artificial é que nesta cada parte pode ser modificada sem alterar toda a estrutura do programa. As regras dão flexibilidade ao S.E. Para se entender como elas funcionam segue a análise de um exemplo extraído da base SECAJU, um S.E de diagnóstico de doenças do cajueiro, que acompanha o Shell Expert SINTA:

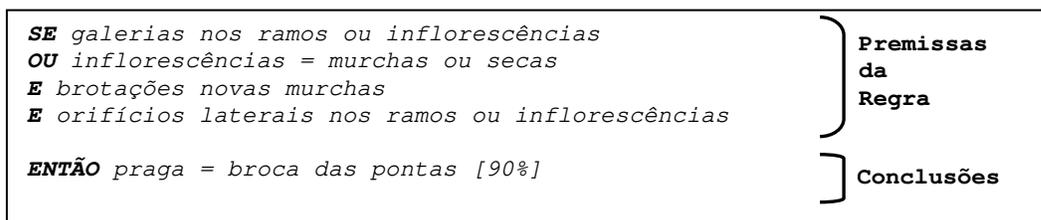


Figura 7.5: Regra de Produção. Expert SINTA

Denominam-se premissas (conseqüentes) de uma regra como as cabeças da regra e as conclusões (os antecedentes),

caudas. Esta notação é proveniente da linguagem PROLOG, na qual as conclusões encabeçam as cláusulas.

Para o projetista do conhecimento que cria bases utilizando o Shell Expert SINTA ou a VCL derivada dele, o seguinte critério para definições de assertivas deve ser seguido:

(I). A estrutura de cada cauda (premissa) deve obedecer ao seguinte modelo:

<conectivo>	<atributo>	<operador>	<valor>
-------------	------------	------------	---------

onde:

Conectivo: é um dos seguintes elementos utilizados na lógica clássica: NÃO, E, OU. Sua função é unir a sentença ao conjunto de premissas que formam a seção de antecedentes de uma regra.

Atributo: é uma variável capaz de assumir um ou múltiplos valores no decorrer da consulta à base de conhecimentos. Cabe ao desenvolvedor definir o tipo de atributo. Um atributo é uma entidade totalmente abstrata, capaz de armazenar listas de valores cujo significado depende do contexto da base. Números também podem ser atribuídos a variáveis;

Operador: é um elo entre o atributo e o valor da premissa que define o tipo de comparação a ser realizada. São operadores relacionais: =, >, <=, <>, entre outros;

Valor: é um item de uma lista a qual foi previamente criada e relacionada a um atributo.

(II). A estrutura de cada cabeça (conclusão) deve obedecer ao seguinte modelo:

<atributo>	=	<valor>	<grau de confiança>
------------	---	---------	---------------------

onde:

Atributo: equivale ao mesmo atributo usado em caudas;

"=" é um operador de atribuição e não de igualdade. Ou seja, o atributo, nas cabeças de regra, é sempre instanciado

a um valor. Dependendo se a variável pode ou não acumular múltiplas instanciações, o novo valor substituirá o antigo ou será empilhado com os demais.

Valor: equivale ao mesmo valor utilizado em caudas;

Grau de confiança: é uma porcentagem indicando a confiabilidade daquela conclusão específica da regra. O grau de confiança varia de 0% a 100%.

O Expert SINTA utiliza o encadeamento para trás, o modo mais comum de utilização de um sistema especialista. O projetista deve incluir na definição da base quais os atributos que devem ser encontrados (ou seja, os objetivos do S.E). A máquina de inferência encarrega-se de encontrar uma atribuição para o atributo desejado nas conclusões das regras (após o ENTÃO...). Obviamente, para que a regra seja aprovada, suas premissas devem ser satisfeitas, obrigando à máquina a encontrar os atributos das premissas para que possam ser julgadas, acionando um encadeamento recursivo. Caso o atributo procurado não seja encontrado em nenhuma conclusão de regra, uma pergunta direta é feita ao usuário.

As regras de produção são populares por possuírem as seguintes vantagens:

- **Modularidade:** cada regra, por si mesma, pode ser considerada como uma peça de conhecimento independente;
- **Facilidade de edição** (uma consequência da modularidade): novas regras podem ser acrescentadas e antigas podem ser modificadas com relativa independência;
- **Transparência do sistema:** garante maior legibilidade da base de conhecimentos.

Portanto, é preciso ter em mente que a modularidade de um sistema baseado nessa arquitetura permite a construção passo-a-passo da base de conhecimentos, ou seja, é possível

realizar vários testes com apenas um subconjunto de regras concluído.

7.1.1.2.Exemplo de encadeamento para trás

Sejam as seguintes regras um sistema especialista para “decidir se devo ou não ir à praia amanhã”.

REGRA 1

SE *amanhã pode chover = Não*
E *tenho dinheiro suficiente = Sim*
E *tenho tempo suficiente = Sim*
ENTÃO *devo ir à praia = Sim*

REGRA 2

SE *amanhã pode chover = Sim*
OU *tenho dinheiro suficiente = Não*
OU *tenho tempo suficiente = Não*
ENTÃO *devo ir à praia = Não*

REGRA 3

SE *o serviço de meteorologia disse que vai chover amanhã = Sim*
ENTÃO *amanhã pode chover = Sim*

REGRA 4

SE *não vou sair hoje = Sim*
E *nenhuma emergência ocorrer = Sim*
ENTÃO *tenho dinheiro suficiente = Sim*

REGRA 5

SE *minha namorada ligar = Sim*
ENTÃO *não vou sair hoje = Não*

REGRA 6

SE *meu orientador passar trabalho extra = Sim*
ENTÃO *tenho tempo suficiente = Não*

Examinando o pequeno S.E acima, claramente distinguise que o seu objetivo é determinar o valor da variável *devo ir à praia*. Então, inicia-se a busca por ela. O Expert SINTA procura as regras nas quais a variável sendo procurada no momento pode receber um valor se a regra for aceita (ou seja, quando ela aparece após o ENTÃO). Em seguida, a máquina de inferência verifica se a regra vale ou não. No exemplo dado, o sistema avalia a regra 1 para poder determinar se devo ir à praia ou não. Mas, para isso, tem-se que determinar se todas as premissas (*amanhã pode chover = Não, tenho dinheiro suficiente = Sim, tenho tempo suficiente = Sim*) são verdadeiras. Para descobrir se amanhã pode chover, tem-se que repetir o processo, avaliando a regra 3. Agora tem-se que saber se a meteorologia disse sobre a

possibilidade de chuva amanhã. Como não existe nenhuma regra que possa concluir o que a meteorologia disse, o Expert SINTA realiza uma pergunta ao usuário, do tipo "A meteorologia afirmou se amanhã pode chover (Sim/Não)?" O criador da base de conhecimento deverá criar esta frase.

Se a meteorologia disser que amanhã vai chover, então primeira premissa da regra 1 passará no teste. Avaliando a segunda premissa e repetindo o processo do encadeamento para trás, chega-se à regra 4. Mas, para descobrir se eu vou sair hoje ou não, é preciso recorrer à regra 5 (observa-se a forte idéia de recursão no *backward chaining*). A regra 5 leva a uma pergunta, pela qual conclui-se se tal regra vai ser aprovada. Se realmente for aprovada, a primeira premissa da regra 4 é verdadeira, fazendo com que verifiquemos agora a segunda premissa. Quando todas as premissas da primeira regra forem avaliadas, pode-se determinar se a regra 1 foi aprovada ou não. Caso contrário passa-se para a próxima regra que possa concluir um valor para a variável devo ir à praia.

Uma base de conhecimento no Shell Expert SINTA ou utilizando a Expert SINTA VCL envolve os seguintes conjuntos de atributos que devem ser indicados pelo projetista da base:

- Variáveis
- Regras
- Perguntas
- Objetivos
- Informações adicionais

Quando esses elementos estiverem definidos, já se torna possível utilizar o S.E.

A seguir é apresentada a base de conhecimento desenvolvida e que será utilizada nos próximos itens para demonstrar o funcionamento do Bio-PSA Expert.

7.2. DESENVOLVIMENTO DA BASE DE CONHECIMENTO

A base de conhecimento em desenvolvimento é baseada no esquema mostrado na Figura 7.6 e detalhado no capítulo 2. São vários os fatores envolvidos no projeto de biorreatores e muitos deles são interligados. Através do estudo e pesquisa estas informações iniciais foram enriquecidas e ordenadas de modo a serem compreensíveis a um S.E podendo este utilizá-las de modo adequado. O S.E aqui apresentado tem como objetivo fazer um resumo dos fatores iniciais a serem considerados pelo projetista do processo. É um S.E modelo que auxiliará também na apresentação das ferramentas desenvolvidas neste trabalho. Esta base de conhecimento tem um intuito didático para posterior aperfeiçoamento e interação com os demais módulos do Bio-PSA.

Ressalta-se que o S.E não aborda os sistemas constituídos de células animais, como células de mamíferos e de insetos, e nem de células de plantas. Também não estão inclusos sistemas de anticorpos monoclonais.

Primeiramente foram definidas as variáveis do S.E e seus respectivos valores. Em seguida foi especificado quais variáveis possuíam uma pergunta associada e definidas as perguntas. Finalizando foram criadas as regras e realizados os testes.

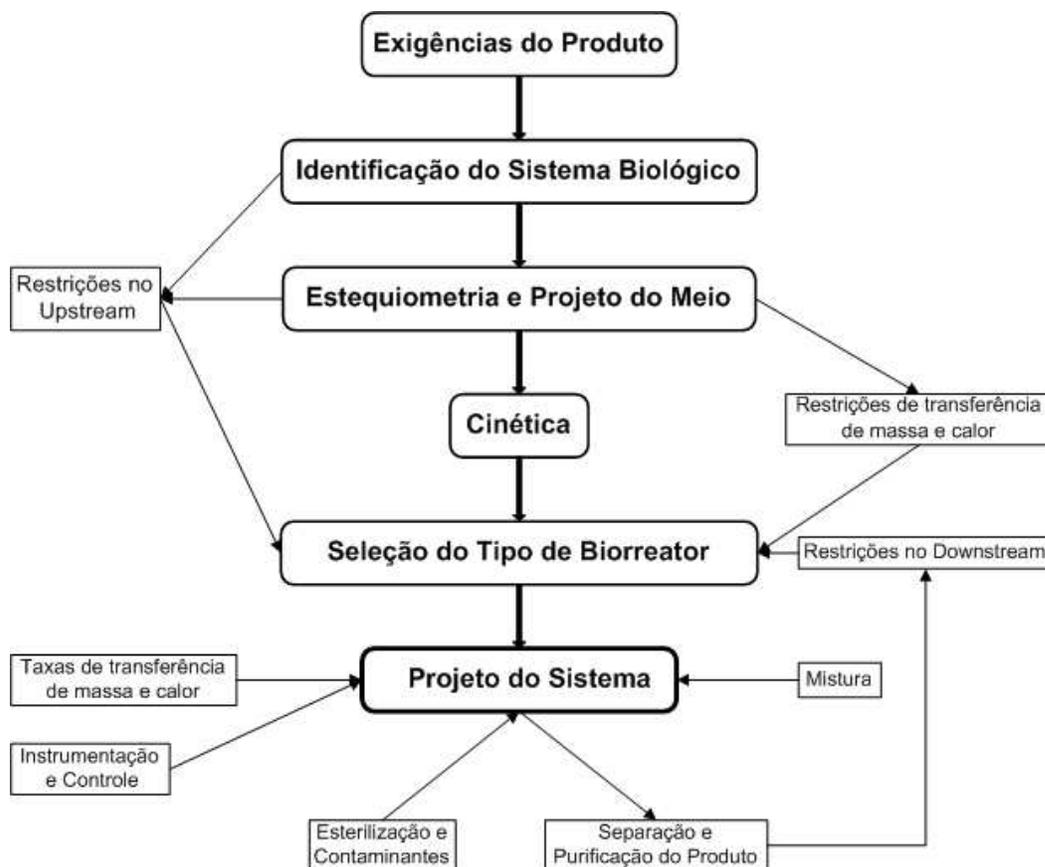


Figura 7.6: Representação esquemática do projeto de um sistema de biorreator (adaptado de ANSEJO et al. 1994).

7.2.1. Definição das variáveis e objetivos.

Este item tem como objetivo a definição as variáveis importantes para o S.E e a construção da base de conhecimento. A variável-objetivo é denominada *Initial_Information* uma vez que o objetivo deste S.E é a orientação e coleta de dados iniciais gerais para o processo. O S.E irá definir se as informações foram devidamente coletadas ou não. Sendo assim a variável-objetivo *Initial_Information* receberá os valores *Complete* ou *Uncomplete*. A Tabela 7.1 contém as variáveis do S.E e seus correspondentes valores. Também é apresentado o tipo da variável. As variáveis podem ser dos seguintes tipos:

- **Multivalorada:** pode assumir mais de um valor. Se durante a consulta um novo valor é inferido a tal variável, ele é acumulado junto com os anteriores;

- **Univalorada:** pode assumir somente um valor. Se durante a consulta um novo valor é inferido o valor antigo é descartado;
- **Numérica:** assume valores numéricos;

Na Tabela 7.2 são apresentadas as variáveis auxiliares que não estão associadas a nenhuma pergunta.

Tabela 7.1: Variáveis principais do S.E em ordem alfabética:

Variável	Valores	Tipo
agitation rate damage	Yes	univalorada
	No, I need to search	
antifoam	Gas-liquid oxygen rate	multivalorada
	Microorganism growth	
	Mass transfer rate	
	Final product recovery	
	Other	
biological system	Microorganism	univalorada
	Enzyme	
cGMP requirements	Yes	univalorada
	No	
	I need to search	
cleaning problems	No, doNot exist	univalorada
	Yes, exist	
	I need to search	
CO2 sensitive	Yes	univalorada
	No	
	I need to search	
cooled	Yes	univalorada
	No, I need to search	
cooled quickly	Yes	univalorada
	No	
	I need to search	
corrosive produced	Yes	univalorada
	No	
	I need to search	
denaturation	Yes	univalorada
	No, I need to search	
density maximum	Yes	univalorada
	No, I need to search	
exopolysaccharides	Yes	univalorada
	No	
	I need to search	
final output	Yes	univalorada
	No, I need to search	
final product use	Yes	univalorada
	No, I need to search	

Variável	Valores	Tipo
foam broken	Mechanically	multivalorada
	Antifoam agent	
foam produced	Yes	univalorada
	No	
	I need to search	
foaming harmful	Yes	univalorada
	No	
	I need to search	
growth rate maximum	Yes	univalorada
	No, I need to search	
heat transfer	Yes	univalorada
	No, I need to search	
hyphae produced	Yes	univalorada
	No	
	I need to search	
Initial information	Complete	univalorada
	Uncomplete	
kinetic	Yes	univalorada
	No, I need to search	
light requirements	Yes	univalorada
	No	
	I need to search	
lysis	Yes	univalorada
	No	
	I need to search	
measurements essential	Yes	univalorada
	No	
	I need to search	
measurements essential type	Temperature	multivalorada
	Foam level	
	pH	
	Dissolved oxygen	
	Other	
medium sterilized	Yes	univalorada
	No, I need to search	
medium type	Slurry	univalorada
	Liquid	
	Semisolid	
mobility system	Free	univalorada
	Immobilized	
oxygen maximum specific	Yes	univalorada
	No, I need to search	
oxygen minimum level	Yes	univalorada
	No, I need to search	
oxygen requirements	Yes	univalorada
	No	
	I need to search	

Variável	Valores	Tipo
oxygen requirements type	Anaerobic	univalorada
	Microaerophilic	
	Aerobic	
pellets produced	Yes	univalorada
	No	
	I need to search	
pH extremes	Yes	univalorada
	No, I need to search	
pH optimal growth	Yes	univalorada
	No, I need to search	
pH optimal product	Yes	univalorada
	No, I need to search	
pH variations sensitivity	Yes	univalorada
	No, I need to search	
selective conditions	Yes	univalorada
	No	
	I need to search	
selective conditions type	Extreme temperature	multivalorada
	Heavy metal concentrations	
	Extreme pH	
	Other	
shear sensitive	Yes	univalorada
	No	
	I need to search	
solvents produced	Yes	univalorada
	No	
	I need to search	
spores produced	Yes	univalorada
	No	
	I need to search	
substrate soluble	Yes	univalorada
	I need to search	
temperature extremes	No, I need to search	univalorada
	Yes	
temperature optimum	No, I need to search	univalorada
	Yes	
viscosity effect	Yes	univalorada
	No, I need to search	
viscosity type	Non viscous with Newtonian viscosity	univalorada
	Viscous with Non Newtonian viscosity	
wall growth	No	univalorada
	Yes	
	I need to search	

Tabela 7.2: Variáveis auxiliares do S.E:

Variável	Valor	Tipo
bio_aux_1	Yes/No	univalorada
bio_aux_2	Yes/No	univalorada
bio_aux_3	Yes/No	univalorada
foam_aux_1	Yes/No	univalorada
foam_aux_2	Yes/No	univalorada
foam_aux_3	Yes/No	univalorada
meas_aux_1	Yes/No	univalorada
meas_aux_2	Yes/No	univalorada
mob_aux	Yes/No	univalorada
oxi_aux_1	Yes/No	univalorada
oxi_aux_2	Yes/No	univalorada
sele_aux_1	Yes/No	univalorada
sele_aux_2	Yes/No	univalorada

7.2.2. Definição das Perguntas

Este é o item que faz a interface com o usuário. As perguntas que o mecanismo de inferência irá fazer ao usuário se a variável que ele está tentando acessar não tenha um valor específico. Como será visto posteriormente o Bio-PSA Expert possui ainda um sistema de ajuda em que o usuário poderá perguntar ao S.E porque ele está fazendo determinada pergunta. As perguntas e as respectivas variáveis associadas a elas estão apresentadas na Tabela 7.3 .

Tabela 7.3: Variáveis, em ordem alfabética, e respectivas perguntas do S.E:

Variáveis	Perguntas
agitation rate damage	Do you know at what agitation rate is damage evident?
antifoam	What the antifoam agents can affect?
biological system	Choice the biological system:
cGMP requirements	Are there any pharmaceutical/current Good Manufacturing Practice (cGMP) requirements?
cleaning problems	Do you know if some special cleaning problems exist?
CO2 sensitive	Is the cell sensitive to CO2 concentrations?
cooled	Is the bioreactor cooled following the process?
cooled quickly	Do you know how quickly the bioreactor must be cooled?
corrosive produced	Are corrosive chemicals produced or used in the process?
denaturation	Do you know what are the denaturation conditions?

Variáveis	Perguntas
density maximum	Do you know the maximum cell density desired?
exopolysaccharides	Are exopolysaccharides produced?
final output	Do you know what is the final plant daily/yearly output?
final product use	Do you know what is the use of the final product?
foam broken	How the foam can be broken?
foam produced	Is foam produced?
foaming harmful	Is foaming harmful to the microorganism/enzyme or to the final product?
growth rate maximum	Do you know the maximum rate or the maximum specific growth rate?
heat transfer	Do you know if sufficient heat transfer capability can be provided on scale-up?
hyphae produced	Are hyphae produced?
kinetic	Do you know what kinetic model will be used?
light requirements	Is there a requirement for light?
lysis	Does cell lysis occur under certain conditions?
measurements essential	Are measurements essential?
measurements essential type	What measurements are essential to make?
medium sterilized	Do you know if the raw fermentations medium is heat sterilized in situ?
medium type	Which medium the process is performed in?
mobility system	Which is the mobility of the biological system?
oxygen maximum specific	Do you know the maximum specific oxygen requirements (Q_{max})?
oxygen minimum level	Do you know the minimum level of oxygen required?
oxygen requirements	Are there oxygen requirements?
oxygen requirements type	Which is the oxygen requirement?
pellets produced	Are pellets formed?
pH extremes	Do you know what are the pH extremes in the bioreactor?
pH optimal growth	Do you know what is the optimal pH for growth?
pH optimal product	Do you know what is the optimal pH for product formation?
pH variations sensitivity	Do you know what is the sensitivity of growth/product formation kinetics to variations in pH?
selective conditions	Are there any selective conditions?
selective conditions type	Choose the selective conditions:
shear sensitive	Is the system shear sensitive?
solvents produced	Are organic solvents produced?
spores produced	Are spores formed?
substrate soluble	Is the substrate soluble?

Variáveis	Perguntas
temperature extremes	Do you know what are the extremes of temperature in the bioreactor?
temperature optimum	Do you know what is the optimum temperature?
viscosity effect	Do you know how does growth medium viscosity affect production?
viscosity type	Again about viscosity, is the medium:
wall growth	Is there wall growth in the bioreactor?

7.2.3. Definição das Regras

O *Bio-PSA Expert* foi desenvolvido utilizando-se a Expert SINTA VCL que utiliza o encadeamento para trás. Assim ele faz hipóteses de conclusão e usa regra antecedente/conseqüente para trabalhar para trás em direção a fatos que apóiem a hipótese. O denominado Engenheiro ou projetista de Conhecimento, pessoa que manipula informações para deixá-las compreensíveis ao S.E, deve saber exatamente como o mecanismo de inferência trabalha. O processo de criação de regras é trabalhoso e requer muitos testes. Neste caso a ordem dos fatores pode alterar, e muito, o resultado final. Mas o interessante é que, como as regras estão à disposição do usuário ele mesmo pode detectar eventuais falhas, caso tenha conhecimento sobre o assunto.

A base de conhecimento aqui apresentada possui 26 regras. É uma base pequena que pode ser modificada e melhorada em novas versões. No momento serve ao propósito de demonstração da funcionalidade criada.

Regras do Sistema Especialista:

Regra 1

```

IF mobility system = UNKNOWN
OR bio_aux_3 = UNKNOWN
OR growth rate maximum = UNKNOWN
OR oxygen maximum specific = UNKNOWN
OR pH optimal product = UNKNOWN
OR pH variations sensitivity = UNKNOWN
OR bio_aux_2 = No
OR mob_aux = No
OR viscosity effect = UNKNOWN
OR viscosity type = UNKNOWN
OR sele_aux_2 = UNKNOWN
OR cGMP requirements = UNKNOWN
OR final output = UNKNOWN
OR foam_aux_3 = UNKNOWN

```

OR final product use = UNKNOWN
OR cleaning problems = UNKNOWN
OR temperature optimum = UNKNOWN
OR heat transfer = UNKNOWN
OR cooled = UNKNOWN
OR cooled quickly = UNKNOWN
OR temperature extremes = UNKNOWN
OR pH extremes = UNKNOWN
OR corrosive produced = UNKNOWN
OR solvents produced = UNKNOWN
OR kinetic = UNKNOWN
OR meas_aux_2 = UNKNOWN
THEN Initial information = Uncomplete

Regra 2

IF NOT meas_aux_2 = UNKNOWN
THEN Initial information = Complete

Regra 3

IF measurements essential = UNKNOWN
THEN meas_aux_1 = No

Regra 4

IF NOT measurements essential = UNKNOWN
THEN meas_aux_1 = Yes

Regra 5

IF meas_aux_1 = Yes
AND measurements essential = Yes
THEN meas_aux_2 = No

Regra 6

IF meas_aux_1 = Yes
AND measurements essential = Yes
AND measurements essential type = UNKNOWN
THEN meas_aux_2 = Yes

Regra 7

IF foam produced = UNKNOWN
THEN foam_aux_1 = No

Regra 8

IF NOT foam produced = UNKNOWN
THEN foam_aux_1 = Yes

Regra 9

IF foam_aux_1 = Yes
AND foam produced = Yes
THEN foam_aux_2 = No

Regra 10

IF foam_aux_1 = Yes
AND foam produced = Yes
AND foaming harmful = UNKNOWN
AND foam broken = UNKNOWN
THEN foam_aux_2 = Yes

Regra 11

IF foam_aux_2 = No

OR foam_aux_2 = Yes
AND foam broken = Antifoam agent
THEN foam_aux_3 = No

Regra 12

IF foam_aux_2 = Yes
AND foam broken = Antifoam agent
AND antIFoam = UNKNOWN
THEN foam_aux_3 = No

Regra 13

IF selective conditions = UNKNOWN
THEN sele_aux_1 = No

Regra 14

IF NOT selective conditions = UNKNOWN
THEN sele_aux_1 = Yes

Regra 15

IF sele_aux_1 = Yes
AND selective conditions = Yes
THEN sele_aux_2 = No

Regra 16

IF sele_aux_1 = Yes
AND selective conditions = Yes
AND selective conditions type = UNKNOWN
THEN sele_aux_2 = Yes

Regra 17

IF oxygen requirements = UNKNOWN
THEN oxi_aux_1 = No

Regra 18

IF NOT oxygen requirements = UNKNOWN
THEN oxi_aux_1 = Yes

Regra 19

IF oxi_aux_1 = Yes
AND oxygen requirements = Yes
THEN oxi_aux_2 = No

Regra 20

IF oxi_aux_1 = Yes
AND oxygen requirements = Yes
AND oxygen requirements type = UNKNOWN
AND oxygen minimum level = UNKNOWN
THEN oxi_aux_2 = Yes

Regra 21

IF mobility system = Free
AND shear sensitive = UNKNOWN
AND agitation rate damage = UNKNOWN
THEN mob_aux = No

Regra 22

IF mobility system = Free
AND shear sensitive = UNKNOWN
AND agitation rate damage = UNKNOWN

THEN mob_aux = Yes

Regra 23

IF biological system = Microorganism
AND hyphae produced = UNKNOWN
AND pellets produced = UNKNOWN
AND spores produced = UNKNOWN
AND lysis = UNKNOWN
AND exopolysaccharides = UNKNOWN
AND oxi_aux_2 = UNKNOWN
AND density maximum = UNKNOWN
AND CO2 sensitive = UNKNOWN
AND pH optimal growth = UNKNOWN
AND light requirements = UNKNOWN
AND wall growth = UNKNOWN
AND medium sterilized = UNKNOWN
THEN bio_aux_1 = Yes

Regra 24

IF biological system = Enzyme
AND denaturation = UNKNOWN
THEN bio_aux_2 = Yes

Regra 25

IF bio_aux_1 = Yes
AND bio_aux_2 = UNKNOWN
THEN bio_aux_3 = No

Regra 26

IF bio_aux_1 = UNKNOWN
AND bio_aux_2 = Yes
THEN bio_aux_3 = Yes

No próximo item será mostrado como estas variáveis e regras foram criadas no editor de base "Base Builder" e finalizando este capítulo será demonstrado o uso do módulo 3, o Bio-PSA Expert.

7.3. DESENVOLVIMENTO DA FUNCIONALIDADE DE EDIÇÃO DE BASE DE CONHECIMENTO

O primeiro passo para o desenvolvimento do S.E é a construção de uma base de dados com regras em um formato que possibilite o mecanismo de inferência acessá-las. O *Base Builder*, foi baseado na versão original do Expert SINTA (LIA, 1998). As modificações são principalmente de ordem visual, incluindo tradução para a língua inglesa, salvo as

adaptações para a versão 6.0 do compilador Delphi e outras mudanças.

Ao contrário da maioria dos Shells existentes para criação de base de conhecimento, que utilizam uma pseudolinguagem (escrita em um editor de texto), o Expert SINTA e conseqüentemente o *Base Builder* possuem um conjunto de editores de entidades, como variáveis, perguntas e explicações, regras, contextos de ajuda, distribuídos em janelas distintas. A seguir serão explicados os passos para criação da base de conhecimento apresentada no item anterior no *Base Builder*.

A Figura 7.7 mostra a janela principal do “*Base Builder*” com a caixa de diálogo para criação de uma nova base de conhecimento.

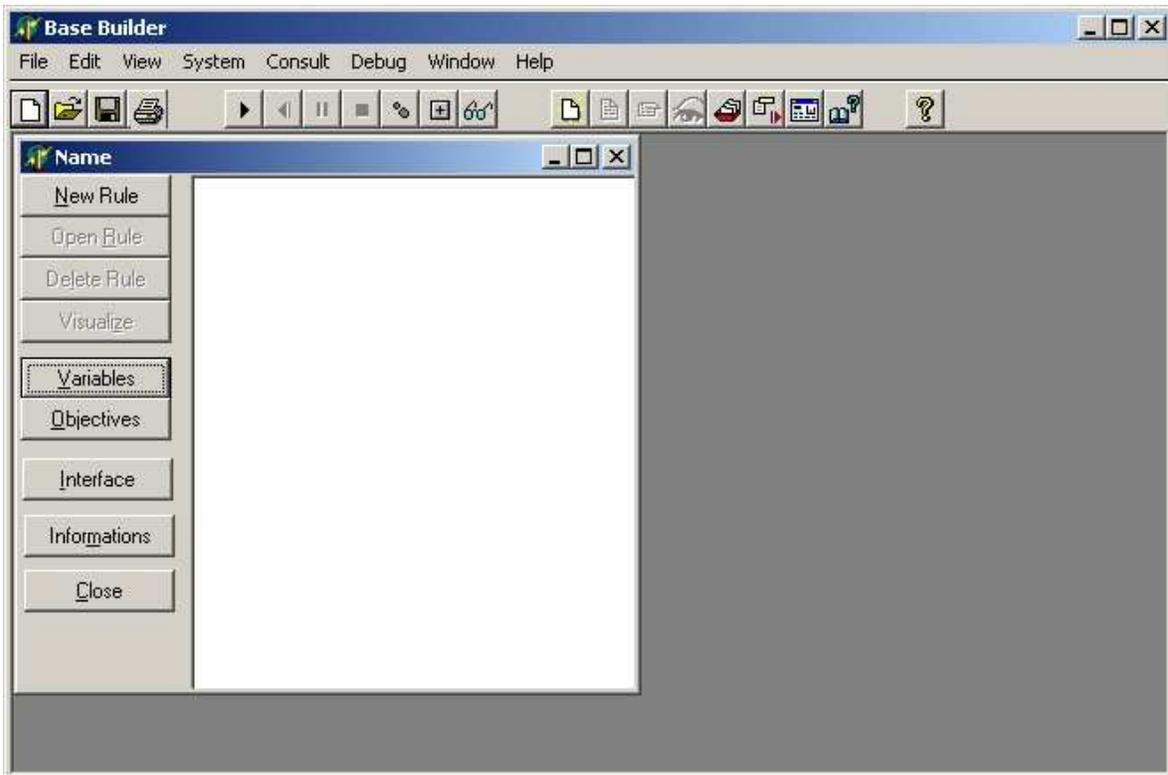


Figura 7.7: Janela principal do *Base Builder*.

Primeiramente deve-se preencher as informações do S.E clicando no botão “Informations” na CxDlg “Name” como mostra a Figura 7.8. Em seguida salvar a base com o nome, no caso,

"Initial_Information". Será criado um arquivo de extensão .bcm que conterà todas as regras do S.E e que será utilizado pelo software de consulta. Conforme explanado no item 7.1 nos primeiros estudos do Expert SINTA e sua biblioteca de componentes constatou-se que a versão original do SINTA estava gerando um arquivo .bcm incompatível com os componentes da biblioteca. Assim a base de conhecimento gerada no editor de base não podia ser lida no software de consulta que foi construído. A recompilação e padronização resolveram este problema.

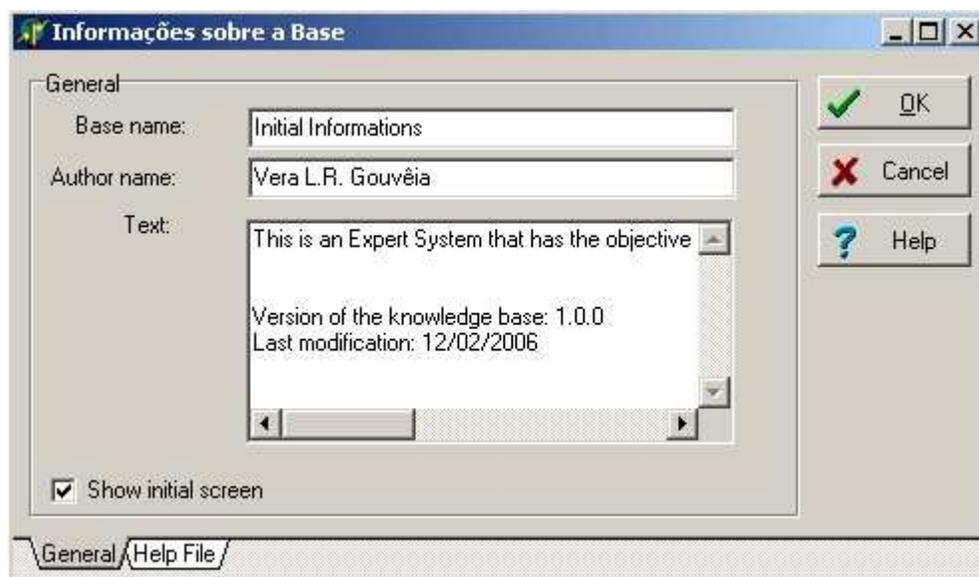


Figura 7.8: Caixa de diálogo com informações do S.E.

Após salvar a base de conhecimento dá-se início a inclusão das variáveis do S.E. A CxDlg para inclusão de regras deve estar com a aparência mostrada na Figura 7.9. Clicando no botão "Variables" abre-se a CxDlg mostrada na Figura 7.10. Definem-se então as variáveis envolvidas e seus respectivos conjuntos de valores possíveis. Para o exemplo incluíram-se as variáveis contidas na Tabela 7.1 do item 7.2.1.

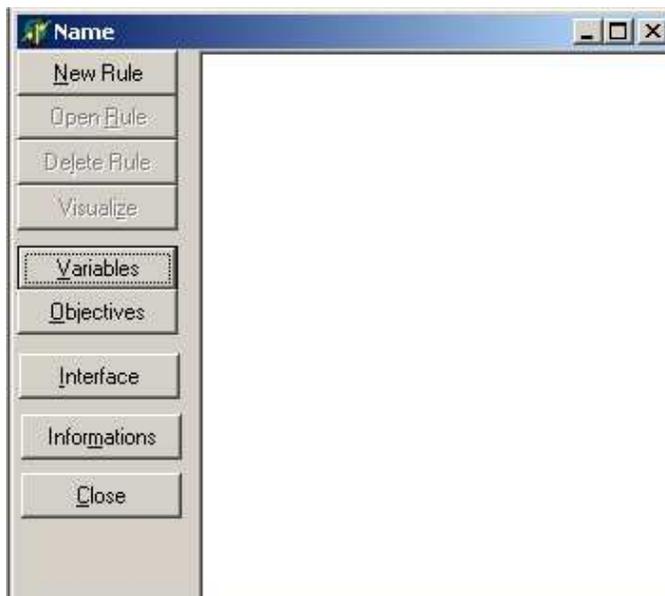


Figura 7.9: Caixa de Diálogo para inclusão de regras do S.E.

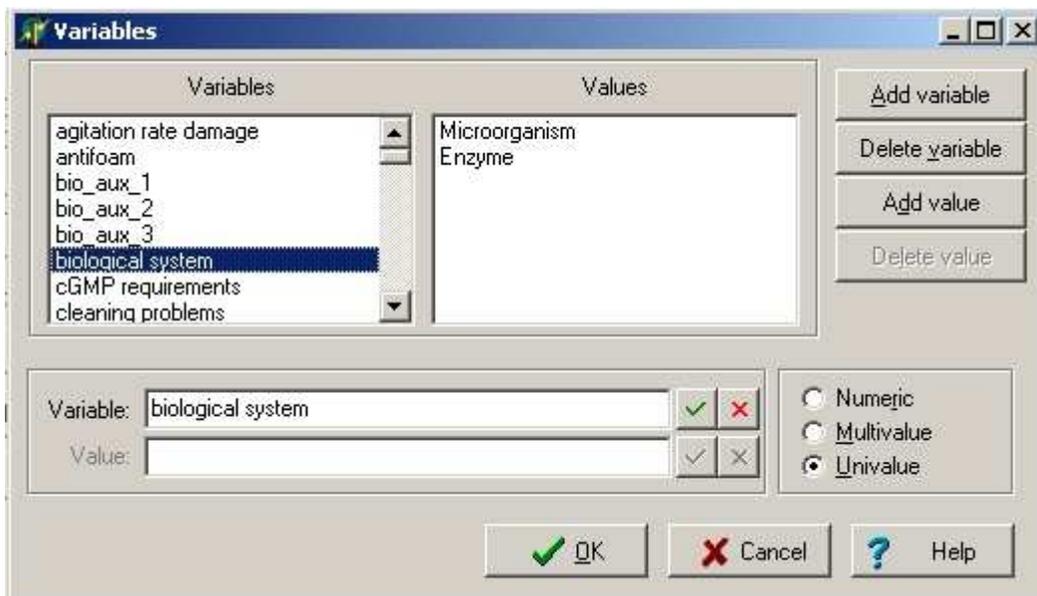


Figura 7.10: Caixa de Diálogo para inclusão de variáveis do S.E.

Após definição das variáveis deve-se mostrar quais são os objetivos do S.E. Na CxDlg da Figura 7.9 clicar em "Objectives". Uma CxDlg para definições da(s) variável(is) objetivo se abrirá como mostra a Figura 7.11.

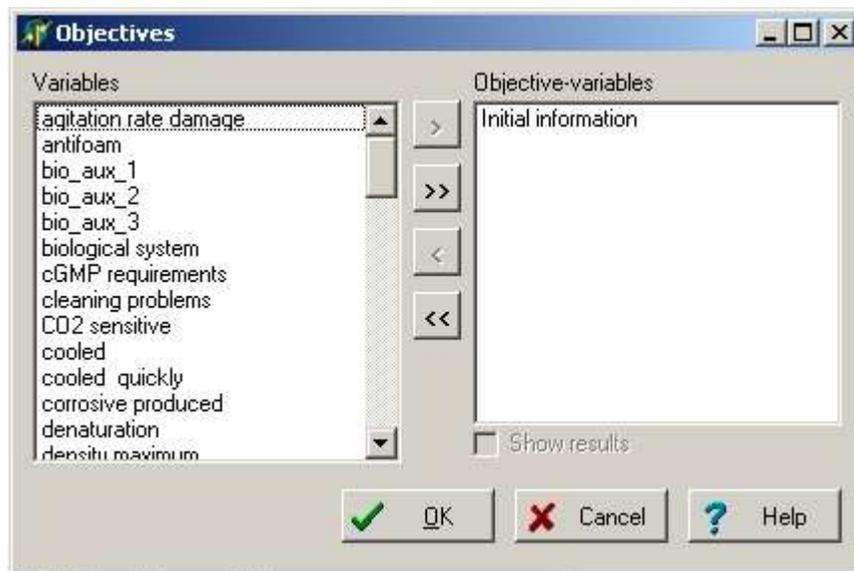


Figura 7.11: Caixa de Diálogo para definição da variável-objetivo do S.E.

Como já dito o *Expert Builder* permite a geração mais fácil de interface gráfica com usuário. Para isto faz-se necessário a definição de quais variáveis terão uma pergunta associada a ela e qual será esta pergunta. O desenvolvedor da base do conhecimento poderá também definir se será ou não necessário atribuir um grau de confiança (CNF) a esta variável. A Tabela 7.3 do item 7.2.2 mostra os valores atribuídos a cada pergunta e a Figura 7.12 a CxDlg correspondente. Em "Question help" podem ser adicionadas explicações para o motivo da pergunta.

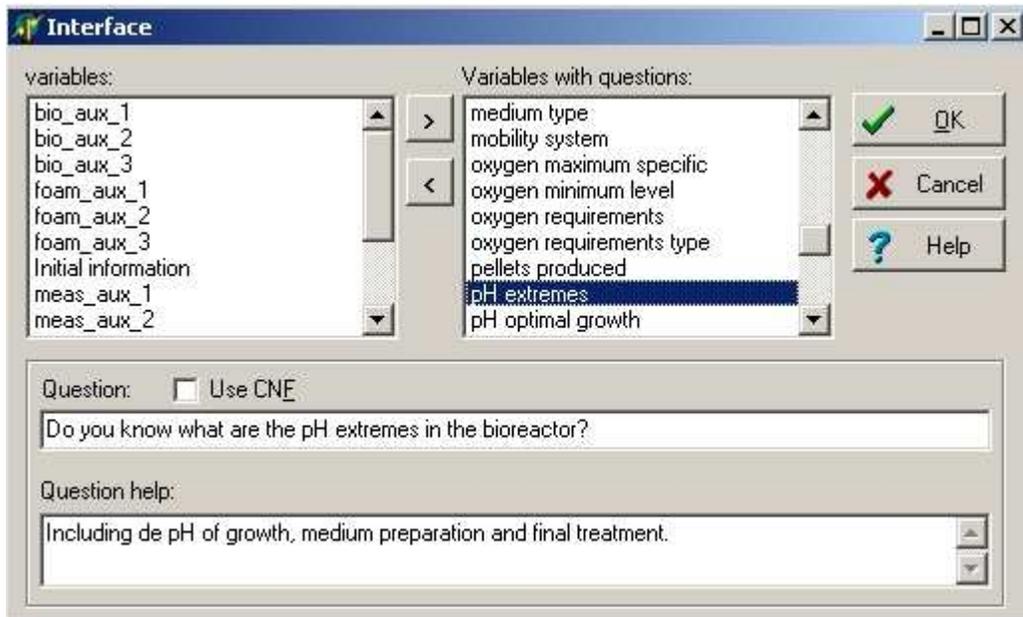


Figura 7.12: Caixa de Diálogo para auxílio no desenvolvimento de interfaces.

Definidas as variáveis, seus valores, os objetivos do S.E e a interface, o próximo passo é montar as regras. Ao clicar no botão "New Rule" mostrado na Figura 7.9 abre-se a CxDlg da Figura 7.13. O usuário define a ordem da regra e se ela segue algum modelo. Depois de clicado no botão "ok" abre-se a CxDlg mostrada na Figura 7.14. Deve-se colocar o nome desta regra e adicionar as premissas e demais elementos da regra conforme é mostrado na Figura 7.15 e na Figura 7.16.

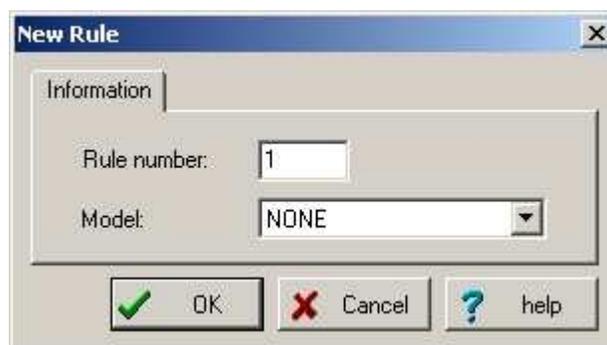


Figura 7.13: Caixa de Diálogo para inclusão de nova regra.



Figura 7.14: Caixa de Diálogo para edição de regras.

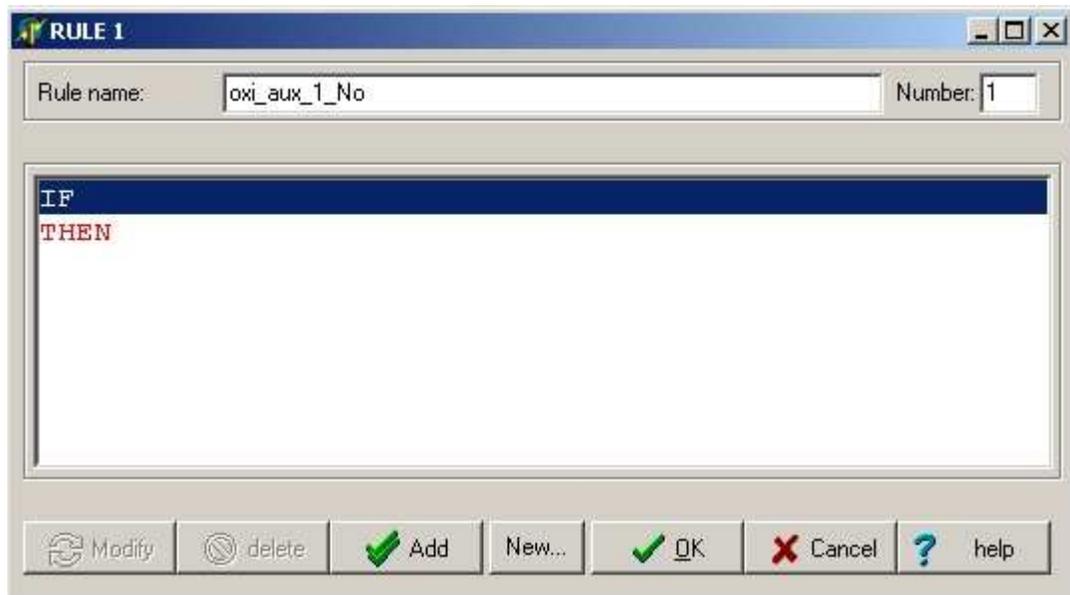


Figura 7.15: Caixa de Diálogo de edição de visualização e regras.

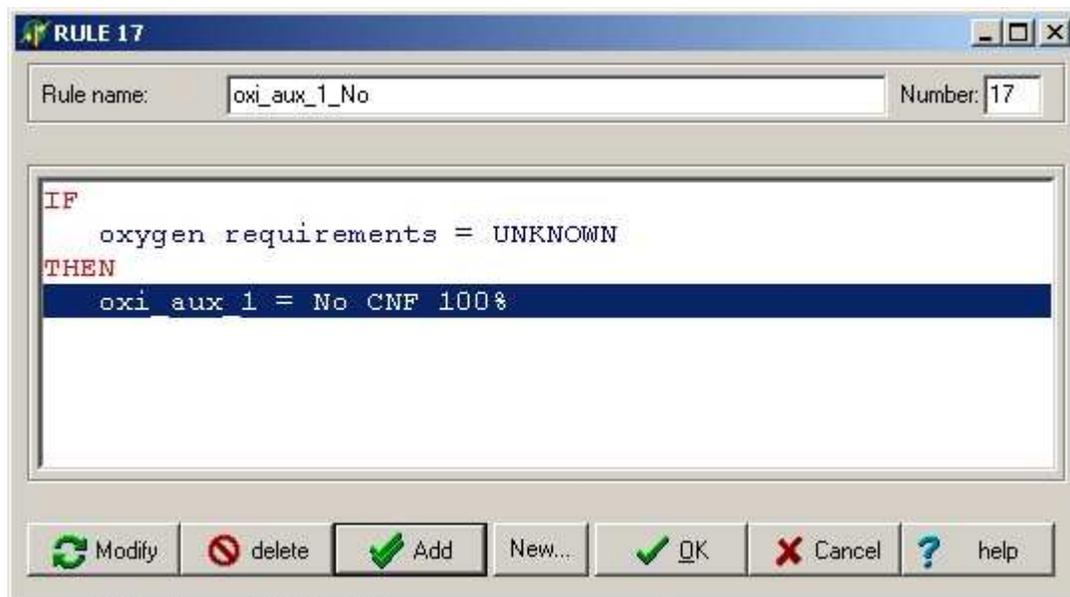


Figura 7.16: Caixa de Diálogo de edição de visualização e regras.

As regras do S.E de exemplo são mostradas no item 7.2.3. Para se montar as regras deve se ter um profundo conhecimento do modo de operação do mecanismo de inferência.

Finalizada a base de conhecimento o "*Base Builder*" irá gravar todas as informações no arquivo .bcm que será utilizado na funcionalidade para consulta Bio-PSA Expert desenvolvida utilizando os componentes da Expert SINTA VCL e mostrada no próximo item.

7.4. DESENVOLVIMENTO DA FUNCIONALIDADE DE CONSULTA

A primeira ação do usuário é abrir uma base de conhecimento previamente elaborada no "*Base Builder*". Ao se abrir a base o usuário já poderá visualizar todas as variáveis e as regras. É importante que o usuário possa ver como o S.E foi construído uma vez que a funções do S.E é deixar claro como ele chega a uma resposta para o problema. Ele mostra a resposta e a justifica de acordo com as regras implementadas. Se o usuário acha que a resposta não é correta ele mesmo pode ver em qual regra o S.E foi "induzido ao erro". Esta regra pode ser modificada posteriormente pelo próprio usuário. A Figura 7.17 mostra o módulo 3 com a base de conhecimento "*Initial_Information.bcm*" aberta e a Figura 7.18 a *cxDlg* de visualização das regras.

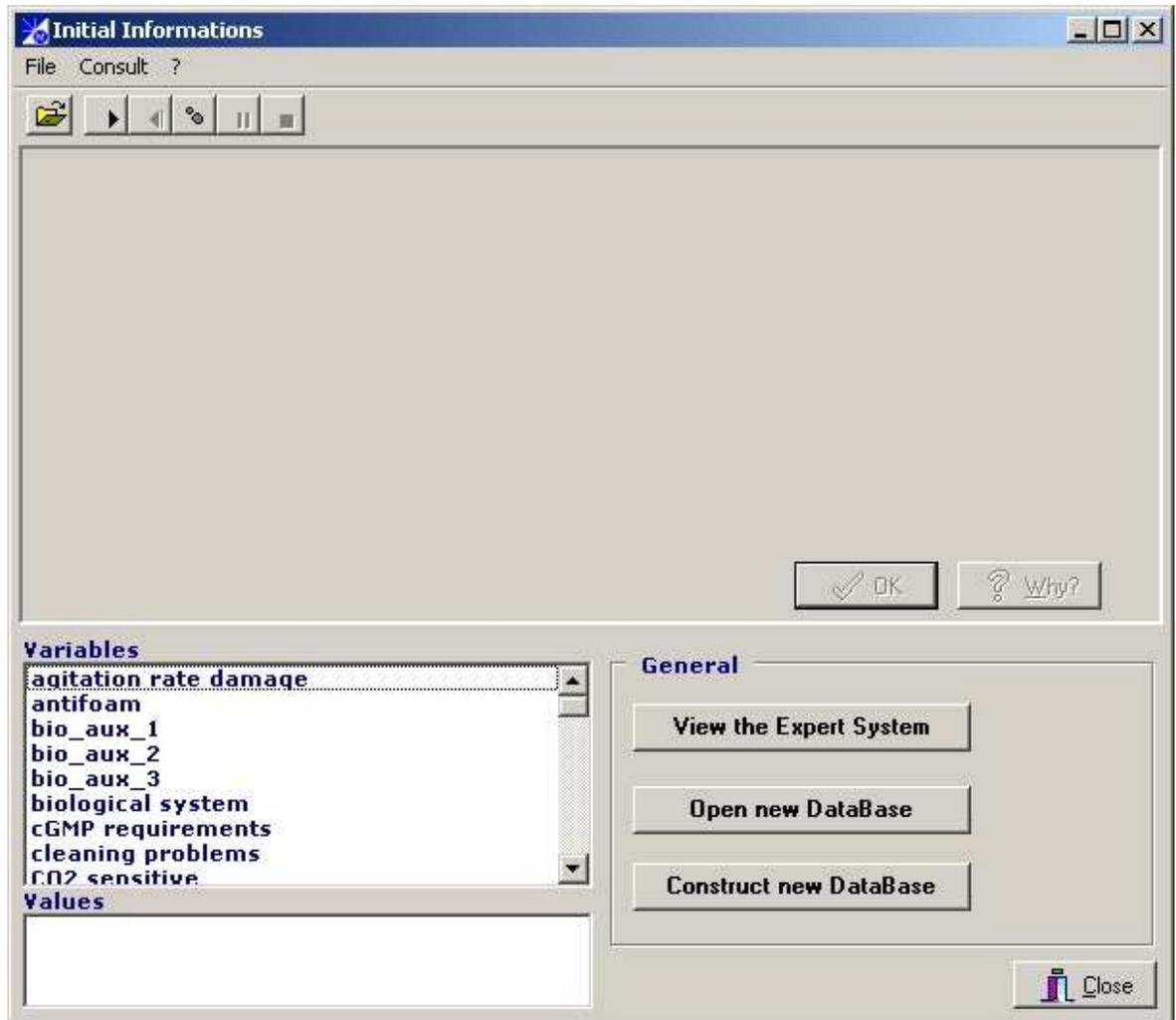


Figura 7.17: Janela principal com uma base de conhecimento aberta. Módulo 3: S.E

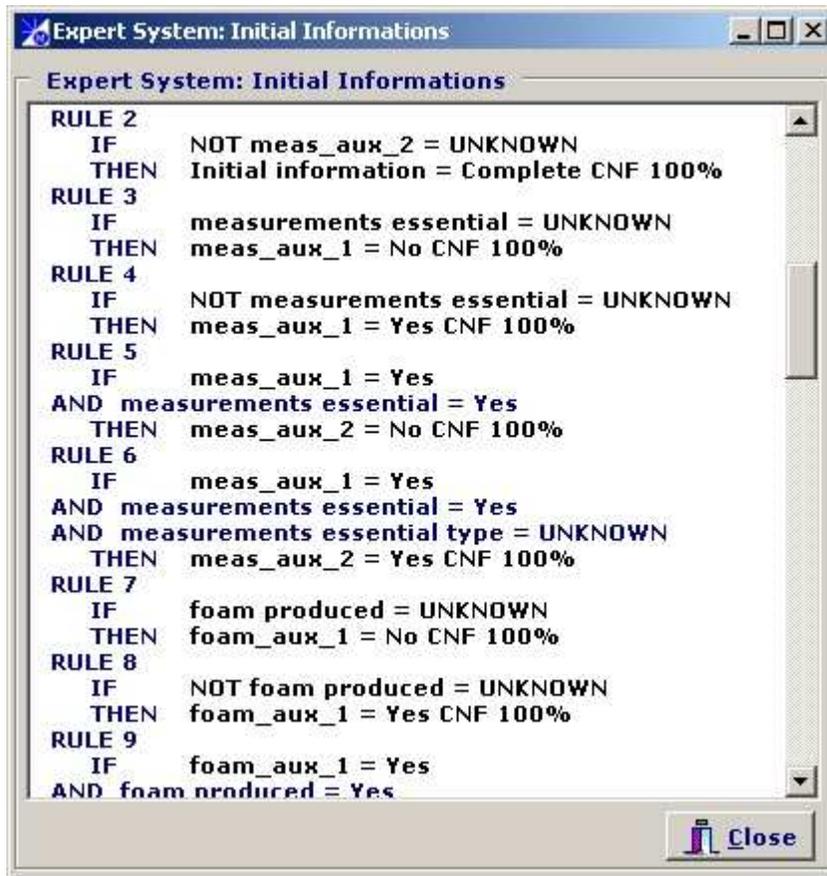


Figura 7.18: Caixa de Diálogo para visualização das regras.
Módulo 3: S.E

No canto superior esquerdo na Janela principal há uma seqüência de botões  que controlam a consulta ao S.E. O primeiro botão inicia a consulta, o quarto pausa e o último pára. O segundo e o terceiro são para movimentação. A Figura 7.19 mostra uma das perguntas realizadas. Ao fim da consulta é exibida a tela de resultados que mostra o resultado da consulta, o histórico de consulta do S.E, os valores recebidos por todas as variáveis e as regras dos S.E conforme mostrado na Figura 7.20, Figura 7.21, Figura 7.22 e Figura 7.23.

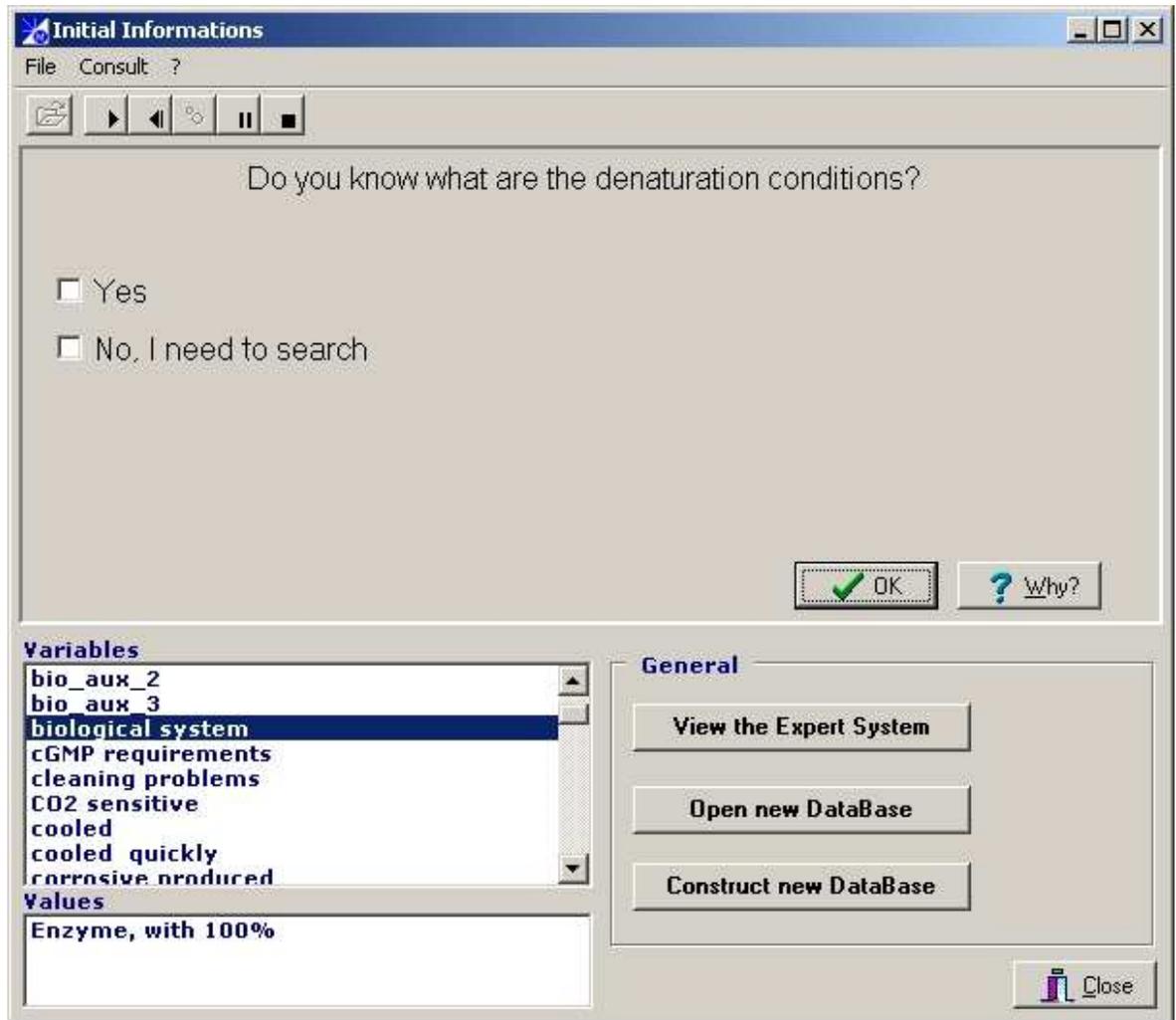


Figura 7.19: Janela principal em modo de consulta. Módulo 3:
S.E

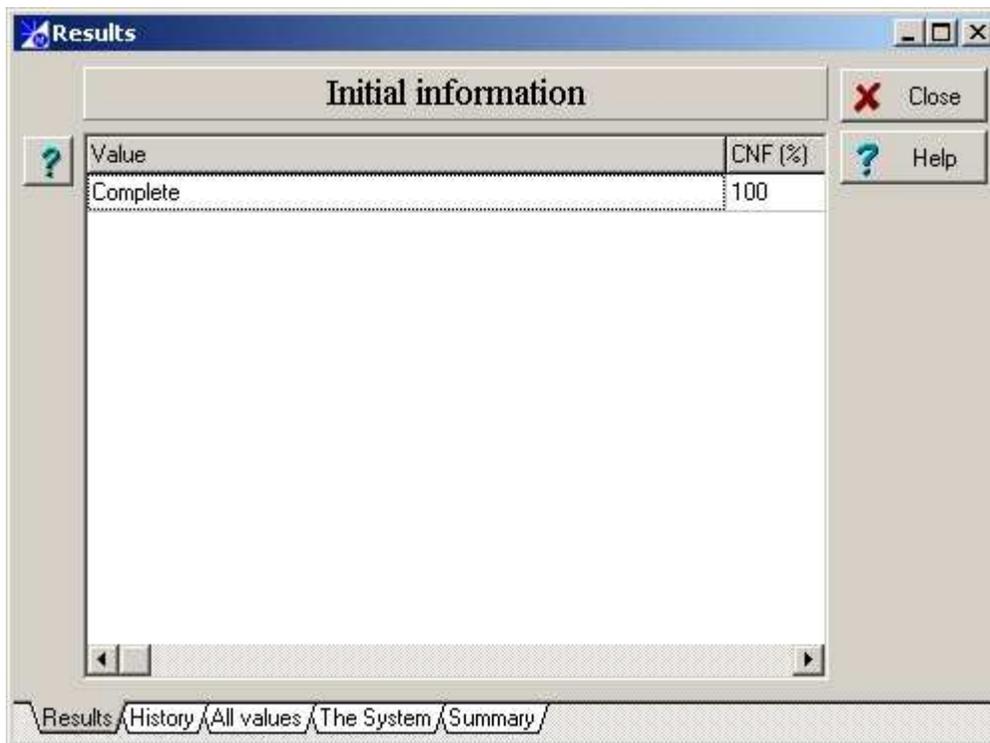


Figura 7.20: Caixa de Diálogo dos Resultados/Results. Módulo 3: S.E

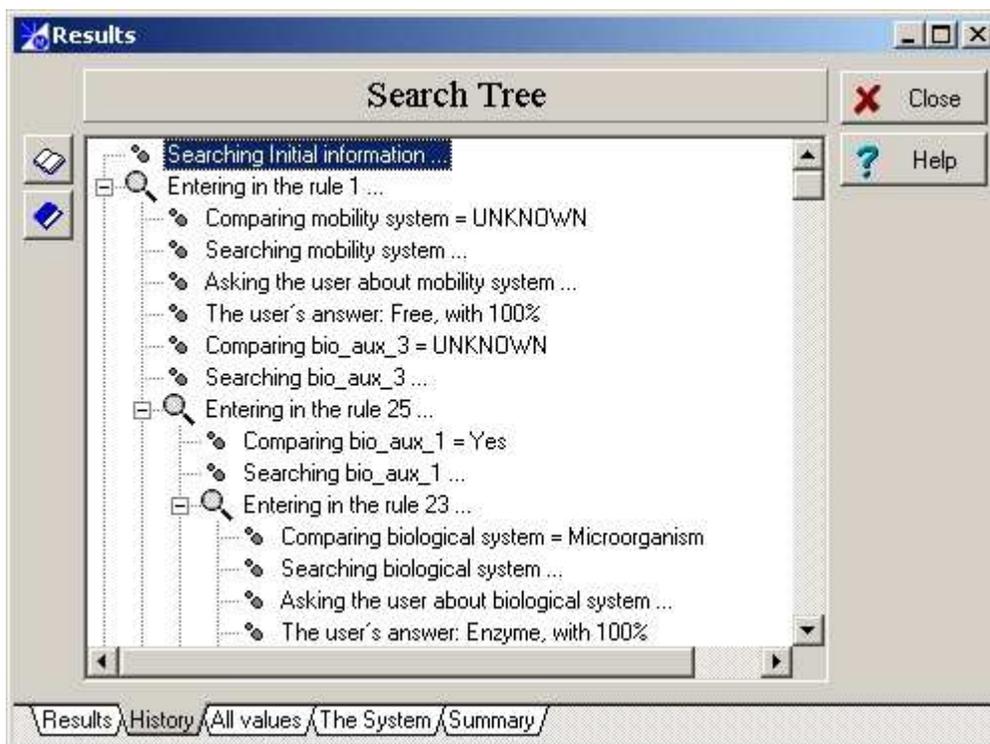


Figura 7.21: Caixa de Diálogo dos Resultados/History. Módulo 3: S.E

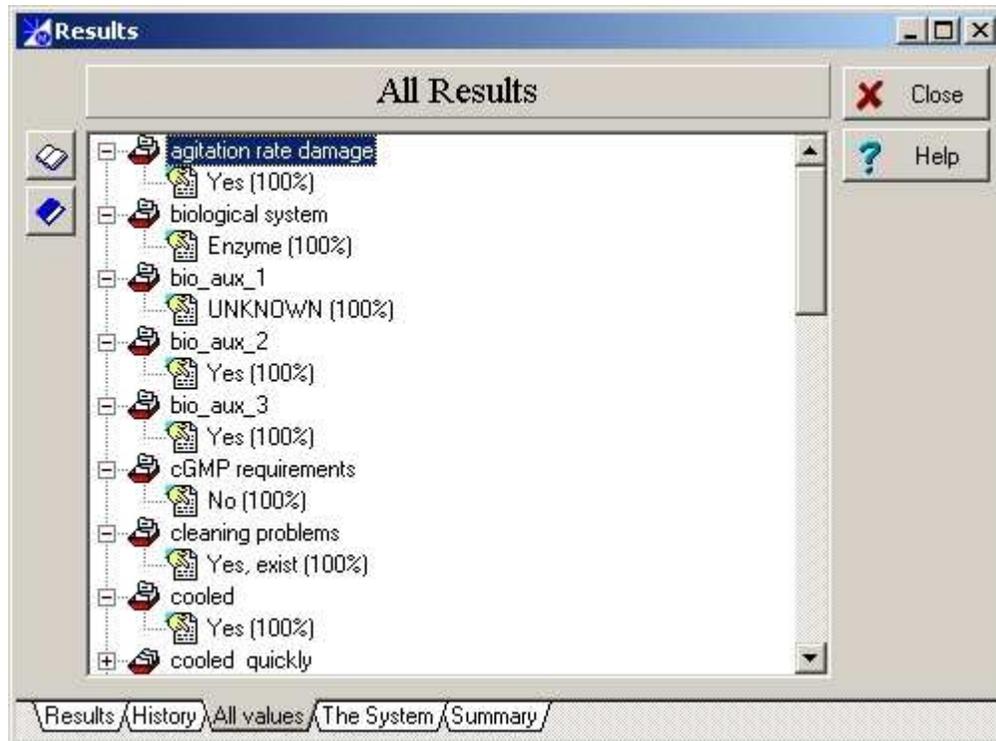


Figura 7.22: Caixa de Diálogo dos Resultados/AllValues.
Módulo 3: S.E

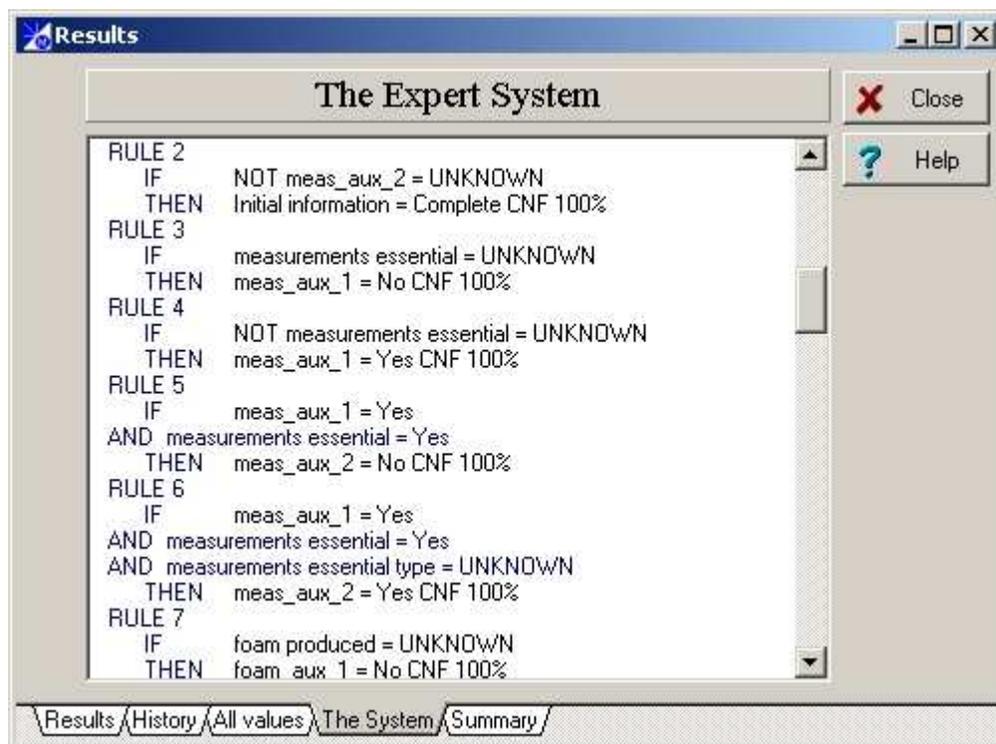


Figura 7.23: Caixa de Diálogo dos Resultados/The System.
Módulo 3: S.E

Na Figura 7.24 é possível visualizar a caixa de texto com um resumo das variáveis questionadas ao usuário onde ele poderá copiar e imprimir para a busca de maiores informações.

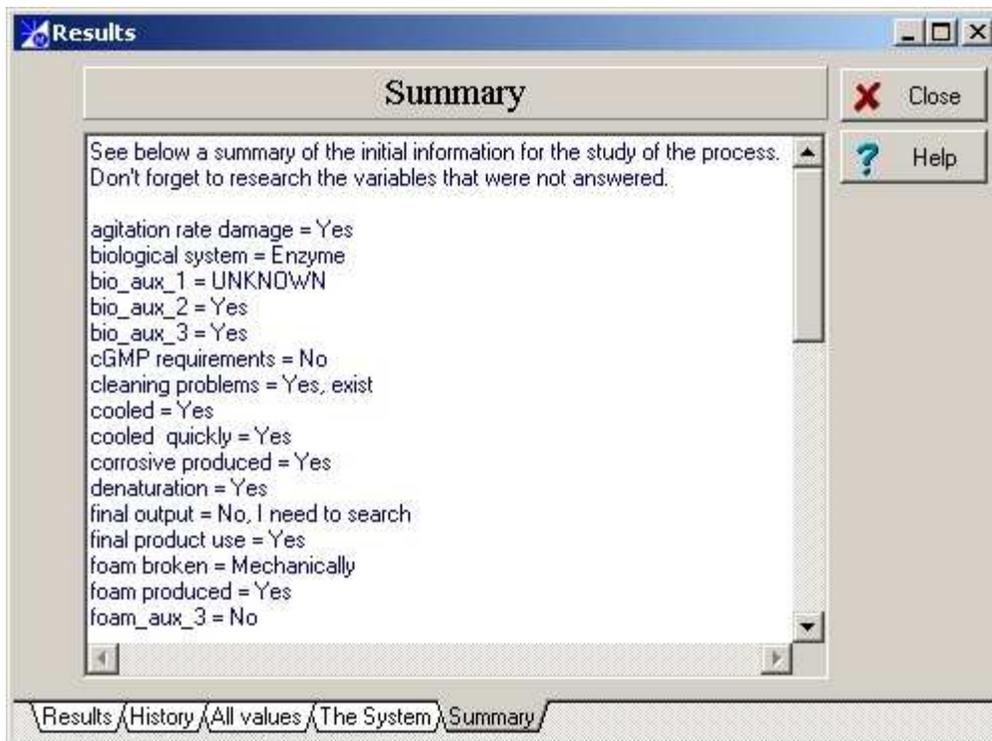


Figura 7.24: Caixa de Diálogo dos Resultados/Summary.
Módulo 3: S.E

Para cada pergunta ao usuário este pode perguntar ao S.E o porque da pergunta através no botão  (ver Figura 7.19) que chama uma caixa de diálogo explicativa conforme mostra a Figura 7.25. Caso o desenvolvedor da base tenha associado à variável uma ajuda particular conforme mostra a Figura 7.12 esta será exibida no lugar das informações da Figura 7.25.

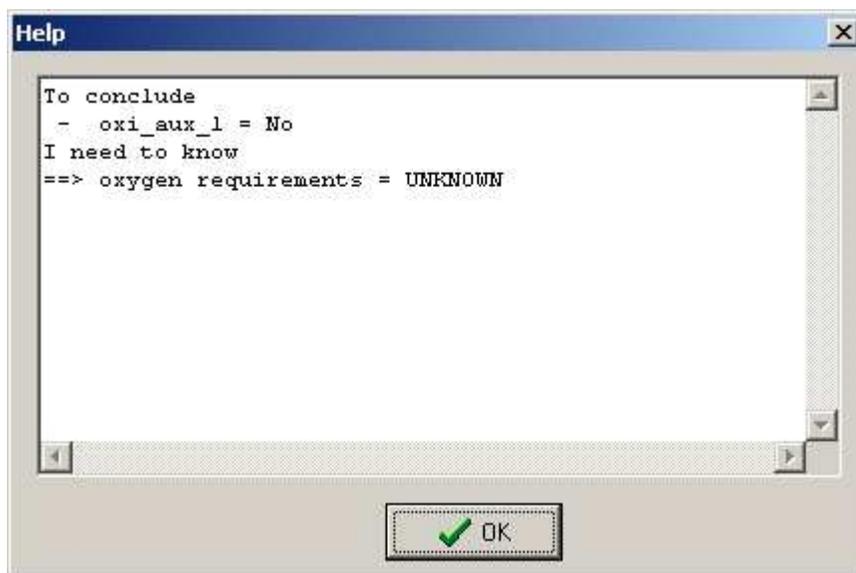


Figura 7.25: Caixa de Diálogo de explicação a uma pergunta.
Módulo 3: S.E

7.5. CONCLUSÕES

Como visto, este módulo engloba uma funcionalidade para desenvolvimento de S.E chamada Bio-PSA Expert. Esta possui caráter generalista e como estudo de caso foi desenvolvido um S.E que visa auxiliar o estudo e análise de Bioprocessos através da aquisição de informações iniciais. O profundo entendimento de como funciona o mecanismo de inferência do S.E é essencial para que o desenvolvedor da base, conhecido como Engenheiro do Conhecimento, extraia as informações necessárias de um especialista humano e as coloque em forma de uma base de conhecimento no formato necessário. O uso de Bibliotecas de Componentes Visuais auxiliou o desenvolvimento dos aplicativos, entretanto foi necessário o conhecimento aprofundado do código destes componentes para a correção de erros e compatibilidade de versões.

Segue-se no próximo capítulo a descrição da funcionalidade de R.N.As.

CAPÍTULO 8

8. BIO-OSA: MÓDULO 4

REDES NEURAIS ARTIFICIAIS

Prefácio

O treinamento de Redes Neurais Artificiais contido neste módulo visa o desenvolvimento de modelos híbridos e "caixa preta" dos Bioprocessos implementados nesta versão do Bio-PSA. Entretanto sua utilização é mais abrangente devido ao caráter generalista da funcionalidade desenvolvida. O item 8.1 apresenta de forma objetiva as ferramentas desta funcionalidade e seu modo de operação.

8.1. REDE NEURAL ARTIFICIAL

8.1.1. Características da funcionalidade

O programa de R.N.A implementado possui um número variável de camadas e de neurônios. Os pesos são atualizados a cada par entrada/saída apresentado à rede. As camadas intermediárias e de saída possuem neurônios Bias que são atualizados pelo programa. É calculado também o erro composto relativo ao conjunto de dados e o programa pára o treinamento se este erro atingir um valor menor que o valor

fornecido pelo usuário. Todos os pesos são inicializados automaticamente pelo programa. A taxa de aprendizado é fixa e estabelecida pelo usuário. A rede possui também o termo de momento para evitar oscilações.

A Figura 8.1 mostra um fluxograma do programa de treinamento da rede cuja finalidade é ajustar um conjunto de pesos.

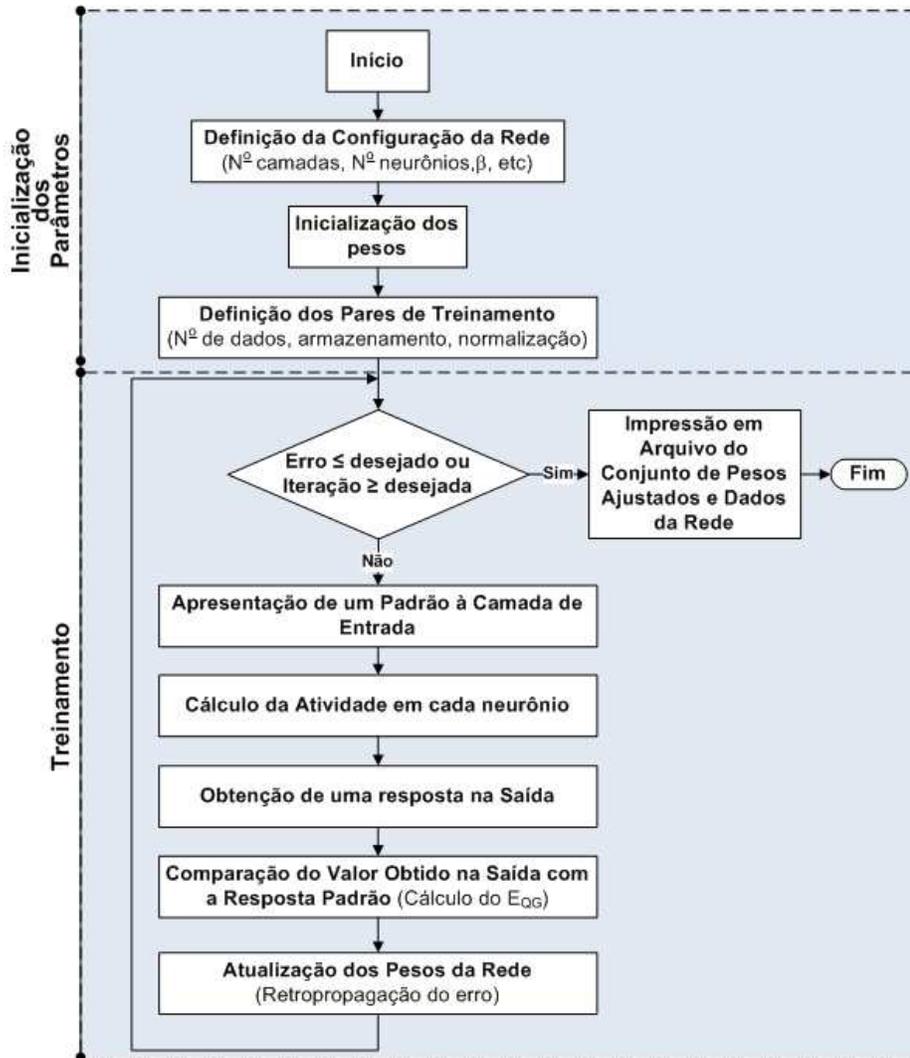


Figura 8.1: Fluxograma do programa de treinamento das Redes Neurais Artificiais.

8.1.2. Dados iniciais e treinamento.

A configuração da Rede Neural Artificial a ser treinada é definida na janela principal do módulo 4 apresentada na Figura 8.2. Atualmente existe apenas uma

opção em cada ComboBox (Caixa de Combinação) que poderá receber novas opções futuramente. Um exemplo é a opção de tipo de função de ativação que possui apenas a opção sigmoideal podendo ser acrescentadas outras funções como mostrado no capítulo 2. A Figura 8.3 mostra a utilização de caixa de diálogo para procura de arquivos, no exemplo será indicado o arquivo que possui os dados para validação da Rede Neural Artificial.

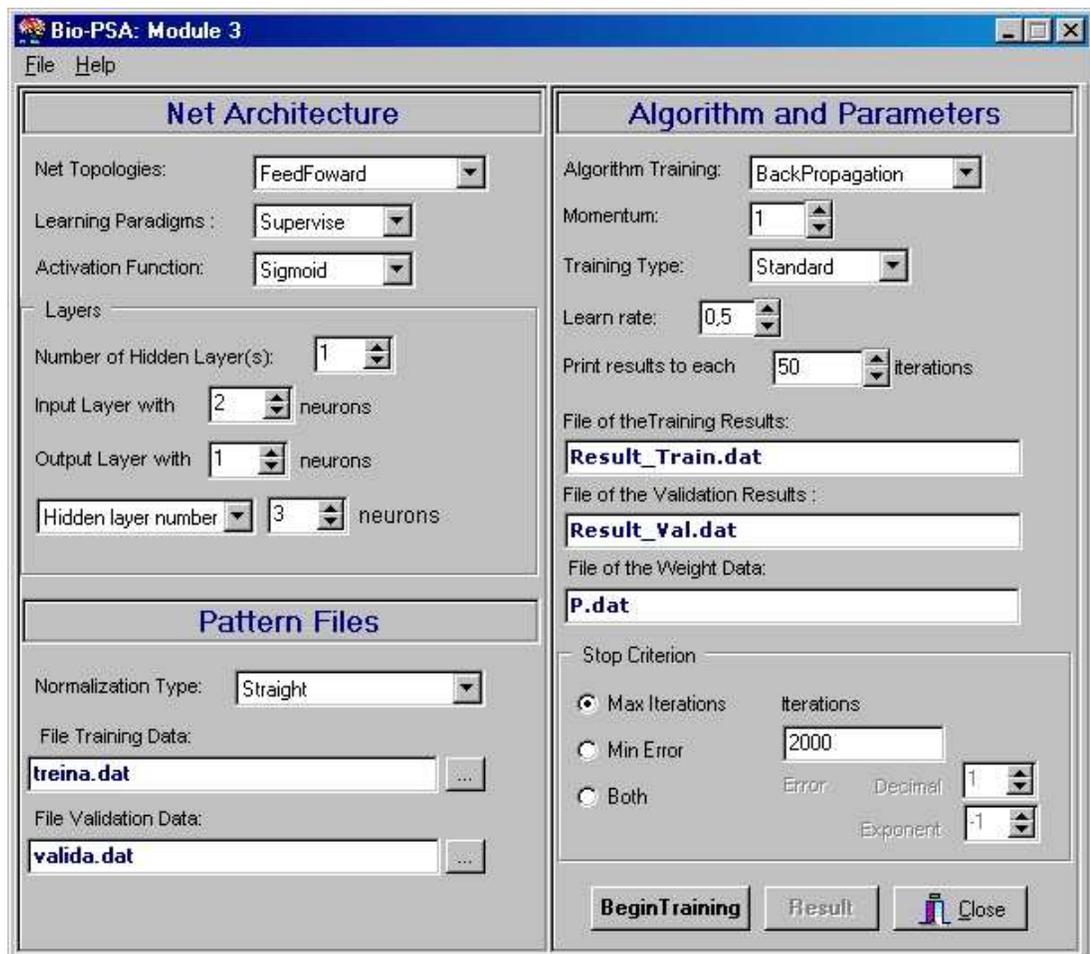


Figura 8.2: Janela principal do programa de Rede Neural Artificial.

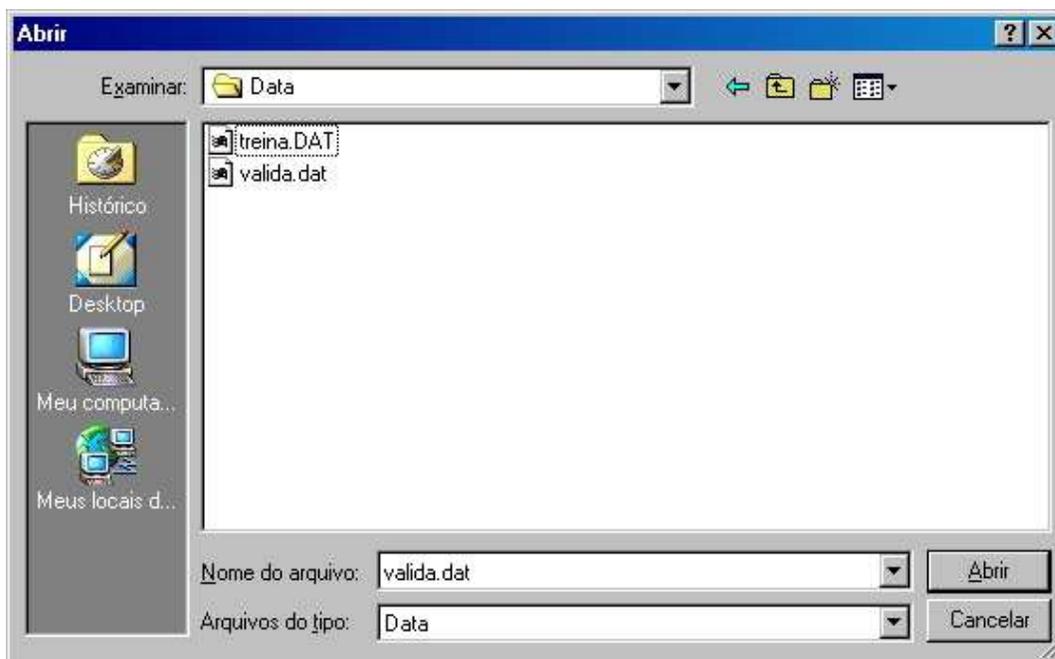


Figura 8.3: Caixa de diálogo para escolha de arquivo de dados. Módulo 4: R.N.A

Após determinação de todos os dados iniciais necessários o botão de início do treinamento é habilitado ao usuário. Ao se iniciar o treinamento aparece uma CxDlg, como mostrado na Figura 8.4. Conforme o critério de parada escolhido o usuário acompanhará o incremento da variável por esta caixa.



Figura 8.4: Caixa de diálogo de treinamento. Módulo 4: R.N.A

8.1.3. Resultados.

A CxDlg dos resultados é mostrada na Figura 8.5. No painel "Training information" são apresentados os resultados finais. O gráfico logo abaixo mostra como o erro composto variou durante as iterações. No painel de representação dos dados são apresentados os erros relativos médio e erro relativo médio em % para cada variável de saída. Neste caso há somente uma variável de saída. O erro relativo para o treinamento é calculado comparando-se os dados fornecidos pela rede versus os dados de treinamento. Estes dados são mostrados em caixas de edição que permitem a cópia.

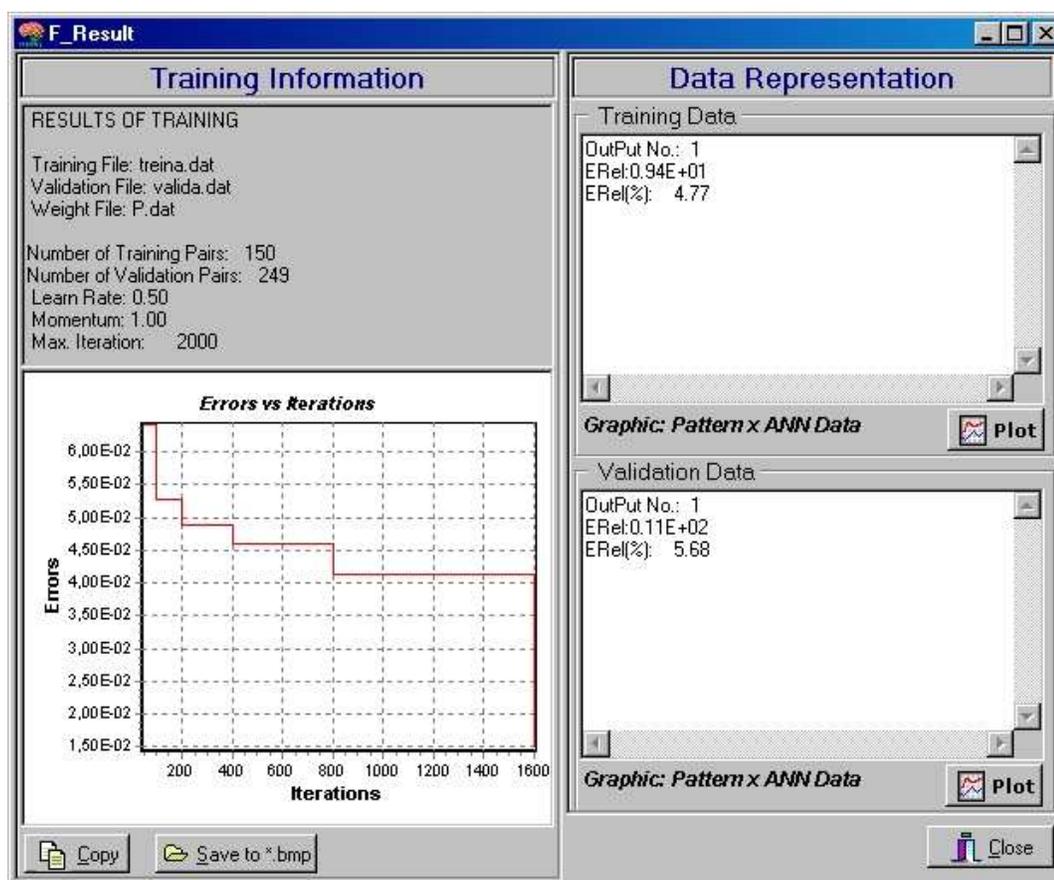


Figura 8.5: Caixa de diálogo dos resultados. Módulo 4: R.N.A

Uma ferramenta interessante do Delphi é o TeeChart que permite a edição de gráficos. Utilizando este componente foram desenvolvidas CxDlg que mostram a plotagem dos dados da R.N.A versus dados de treinamento (Figura 8.6) e

validação (Figura 8.7) e o gráfico contido na Figura 8.5. Nos gráficos, quanto mais próximos os pontos da reta melhor foi o treinamento. É possível copiar estes gráficos para outros softwares (Windows) bem como salvá-los como uma figura BMP. Com isto é eliminado o uso de outros softwares para confecção de gráficos e análise dos resultados. São também gerados arquivos dos dados caso o usuário deseje aplicar outros tipos de análises de resultados.

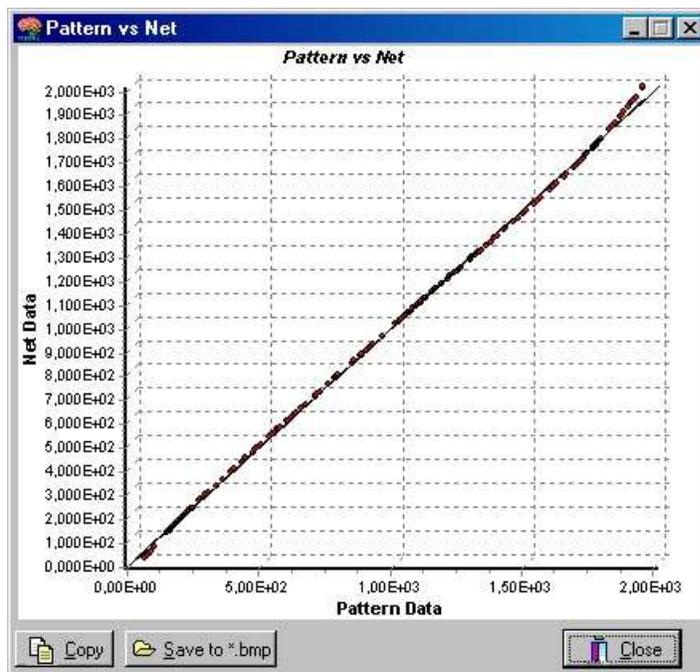


Figura 8.6: Gráficos para análise do treinamento. Módulo 4:
R.N.A

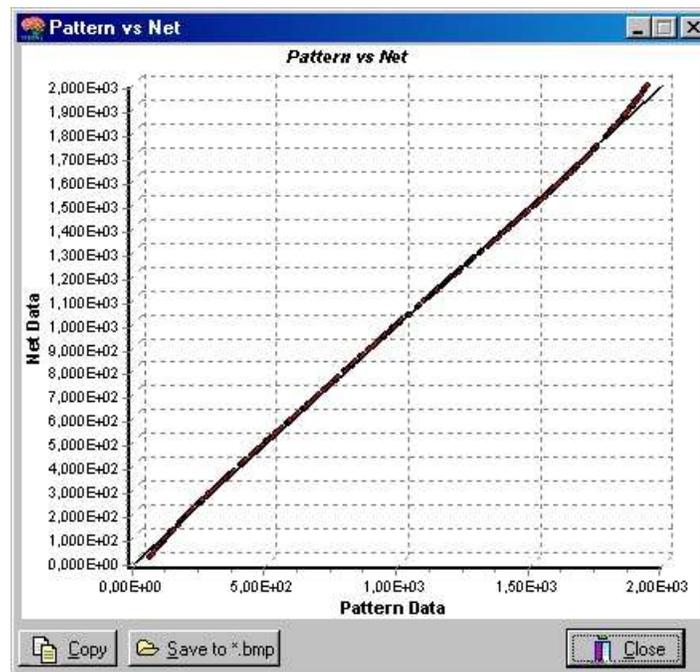


Figura 8.7: Gráficos para análise da validação. Módulo 4: R.N.A

8.2. CONCLUSÕES

Este módulo é de grande importância no Bio-PSA, seja auxiliando no treinamento de R.N.As contidas nas funcionalidades do módulo 1 como também em R.N.As criadas pelo usuário para solução de problemas específicos. Foram escolhidas opções de configuração mais utilizadas podendo ser acrescentadas novas funções em versões posteriores. O desenvolvimento desta funcionalidade permitiu o uso desta ferramenta de I.A sem a necessidade de outros softwares específicos, em sua maioria versões comerciais pagas.

CAPÍTULO 9

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O aplicativo Bio-PSA em sua versão atual (v.1.0) cria uma estrutura básica para a implementação de novas funcionalidades relacionadas ao projeto e operação de processos biotecnológicos. As ferramentas de Inteligência Artificial implementadas, Redes Neurais Artificiais e Sistemas Especialistas, possuem um caráter generalista sendo que o limite de suas aplicações é definido apenas pelo próprio usuário. O Bio-PSA tem caráter instrutivo e podendo ser utilizado em meio acadêmico e industrial.

As funcionalidades implementadas no módulo 1 permitem aos usuário total acesso às informações geradas por meio de gráficos e arquivo texto. Além disto, o usuário tem acesso total à modificação dos dados iniciais em todos os processos implementados. Estas características estão presentes também nos módulos seguintes. O módulo contendo a funcionalidade de S.E permite o uso e criação de bases de conhecimento de modo prático e intuitivo através de interface gráfica. A base de conhecimento para coleta de dados iniciais do projeto de sistema biotecnológicos pode ser aprimorada através de edição e/ou criação de novas regras pela funcionalidade

"*Base Builder*". Como apresentado, o Bio-PSA pode e deve sofrer modificações em suas próximas versões. O objetivo é sempre acrescentar novos processos aos módulos 1 e 2, simulação de processos biotecnológicos e processos de purificação de proteínas respectivamente. Classificou-se as perspectivas futuras em curto, médio e longo prazo.

Em curto prazo deve-se submeter o programa a uma documentação mais detalhada do código fonte e maior integração entre os componentes construídos nas linguagens Visual Pascal (Delphi) e Fortran. O objetivo é que todos códigos Fortran sejam fornecidos como uma dll (*Dynamic Link Library*) e que só sejam utilizados códigos Fortran quando realmente necessário.

Uma pesquisa com usuários poderá ser realizada em médio prazo de modo a analisar as interfaces promovendo mudanças nesta e no sistema de ajuda (*Help*). Outro aperfeiçoamento é a generalização das funcionalidades de produção de etanol e purificação de enzimas, de modo que se possa utilizar outros microrganismos e enzimas. Esta generalização pode ser realizada através da utilização de um banco de dados global que armazene as variáveis.

As perspectivas em longo prazo visam à adição de novas funcionalidades aos módulos existentes tornando o Bio-PSA um software mais abrangente. Além disto, a implantação do banco de dados global e a generalização das funcionalidades dos módulos 1 e 2 tornarão possível a criação de S.Es com conexão com estes módulos. Por exemplo, o usuário poderá escolher modelo cinético (apresentado pelo S.E) e fazer os cálculos e simular o processo "sugerido" por um S.E.

10. REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

- AFEYAN, N.B., GORDON, N.F., COONEY, C.L. Mathematical modeling of the continuous affinity-recycle extraction purification technique. *J. Chromatography*. v.478, p.1-19, 1989.
- ALSOP, R.M. Industrial production of dextrans. *Progress in Industrial Microbiology*, v.18, p.1-44, 1983.
- ANDRIETTA, S.R., MAUGERI, F. Optimum design of a continuous fermentation unit of an industrial plant for alcohol production. *Advances in Bioprocess Engineering*, p.47-52, 1994.
- ANDRIETTA, S.R. Fermentação alcoólica: Evolução dos processos industriais. *STAB*, v.17, n.1, p. 32, Set-Out, 1998.
- ANSEJO, J., MERCHUK, J.C. *Bioreactor system desing*. Ed. Marcel Deckker. New York. 1994.
- ASENJO, J.A. and MAUGERI, F. An expert system for the selection and synthesis of protein purification processes. In P. Todd, S.K. Sikdar, and M. Bier, *Frontiers in Bioprocessing II*, Washington: America Chemical Society, p.358-379, 1992.
- ASENJO, J.A. Development of an expert system for the selection and synthesis of protein purification processes. *Journal of Biotechnology*, v.11, p.275-298, 1989.
- ASPINALL, G.O. *The Polysaccharides*. Academic Press, N.Y.. Cap.2: Classification of polysaccharides, p.1-9, 1983.
- ATALA, Daniel Ibraim Pires. Fermentação alcoólica com alta densidade celular: modelagem cinética, convalidação de parâmetros e otimização do processo. Campinas: Faculdade de Eng. de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, p.135, 2000. Tese (Mestrado).
- ATALA, Daniel Ibraim Pires. Montagem, instrumentação, controle e desenvolvimento experimental de um processo fermentativo extrativo de produção de etanol. Campinas: Faculdade de Eng. de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, p.135, 2004. Tese (Doutorado).

- BAILEY, J.E., OLLIS, D.F. *Biochemical Engineering Fundamentals*, Mc Graw Hill, 1986.
- BURKERT, Carlos André Veiga. Separação de glicose, frutose, oligossacarídeos e dextranas utilizando zeólitas. Campinas: Faculdade de Eng. De Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, p.159, 2003. Tese (Mestrado).
- CHASE, H. A., Prediction of the performance of preparative affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, V.297, n.2, p.179-202, August, 1984a.
- CHASE, H. A. Affinity separations utilising immobilised monoclonal antibodies - a new tool for the biochemical engineer. *Chemical Engineering Science*, V.39, n.7-8, p.1099-1125, 1984b.
- CHITRA, S.P., BULSON, R.J., MORREL, D.G. Computer programs that learn from experience. *Chemtech*, p.18-25, n.25, Feb, 1995.
- CHORAFAS, D.N. *Sistemas Especialistas: aplicações comerciais*. São Paulo. McGraw-Hill, 1988.
- CIMANDER, C., BACHINGER, T., MANDENIUS, C. Integration of distributed multi-analyzer monitoring and control in Bioprocessing based on real-time expert system. *Journal of Biotechnology*, v.103, p.237-248, 2003.
- COSTA, A.C., ATALA, D.I.P., MAUGERI, F., MACIEL FILHO, R. Factorial design and simulation for the optimization and determination of control structures for an extractive alcoholic fermentation. *Process Biochemistry*, V.37, p.125-137, 2001.
- COWAN, G.H., GOISLING, I.S., LAWS, J.F., SWEETENHAM, W.P. Physical and mathematical modelling to aid scale-up of liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, V.363, n.1, p.31-36, 1986.
- CURRALERO, ISABEL CRISTINA. Estudo de sistema bifásico duplo estágio para produção de dextrana. Campinas: Faculdade de Eng. de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, p.148, 2000. Tese (Mestrado).
- CURRALERO, I.C.B., MATSUBARA, S., RODRIGUES, M.I., MAUGERI, F. Sistema bifásico múltiplo estágio para síntese de dextrana. In CONGRESSO BRASILEIRO DE ENG. QUÍMICA (COBEQ), Porto Alegre, RS, Brasil, 1998.

- DALE, M.C., CHEN, C., OKOS, E M.R. Cell Growth and Death Rates as Factors in the Long-Term Performance, Modeling and Design of Immobilized Cell Reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, v.36, p.983-992, 1990.
- DE ASSIS, A.J., MACIEL FILHO,R.. Soft sensors development for on-line bioreactor state estimation. *Computers & Chemical Engineering*, vol.24, Issues 2-7, p.1099-1103, 2000.
- DECHECHI,E.C.,MARTINS,M.I.,MACIEL FILHO,R.,MAUGERI,F. Dynamic modelling and advanced predictive control of a continuous process of enzyme purification. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.14, n.4, p.425-430, 1997.
- DECHECHI,E.C.,RIBAS,A.M.,MATTEDI,A.,MACIEL FILHO,R.,MAUGERI,F. IV INTERNACIONAL SYMPOSIUM - AUTOMATIC CONTROL OF FOOD AND BIOLOGICAL PROCESSES (AcoFoP-IV), p.21-23, Stockholm, Sweden, September, 1998.
- DEWITT, J.P., JACKSON, J.V., PAULUS, T.J. *Fermentation Process development of Industrial Microorganisms*. Marcel Dekker, New York, 1989.
- FEIGENBAUM, B.A.E. *The Handbook of Artificial Intelligence*. Addison-Wesley. Volumes I. II. III, 1981.
- FERREIRA, Roberta Miranda. Modelagem e simulação de biorreatores tipo torre operando com leveduras auto-imobilizáveis para produção de etanol. Campinas: Faculdade de Eng. Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, p.152, 2003. Tese (Mestrado).
- FERREIRA, A.B.H. *Novo dicionário da língua portuguesa*. Rio de Janeiro, Nova Fronteira, 2. Ed, 1986.
- FLORIDO, CAMILE. *Modelagem e desenvolvimento de estratégia de controle para o reator de síntese de dextrana*. Campinas: Faculdade de Eng. Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, p.113, 2001. Tese (Mestrado).
- GORDON, N.F., TSUJIMURA, H. COONEY, C.L. Optimization and simulation of continuous affinity-recycle extraction (care). *Bioseparation*. n.1, p. 9-21, 1990.
- GOUVÊIA, V.L.R., FLORIDO, C., MACIEL FILHO, R. Use of Deterministic Model and Artificial Neural Networks in the Dextran Production System Simulation. In THE SIXTH ITALIAN CONFERENCE ON CHEMICAL AND PROCESS ENGINEERING, ICheaP-6, Pisa, Italy, June 2003b.

- GOUVÊIA, V.L.R., MACIEL FILHO, R. Dynamic modeling of a fermentation process for production of ethanol by hybrid model. In SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS, Breckenridge, Colorado, EUA, May, 2003a.
- GOUVÊIA, Vera Lúcia Reis de. Modelagem dinâmica de Bioprocessos por modelos híbridos. Campinas: Faculdade de Eng. Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, p.91, 2000. Tese (Mestrado).
- GUERREIRO, M.A., ANDRIETTA, S.R., MAUGERI, F. Expert system for the design of an industrial fermentation plant for the production of alcohol. *Journal Chem. Tech. Biotechnol*, v.68, p.163-170, 1997.
- HARADA, L.H.P., COSTA, A.C., MACIEL FILHO, R.. Hybrid neural modeling of Bioprocesses using functional link networks. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.98-1-3, p.1009-1024, 2002.
- HARRIS, E.L.V., ANGAL, S. Protein Purification Methods - A Practical Approach. IRL Press, 1995.
- HERNALSTEENS, SAARTJE. *Obtenção de dextrana clínica, oligossacarídeos e frutose por via enzimática*. Campinas: Faculdade de Eng. de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, p.83, 2002. Tese (Mestrado)
- IGNOVA, M., PAUL, G.C., GLASSEY, J., WARD, A.C., MONTAGUE, G.A., THOMAS, C.R., KARIM, M.N. Towards intelligent process supervision: industrial penicilin fermentation case study. *Computers & Chemical Engineering*, v.20, Suplemento 1., p.S5450-S550, 1996.
- JANSON, J.C., RÝDEN, L. *Protein Purification: Principles High Resolution Methods and Applications*. VCH Publisehrs, New York, 1989.
- JAY, J.M. *Microbiología moderna de los alimentos*. 3.Ed. Zaragoza: Acribia. 1994.804p.
- KARIM. M.N.. YOSHIDA.T.. RIVERA. S.L., SAUCEDO, V.M., EIKENS, B., GYU-SEOP OH. Global and local neural network models in biotechnology: application to different cultivation processes. Review. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. v.83, n.1, p.1-11, 1997.
- LABROU, N., CLONIS, Y.D. The affinity technology in downstream processing. *J. Biotechnology*, v.36, p.95-119, 1994.

- LEE, J.H., PAGAN, R.J., ROGERS, P.L. Continuous simultaneous saccharification and fermentation of starch using *Zimomonas mobilis*. *Biotechnology and Bioengineering*, v.25, p.659-669, 1983.
- LEE, J.M., PALLARD, J.F., COULMAN, G.A. Ethanol fermentation with cell recycling: computer simulation. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, v.25, n.2, p.497-511, Feb., 1983.
- LEE, S., CHOI, S., IM, E., KOO, Y. Continuous production of clinical dextran using two-stage reactor. *Biotechnol. Letters*, v.5, n.14, p.379-384, 1992.
- LEVENSPIEL, O. The Monod Equation. A Revisit and a Generalization to Product Inhibition Situation. *Biotechnology and Bioengineering*, v.22, p.1671-1687, 1980.
- LEVINE, R. I., DRANG, D. E., EDELSON, B. *Inteligência Artificial e Sistemas Especialistas - Aplicações e Exemplos Práticos*. McGRAW-HILL, 1988.
- LIA, Laboratório de Inteligência Artificial. Expert SINTA: Uma Ferramenta para Criação de Sistemas Especialistas. Endereço eletrônico: <http://www.lia.ufc.br>. 1998.
- LIENQUEO, M.E. and ASENJO, J.A. Use of expert systems for the synthesis of downstream protein processes. *Computers and Chemical Engineering*, v.24, p.2339-2350, 2000.
- LIENQUEO, M.E., LESER, E.W., ASENJO, J.A. An expert system for the selection and synthesis of multistep protein separation process. *Computers and Chemical Engineering*, v.20, Suppl. *European symposium on computer aided process engineering-6-Part A*, p.189-194, 1997.
- LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. *Biotechnologia: Tecnologia das fermentações*. Ed. Edgard Blucher. 1982.
- LINKO, S. Expert Systems-what can they do for the food industry. *Trends in Food Science & technology*, v.9, p.3-12, 1998.
- MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J.. Brock biology of microorganisms. 9. Ed. New Jersey: Prentice Hall, 2000.
- MAÑAS, A.V. *Administração de Sistemas de Informação - como otimizar a empresa por meio dos sistemas de informação*, Érica, 1999.

- MARTINEZ-ESPINDOLA, J.P., LOPEZ-MUNGUIA, C.A. On the kinetics of dextransucrase and dextran synthesis in batch reactors. *Biotechnol. Letters*, v.7, n.7, p.483, 1985.
- MCCULLOCK, W.S., PITTS, W.A. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *Bulletin of Mathematical Biophysics*, v.5, p.115-133, 1943.
- MENDES, E.F.F. *Projeto Evolucionário de Arquiteturas Neurais para Avaliação de Crédito Financeiro*. São Carlos: ICMSC, USP, São Paulo, 1997. Tese (Mestrado).
- MIBIELLI, Guilherme Matinez. Síntese do Processo de Obtenção de Dextrana Clínica e Frutos a Partir de Sacarose. Campinas: Faculdade de Eng. de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, p.88, 2001. Tese (Mestrado)
- MICHELENA, G.L., MARTINEZ, A., BELL, A., CARRERA, E., VALENCIA, R. Scale-up of dextransucrase production by *Leuconostoc mesenteroides* in fed batch fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. V.46, n.3, p.455-459, Junho, 2003.
- NASTARI, P.M. Etanol de cana-de-açúcar: o combustível de hoje. *Seminário: PROALCOOL - 30 anos depois*. OESP - (<http://www.estadao.com.br/ext/especial/proalcool>) Agência Estado, São Paulo, SP, Novembro, 2005.
- NOVA, L. C. M. *Classificação de Imagens por Redes Neurais*. Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 1992. Tese (Mestrado)
- PESSOA Jr., A., KILIKIAN, B.V. *Purificação de produtos biotecnológicos*. Editora Manole, São Paulo. 2005
- PUNGOR, E., AFEYAN, N.B., GORDON, N.F., COONEY, C.L. Continuous Affinity-recycle extraction: a novel protein separation technique. *Biotechnology*, v.5, p.604-608, 1987.
- RIBAS, ALESSANDRO MARRAS. *Propostas e análises de desempenho de diferentes configurações de sistemas de purificação contínua de proteínas*. Campinas: Faculdade de Eng. Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, p.197, 1999. Tese (Doutorado).
- SANDFORD, P.A., BAIRD, J. Industrial utilization of polysaccharides. *The polysaccharides*. Academic Press, N.Y. Cap.2, p.412-90, 1983.

- SANTOS, M., TEIXEIRA, J., RODRIGUES, A. Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). *Biochemical Engineering Journal*, v.4, p.177-188, 2000.
- SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W.. *Biotecnologia Industrial. Engenharia Bioquímica. Volume 2.* Editora Edgard Blucher, 2001.
- SCRAGG, A.H., *Bioreactors in biotechnology-A Practical Approach*, Ellis Horwood, New York, 1991.
- SHULER, M.L., KARGI, F. *Bioprocess Engineering: Basic concepts.* Publication englewood cliffs:prentice-hall, 479p, 1992.
- SILVA, FLAVIO LUIZ HONORATO DA. *Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua extrativa.* Campinas: Faculdade de Eng. de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, p.162, 1998. Tese (Doutorado)
- SILVA, F.L.H., RODRIGUES, M.I., MAUGERI, F. Dynamic Modelling, Simulation and Optimization of an Extractive Continuous Alcoholic Fermentation. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, v.74, p.176-182, 1999.
- SIQUEIRA FILHO, E.P. Efeito da Temperatura na Cinética da Fermentação Alcoólica Contínua com Alta Densidade Celular. Campinas: Faculdade de Eng. de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1997. Tese (Mestrado).
- SOUZA, ELIANA APARECIDA. *Modelagem e simulação de um reator contínuo com reciclo da enzima para produção "in vitro" de dextrana.* Campinas: Faculdade de Eng. de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, p.131, 1993. Tese (Mestrado).
- TABOADA, OSCAR WILFREDO MENDIETA. *Purificação de Lipase de Geotrichum sp. por Resina Cromatográfica de Interação Hidrofóbica - Modelagem, Simulação e Validação de Parâmetros.* Campinas: Faculdade de Eng. de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, p.152, 1999. Tese (Doutorado).
- TOSETTO, Gisele Mantei. Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de Etanol. Campinas: Faculdade de Eng. Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, p.82, 2002. Tese (Mestrado).

- VIEGAS, Marcelo Caldeira. Otimização de sistema de fermentação alcoólica contínua utilizando reatores tipo torre e leveduras com características flocculantes. Campinas: Faculdade de Eng. Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, p.139, 2003. Tese (Doutorado).
- VOLESKY, B., VOTRUBA, J. *Modeling and Optimization of Fermentation Processes*. Elsevier, 1992.
- WINSTON, P.H. *Inteligência Artificial*, LTC, 1988.
- 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*, v.24, n.2-7, p.1355-1360, July 15, 2000.
- ZUÑIGA, A.D.G., PEREIRA, J.A.M., COIMBRA, J.S.R., MINIM, L.A., ROJAS, E.E.G. Técnicas usadas no processo de purificação de biomoléculas. *Boletim CEPPA*, Curitiba, v.21, n.1, p.61, jan./jun, 2003.