



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

BRUNNO FERREIRA DOS SANTOS

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE USANDO
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS, COM DESENVOLVIMENTO
DE MODELOS ESTATÍSTICOS E SENSOR VIRTUAL POR
MODELAGEM NEURAL

STUDY OF BIOSURFACTANT PRODUCTION USING AGRO-
INDUSTRIAL WASTE WITH DEVELOPMENT OF STATISTICAL
MODELS AND SOFT SENSOR BY ARTIFICIAL NEURAL
NETWORK

CAMPINAS/SP
2015

BRUNNO FERREIRA DOS SANTOS

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOCOSURFACTANTE, USANDO
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS, COM DESENVOLVIMENTO
DE MODELOS ESTATÍSTICOS E SENSOR VIRTUAL POR
MODELAGEM NEURAL**

Defesa de Tese apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do Título de Doutor em Engenharia Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Maria Frattini Fileti (FEQ/UNICAMP)

Co-orientador: Dr. Alexandre Nunes Ponezi (CPQBA/UNICAMP)

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO, BRUNNO FERREIRA DOS SANTOS,
E ORIENTADA PELA PROF(A). DR(A). ANA
MARIA FRATTINI FILETI.


Prof.^a Dr.^a Ana Maria Frattini Fileti - Orientadora

CAMPINAS/SP
2015

Agência de fomento: CNPq
Nº processo: 143376/2011-0

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Elizangela Aparecida dos Santos Souza - CRB 8/8098

Sa59e Santos, Brunno Ferreira, 1986-
Estudo da produção de biossurfactante, usando resíduos agroindustriais com desenvolvimento de modelos estatísticos e sensor virtual por modelagem neural / Brunno Ferreira dos Santos. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Ana Maria Frattini Fileti.
Coorientador: Alexandre Nunes Ponezi.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Biossurfactantes. 2. Resíduos agroindustriais. 3. Redes neurais artificiais. 4. Fermentação. I. Fileti, Ana Maria Frattini, 1965-. II. Ponezi, Alexandre Nunes, 1964-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of biosurfactant production, using agro-industrial waste with development of statistical models and soft sensor by artificial neural network

Palavras-chave em inglês:

Biosurfactants

Agro-industrial waste

Artificial neural network

Fermentation

Área de concentração: Sistemas de Processos Químicos e Informática

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora:

Juliana Ferrari Ferreira Secato

Rafael Ramos de Andrade

Cristiana Maria Pedroso Yoshida

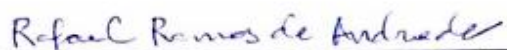
Ana Paula Brescancini Rabelo


Data de defesa: 27-07-2015


Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Tese de doutorado defendida por Brunno Ferreira dos Santos e aprovada em 27 de julho de 2015 pela banca examinadora constituída pelos doutores:


Prof.^a Dr.^a Ana Maria Frattini Fileti - Orientadora


Prof. Dr Rafael Ramos de Andrade


Prof.^a Dr.^a Juliana Ferrari Ferreira


Prof.^a Dr.^a Cristiana Maria Pedroso Yoshida


Prof.^a Dr.^a Ana Paula Brescancini Rabelo

RESUMO

Biossurfactantes são moléculas com diversas aplicações industriais. Porém a produção do mesmo é prejudicada devido à utilização de meios de fermentação caros, metodologias ineficientes, falta de acompanhamento em tempo real do produto, dentre outras. O presente trabalho visou estudar a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* em meio de fermentação a base de resíduos agroindustriais (glicerina residual, casca de beterraba e água de maceração de milho) pelo desenvolvimento de metodologias auxiliadas por modelagem estatística (construção de curva de resposta e curvas de contorno) e modelagem com redes neurais para construção de sensor virtual. Foi desenvolvido um DCCR em experimentos com Erlenmeyers para direcionamento da concentração de meio de fermentação e por análise da superfície de resposta e curvas de contorno chegou-se a valores de composição do meio de cultivo de 6% e 7,5% (v/v) de glicerina e casca de beterraba, respectivamente. Em seguida, fez-se outro DCCR para otimizar as condições do fermentador 7 L (volume nominal), agitação e aeração do meio. Assim, determinou-se 200 rpm para agitação e 0,5 vvm para aeração por avaliação de superfície de resposta e curvas de contorno, onde a máxima concentração de biossurfactante no meio foi de 1930 mg/L. O monitoramento da batelada pôde ser feito pela construção do sensor virtual em planilha eletrônica, desenvolvido com modelagem por redes neurais artificiais e validado nas faixas de operação. Os testes de aplicação mostraram que o biossurfactante formado foi capaz de dispersar petróleo em água e formar emulsão estável em óleo diesel, gasolina, heptano e hexano.

Palavras chaves: Biossurfactante, modelagem estatística e modelagem com redes neurais.

ABSTRACT

Biosurfactants are molecules presenting many industrial applications. However, their production is still limited due to the use of expensive fermentation media, inefficient methods, lack of product monitoring in real time, among others. This work aimed to study the production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* using agribusiness residues fermentation media (residual glycerin, beet peel and corn steep liquor). Methodologies aided by statistical modeling (response curve and contour curves) were employed, as well as a neural network technique for softsensor development. CCRD experiments were performed using Erlenmeyer flasks to find the concentration of the fermentation medium. The analysis of response surface and contour curves reached the composition values of the cultivation media of 6% and 7.5% (v/v) of glycerin and sugar beet peel, respectively. Carrying out another CCRD, the operating conditions of the 7L-fermenter (nominal volume) was optimized: 200 rpm for agitation and 0.5 vvm for aeration. For this condition, the maximum concentration of biosurfactant in the media was 1930 mg/L. Monitoring the batch fermentation could be successfully done by the developed neural network softsensor, using a spreadsheet, in the operating ranges previously established. The application tests have shown that the biosurfactant produced was able to disperse crude oil in water and also form stable emulsion in diesel oil, gasoline, heptane and hexane.

KEYWORD: Biosurfactant, statistical modeling and artificial neural networks modeling.

Dedico à Deus, sem ele nada seria possível; à minha batalhadora e dedicada mãe Sônia por sempre me apoiar; Ao meu pai José e à minha irmã Priscylla por todo incentivo; Aos meus avós Manoel e Aparecida por serem prestativos.

Se nada mudar, invente, e quando mudar, entenda.

Se ficar difícil, enfrente, e quando ficar fácil, agradeça.

Se a tristeza rondar, alegre-se, e quando ficar alegre, contagie.

E quando recomeçar, acredite.

Você pode tudo!

Tudo consegue pelo amor, e pela fé que você tem em Deus! (*Autor desconhecido*)

Agradecimentos

Primeiramente a Deus por tudo em minha vida, principalmente pelas vitórias, por me dar forças nos momentos mais difíceis e pelos momentos de inspiração para mudar na hora certa.

Aos meus pais (José e Sônia) e minha irmã (Príscylla) por todo carinho, dedicação, amor, pela formação de caráter e apoio que sempre tive. A família é o nosso fundamento, a base do nosso futuro.

À professora Ana Maria Frattini Fileti por ter me recebido de portas abertas, acreditado em mais esse projeto, nas palavras amigas, pelos momentos de reflexão e principalmente pelos conselhos valiosos. Tento sempre me espelhar em você, muito obrigado!

Aos meus queridos: avós Manuel e Aparecida pelos ensinamentos, experiência de vida e presteza.

Ao meu querido amigo Marcos Coelho que tem me aguentado esses anos, pelos conselhos, apoio e incentivos.

Aos meus amigos de laboratório: Rejane, Saulo, Raphael, Filipe, Juliana, Bruno Guzzo, Débora, Tarcisio e Victor. Por muitos momentos e ideias compartilhadas.

Aos amigos que conquistei nesta jornada: Lívia Lima, Thiago Dias, Rafael Ramos, Juliana Ferrari, Bruna, Washington, Renato, Gisele, Karen, Jeferson, Everton, Érica, Nilo e Roberto Pereira, por muitos momentos prazerosos e por toda disponibilidade que vocês sempre tiveram em me ajudar.

Às minhas amigas quase primas: Carla Pereira, Lúcia Helena. Em especial Lorena Miranda (Ló) e Kênia Soares (Tininha) pela ajuda no recolhimento de muitos materiais para o desenvolvimento da tese.

Aos meus queridos amigos do CPQBA: Renata (fia da mãe), Camila e Márcio (Marco véio) pelos momentos de descontração e pelas excelentes ideias compartilhadas. Aos conselhos e orientações do Alexandre e da Marta, muito obrigado!

À todos que contribuíram diretamente ou indiretamente com a realização de mais esta etapa da minha vida.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS	3
1.1.1. Objetivos Gerais	3
1.1.2 Objetivos específicos	3
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	5
2.1 Biossurfactantes	5
2.2 Propriedades dos biossurfactantes.....	7
2.3 Aplicações dos biossurfactantes	8
2.4 Produção de biossurfactante	10
2.5 Aspectos de engenharia ligados à produção de biossurfactante	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Metodologia	25
3.1.1 Seleção de microrganismo e meio cultivo alternativo para produção de biossurfactante.....	25
3.1.2 Preparo e padronização do inóculo	26
3.1.3 Teste de produção com o meio alternativo	27
3.1.4 Determinação do crescimento microbiano (CM).....	27
3.1.5 Oxigênio Dissolvido (OD).....	27
3.1.6 Índice de emulsificação (E_{24}) e tensão superficial (TS).....	27
3.1.7 Determinação da concentração de glicose (CG)	28
3.1.8 Concentração do biossurfactante (CB).....	29
3.2 Planejamento experimental e otimização do meio de produção	29
3.3 APARATO EXPERIMENTAL	30

3.3.1 Ensaio em fermentador.....	31
3.3.2 Planejamento experimental para variáveis do fermentador	32
3.3.3 Desenvolvimento, validação e uso do <i>soft sensor</i>	33
3.3.4 Testes de aplicação do biossurfactante produzido	36
3.3.5 Caracterização do meio de fermentação alternativo	36
4. RESULTADOS	39
4.1 Seleção do meio de fermentação	39
4.2 Análise do substrato alternativo	55
4.3 Seleção das condições de fermentação	56
4.4 Desenvolvimento microbiano no fermentador	70
4.5 Construção do modelo neural.....	76
4.5.1 Desenvolvimento e análise de desempenho dos modelos neurais	79
4.5.2 Validação <i>offline</i>	106
4.5.3 Experimento com auxílio do <i>soft sensor</i>	107
4.5.4 Testes de aplicação com biossurfactante produzido	109
5. CONCLUSÃO	113
6. SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS	115
7. REFERÊNCIAS.....	117
8. APÊNDICE	123

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Comportamento de molécula surfactante (PREVIDELLO et al, 2006).....	5
Figura 2.2: Estrutura da principal isoforma da surfactina (BARROS et al., 2007).	6
Figura 2.3: Esquema geral de um processo fermentativo (SCHMIDELL et al., 2001).....	14
Figura 2.4: Metabolismo intermediário para produção de biossurfactante a partir de carboidratos como substrato (SYLDATK & WAGNER, 1987).	15
Figura 2.5: Esquema de cálculo dos efeitos principais no fator 'A' e 'B'	17
Figura 2.6: Funcionamento de uma rede neural.....	23
Figura 3.3: Esquema topológico da rede neural (toolbox MATLAB R2015a).....	36
Figura 4.1: Índice de Emulsificação após realização de planejamento em Erlenmeyers $2^3 + 6$ pontos axiais e 3 pontos centrais	41
Figura 4.2: Índice de Emulsificação após realização de planejamento em Erlenmeyers $2^2 + 4$ pontos axiais e 3 pontos centrais.....	44
Figura 4.3: Diagrama de Pareto para Índice de Emulsificação (E_{24}).	47
Figura 4.4: Diagrama de Pareto para Concentração de Biossurfactante (CB)	48
Figura 4.5: Superfície de resposta para o modelo índice de emulsificação (E_{24}).	50
Figura 4.6: Curva de contorno para Índice de Emulsificação (E_{24}).	50
Figura 4.7: Superfície de resposta para concentração de biossurfactante (CB).	51
Figura 4.8: Curva de contorno para Concentração de Biossurfactante (CB).	52
Figura 4.9: Dispersão para o modelo Índice de Emulsificação (E_{24}).	53
Figura 4.10: Dispersão para modelo de concentração de biossurfactante (CB).....	53
Figura 4.11: Sistema adaptado para fermentação em volume de 800 mL.	57
Figura 4.12: Concentração de biossurfactante para sistema adaptado de 800 mL.....	58
Figura 4.13: Diagrama de Pareto para concentração de biossurfactante (CB) em 4500 mL.	62
Figura 4.14: Diagrama de Pareto para redução da tensão (RT) de 4500 mL.	63
Figura 4.15: Superfície de resposta para modelo estatístico para concentração de biossurfactante (CB) em 4500 mL.	65

Figura 4.16: Curva de contorno do modelo estatístico para concentração de biossurfactante (CB) em 4500 mL.	65
Figura 4.17: Superfície de resposta do modelo estatístico para redução da tensão superficial (RT) em 4500 mL.	66
Figura 4.18: Curva de contorno do modelo estatístico para redução da tensão superficial (RT) em 4500 mL.	67
Figura 4.19: Dispersão para modelo concentração de biossurfactante (CB).	67
Figura 4.20: Dispersão para modelo da redução da tensão superficial (RT).	68
Figura 4.21: Crescimento do microrganismo em 24h.	71
Figura 4.22: Perfil de Concentração de glicose em 24h para os 11 ensaios.	71
Figura 4.23: Perfil de Oxigênio dissolvido em 24h para os 11 ensaios.	71
Figura 4.25: Perfil da Tensão superficial em 24h para os 11 ensaios.	72
Figura 4.26: Perfil de Tensão Superficial diluída 10x em 24h para os 11 ensaios.	72
Figura 4.27: Perfil de Tensão Superficial 100x diluída em 24h para os 11 ensaios.	73
Figura 4.28: Perfil de concentração de biossurfactante da literatura (BARROS, 2007).	75
Figura 4.29: Evolução do treinamento com 10 neurônios na camada intermediária, Bloco I.	81
Figura 4.30: Dispersão entre a saída real e calculada usando dados do treinamento, com 10 neurônios na camada intermediária, Bloco I.	81
Figura 4.31: Comparação entre a saída real e a saída calculada usando os dados do treinamento, com 10 neurônios na camada intermediária, Bloco I.	82
Figura 4.32: Dispersão entre saída real e saída calculada pelo modelo usando dados de teste.	83
Figura 4.33: Comparação entre saída real e saída calculada no teste.	83
Figura 4.34: Desenvolvimento do treino com 10 neurônios na camada intermediária, Bloco II.	85
Figura 4.35: Dispersão entre a saída real e a calculada pelo modelo usando dados do treinamento, com 10 neurônios na camada intermediária, Bloco II.	85
Figura 4.36: Comparação entre a saída real e calculada no treinamento com 10 neurônios na camada intermediária, Bloco II.	86
Figura 4.37: Dispersão entre a saída real e a calculada pelo modelo usando dados de teste, Bloco II.	87

Figura 4.38: Comparação entre a saída real e a saída calculada pelo modelo com dados do teste, Bloco II.....	87
Figura 4.39: Desenvolvimento do erro no treinamento com 12 neurônios na camada intermediária, Bloco III.....	89
Figura 4.40: Dispersão entre a saída real e a calculada no modelo com 12 neurônios na camada intermediária no treinamento, Bloco III.....	89
Figura 4.41: Comparação entre a saída real e a saída calculada do modelo com 12 neurônios no treinamento, Bloco III.....	90
Figura 4.42: Dispersão entre a saída real e a calculada pelo modelo com os dados de teste, Bloco III.....	90
Figura 4.43: Comparação entre a saída real e a calculada pelo modelo com dados de teste, Bloco III.....	91
Figura 4.44: Desenvolvimento do treino com 12 neurônios no treinamento, Bloco IV.	93
Figura 4.45: Dispersão entre a saída real e a calculada pelo modelo com 12 neurônios na camada intermediária no treinamento, Bloco IV	93
Figura 4.46: Comparação entre a saída real e a calculada pelo modelo com 12 neurônios na camada intermediária do treinamento.....	94
Figura 4.47: Dispersão entre a saída real e a calculada pelo modelo com os dados de teste, Bloco IV.....	94
Figura 4.48: Comparação entre a saída real e a calculada pelo modelo com os dados de teste, Bloco IV.....	95
Figura 4.49: Desenvolvimento do erro com 16 neurônios na camada intermediária no treinamento, Bloco V.	97
Figura 4.50: Dispersão entre a saída real e a calculada pelo modelo com 16 neurônios na camada intermediária no treinamento, Bloco V.....	97
Figura 4.51: Comparação entre a saída real e a calculada pelo modelo com 16 neurônios na camada intermediária do treinamento, Bloco V.....	98
Figura 4.52: Dispersão entre a saída real e a calculada pelo modelo com os dados de teste, Bloco V.....	98
Figura 4.53: Comparação entre a saída real e a calculada pelo modelo com os dados de teste, Bloco IV.....	99
Figura 4.54: Desenvolvimento do erro com 6 neurônios na camada intermediária no treinamento, Bloco VI.	101

Figura 4.55: Dispersão entre a saída real e a calculada pelo modelo com 6 neurônios na camada intermediária no treinamento, Bloco VI.....	101
Figura 4.56: Comparação entre a saída real e a calculada pelo modelo com 6 neurônios na camada intermediária do treinamento, Bloco VI.....	102
Figura 4.57: Dispersão entre a saída real e a calculada pelo modelo com os dados de teste, Bloco VI.....	103
Figura 4.58: Comparação entre a saída real e a calculada pelo modelo com os dados de teste, Bloco IV.....	103
Figura 4.59: Modelo neural de melhor desempenho desenvolvido.....	105
Figura 4.60: Comparação entre a saída real e a calculada pelo modelo na validação offline. .	107
Figura 4.61: Funcionamento do <i>sof sensor</i>	108
Figura 4.62: Comparação da saída real com a calculada na planilha.....	108
Figura 4.63 : Atividade de índice de emulsificação (E_{24}) com solventes orgânicos.	110
Figura 4.64: Filme de petróleo formado sobre água.....	110
Figura 4.65: Formação do halo de dispersão de petróleo em água.....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Tabela de fatores para formulação do meio de fermentação.	30
Tabela 3.2: Fatores para estudo em processo.	33
Tabela 4.1: Combinação dos fatores (X_1 =Glicerina residual % v/v; X_2 =Resíduo de beterraba % v/v; X_3 =Água de maceração de milho % v/v).	40
Tabela 4.2: Fatores para estudo das faixas de busca no processo.	42
Tabela 4.3: Combinação dos fatores (X_1 =Glicerina residual % v/v; X_2 =Resíduo de beterraba % v/v).	43
Tabela 4.4: Coeficientes de regressão para resposta E_{24}	45
Tabela 4.5: Coeficientes de regressão para resposta concentração de biossurfactante (CB). ...	46
Tabela 4.6: ANOVA para respostas E_{24} e CB.	49
Tabela 4.7: Valor do Índice de Emulsificação (E24) e Concentração de Biossurfactante (CB) experimental, os valores preditos pelos modelos e os desvios gerados.	54
Tabela 4.8: Análise do substrato alternativo (Glicerina residual + resíduo de beterraba).	56
Tabela 4.9: Combinação dos fatores (X_1 =Agitação rpm e X_2 =Aeração vvm) dos ensaios no fermentador em 9 horas.	59
Tabela 4.10: Tensão superficial inicial e após 9h (mN/m).	60
Tabela 4.11: Coeficiente de regressão para CB, X_1 =agitação e X_2 =aeração.	61
Tabela 4.12: Coeficiente de regressão para redução da tensão superficial.	62
Tabela 4.13: ANOVA para CB e RT no fermentador.	64
Tabela 4.14: Valor da Concentração de Biossurfactante em mg/L (CB) e Redução da tensão superficial em mN/m (RT) experimental, os valores preditos pelos modelos e os desvios gerados.	69
Tabela 4.15 Situação entre as topologias estudadas.	79
Tabela 4.16: Variação na topologia da rede neural e os resultados para tomada de decisão, Bloco I.	80
Tabela 4.17: Variação na topologia da rede neural e os resultados para tomada de decisão, Bloco II.	84

Tabela 4.18: Variação na topologia da rede neural e os resultados tomada de decisão, Bloco III.	88
Tabela 4.19: Variação na topologia da rede neural e os resultados para tomada de decisão, Bloco IV.	92
Tabela 4.20: Variação na topologia da rede neural e os resultados para tomada de decisão, Bloco V.....	96
Tabela 4.21: Variação na topologia da rede neural e os resultados para tomada de decisão, Bloco VI.....	100
Tabela 4.22: Índice de Emulsificação (E_{24}) para solventes orgânicos.....	109

1. INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes, assim como os surfactantes químicos ou sintéticos, são moléculas anfipáticas, ou seja, possuem em suas moléculas tanto uma região hidrofílica quanto hidrofóbica. Podem ser aplicados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de cosméticos, petroquímica e outras. Os maiores destaques das aplicações são ligados a área petrolífera: como biorremediação de vazamento de óleos e recuperação melhorada de poços; e a medicina: como agentes antitumorais e antivirais. Todavia, quando comparados com surfactantes químicos, os biossurfactantes são mais vantajosos por apresentar baixa toxicidade, alta degradabilidade, serem mais efetivos em condições extremas de temperatura e pH, além de serem produzidos pela fermentação em resíduos. Mesmo assim, algumas aplicações dependem do custo de produção e de purificação.

No momento, os biossurfactantes não são capazes de competir economicamente com os surfactantes químicos devido à metodologias ineficientes de produção e purificação, a baixa produtividade das cepas e utilização de substratos sintéticos caros.

Os últimos trabalhos relacionados com essa área são focados em rotas alternativas de produção com baixo custo, por exemplo, na substituição fracionada do substrato por resíduos agroindustriais. O Brasil é um grande produtor agrícola e que a cada ano aumenta sua produção para atender demandas dos mercados internos e externos, segundo Instituto de Estudos do Comercio e Negociações Internacionais (ICONE, 2015). Com isso, a geração de resíduos agroindustriais tende a acompanhar esse crescimento. Este fato corrobora a necessidade de algum manejo dos resíduos agroindustriais gerados, principalmente para resíduos com grande potencial nutritivo e que ainda é pouco utilizado (como, por exemplo, resíduos de beterraba). Normalmente esses resíduos conseguem compensar a base nutricional sintética.

Outros pontos a serem elucidados são quanto ao potencial: na identificação do potencial do biosurfactante; no desempenho de suas propriedades através de

monitoramento em tempo real; no controle das variáveis do processo; e na otimização dos seus processos de fermentação para a obtenção dos padrões de operação, ou seja, trabalhar com as variáveis nos seus pontos ótimos visando à obtenção de maior rendimento, produtividade e qualidade do produto final.

A aplicação de tecnologias nos processos de fermentação pode permitir que as variáveis se mantenham nos valores de referência designado previamente como ótimo, bem como garantir segurança do processo e tomada de decisão em tempo hábil.

A qualidade do biossurfactante gerado é de difícil monitoramento durante sua produção. São necessárias tomadas de amostras para análises da concentração e da tensão superficial em tempos distintos ou ao final da batelada, podendo demorar muito para tomar qualquer tipo de decisão sobre o processo. Uma alternativa a isso é a utilização de um *soft-sensor* ou sensor virtual. Esta tecnologia virtual visa reduzir custos e melhorar condições do processo de produção, pois envolve um conjunto de rotinas de um software que estima variáveis de difícil ou demorada medição, a partir de medições disponíveis de variáveis secundárias “on-line”. A construção de um *soft sensor* é, geralmente, inspirada em um método matemático que aprenda a dinâmica do processo como, por exemplo, redes neurais artificiais. Estas são capazes de se ajustarem de forma que o erro de construção do modelo tenda a atingir seu valor mínimo, garantindo ao sensor virtual uma boa precisão numérica (FERREIRA et al., 2010).

Embora alguns pesquisadores trabalhem na produção de biossurfactante, ainda há muitos estudos acerca dos aspectos científicos e de engenharia importantes ligados a controle de processos que são pouco estudados em biorreatores. Isto deve-se às complexidades encontradas na determinação de parâmetros importantes do cultivo das cepas. Este fato justifica: 1) o estudo sistematizados por metodologia de planejamento experimental usando resíduos agroindustriais; 2) o aumento da escala de produção de biossurfactante; 3) o interesse desse trabalho em apresentar uma metodologia envolvendo monitoramento da produção de biossurfactante, ou seja, o desenvolvimento do *soft sensor* que seja capaz de verificar o funcionamento da planta experimental através de predições de uma variável.

1.1 OBJETIVOS

Frente à tese de que a utilização de resíduos agroindustriais como meio fermentativo e o acompanhamento da produção via sensor virtual passam tornar a produção de biosurfactante mais sustentável e menos onerosas, os objetivos desse trabalho foram:

1.1.1. Objetivos Gerais

- Estudar a produção de biosurfactante, usando resíduos de glicerina proveniente da obtenção de biodiesel, casca de beterraba, água de maceração de milho como meio de cultivo para produção de biosurfactante;
- Desenvolver uma metodologia para escolha da composição do substrato e escolha dos pontos operacionais (agitação e aeração) a partir de planejamentos experimentais;
- Desenvolver um *soft sensor* baseado em redes neurais artificiais para inferência da qualidade e quantidade de biosurfactante.

1.1.2 Objetivos específicos

- Testar o *Bacillus subtilis* em meio de cultivo à base de resíduos (Glicerina residual, Casca de beterraba e Água de maceração de milho);
- Definir os pontos ótimos de fermentação para padronizar o meio fermentecível (resíduos) através de Planejamento experimental;
- Procurar os pontos ótimos das variáveis de operação do fermentador (Agitação e Aeração) para produção do biosurfactante usando planejamento experimental;
- Monitorar a fermentação analisando crescimento microbiano, concentração de glicose, oxigênio dissolvido, tensão superficial, e índice de emulsificação;
- Modelar por rede neural artificial o processo em questão, visando inferir a concentração de biosurfactante durante a produção;
- Analisar o desempenho do modelo neural a partir do *soft sensor* criado no Excel.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Biossurfactantes

Os biossurfactantes começaram a ser usados nas últimas décadas, pois são substâncias produzidas a partir do metabolismo de alguns microrganismos aeróbicos com várias características, dentre elas: biodegradabilidade, baixa toxicidade, produção a partir de fontes renováveis, compatibilidade com meio ambiente, maior eficiência que os surfactantes sintéticos e funcionalidade em condições extremas.

A maioria dos compostos biológicos com atividade superficial conhecida são moléculas complexas, englobando diferentes estruturas, geralmente uma parte hidrofílica- como os peptídeos cíclicos, alcoóis ou ácidos carboxílicos e fosfolipídeos- e outra parte hidrofóbica como ácidos graxos de cadeia longa, hidroxi-ácidos graxos (JACOBUCCI, 2000). Cada uma destas partes fica posicionada nas interfaces para minimizar as interações desfavoráveis, como mostrado na Figura 2.1.

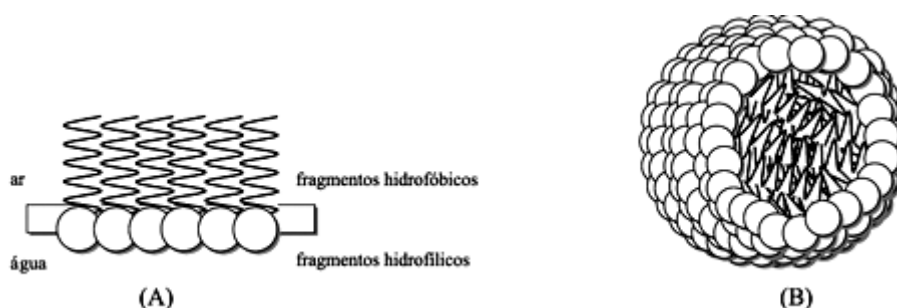


Figura 2.1: Comportamento de molécula surfactante (PREVIDELLO et al, 2006).

Existe uma grande variedade de biossurfactantes e sua classificação é realizada de acordo com sua estrutura química e microrganismo utilizado em sua produção. Dentre os principais grupos de biossurfactantes se destacam os glicolipídios, lipopeptídios, fosfolipídios e lipídios neutros.

O glicolipídio mais conhecido é o raminolipídio, produzido por um microrganismo chamado *Pseudomonas aeruginosa*. Os raminolipídios são formados pela ligação de uma molécula de ramnose a duas moléculas de ácido β -

hidroxidecanóico (ROSENBERG e RON, 1999). A popularidade deste biosurfactante se deve à capacidade de emulsionar hidrocarbonetos, além de o microrganismo utilizar, também, hidrocarbonetos como fonte de carbono (HOLMBERG, 2001). Outros Glicolípídeos podem ser citados, como soforolípídios produzidos principalmente por *Torulopsis bombicola* e os trealolípídios, produzidos por espécies de *Mycobacterium* (HOMMEL et al., 1987).

Os lipopeptídios são moléculas formadas pela ligação de um grupo protéico a uma cadeia de ácidos graxos. A surfactina, a representante mais conhecida deste grupo (Figura 2.2), pode ser constituída por um grupo peptídico na forma neutra ou aniônica em que 7 aminoácidos estão, na maioria das vezes, arranjados em uma estrutura cíclica ligados a um ácido graxo (normalmente 13-15 átomos carbonos). O microrganismo produtor da surfactina é o *Bacillus subtilis*.

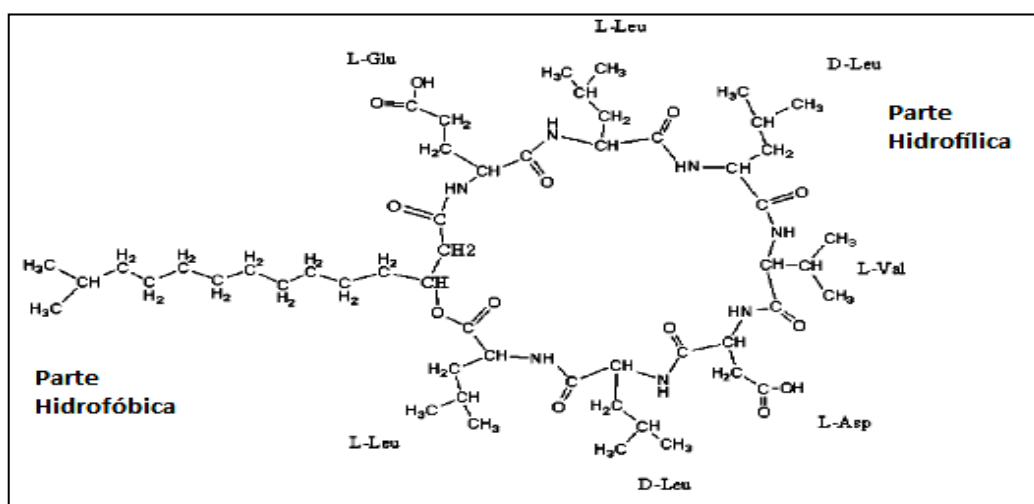


Figura 2.2: Estrutura da principal isoforma da surfactina (BARROS et al., 2007).

Este biosurfactante é conhecido como um dos mais potentes, pois é capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 a 28 mN/m em concentrações de até 0,005% (ARIMA et al., 1968) e pode apresentar propriedades interessantes de caráter biológico, como atividade antimicrobiana, antiviral e antitumoral (SINGH e CAMEOTRA, 2004).

Os fosfolípídios e os lípidios neutros são moléculas de biosurfactantes que integram a estrutura da célula (MAIER, 2003). *Acinetobacter* sp ficou conhecida após a

vesícula externa aumentar consideravelmente a sua concentração de fosfolipídio após crescimento em meios de hidrocarbonetos alifáticos (ROSENBERG e RON, 1999).

2.2 Propriedades dos biosurfactantes

Biosurfactantes são conhecidos por sua capacidade molhante e espumante, detergência, lubrificação, solubilização e dispersão de fases, emulsificação e outras.

Uma substância para ser considerada biosurfactante tem que apresentar redução da tensão superficial em pelo menos 8 unidades (VAR DER VEGT et al., 1991). Existem dois métodos muito empregados na detecção de biosurfactantes: o Índice de Emulsificação (E_{24}) e medição da tensão superficial. Esta é uma análise laboratorial que mede a altura da emulsão formada depois de 24h. O primeiro expressa o quanto o biosurfactante é capaz de formar uma emulsão estável por 24 horas, geralmente, em um solvente orgânico. O segundo emprega o uso de um equipamento (tensiômetro) o qual mede a energia livre por unidade de área requerida pra transportar uma molécula central à superfície.

Uma característica fortemente ligada à tensão superficial é a formação de micelas. A mínima concentração de micelas capaz de manter constante a tensão superficial é definida como *Concentração Micelar Crítica* (CMC). Os biosurfactantes mais efetivos são os que possuem baixos valores de CMC.

Propriedades dos biosurfactantes podem oferecer vantagens sobre os surfactantes químicos como baixa toxicidade, diversidade de estruturas químicas e biodegradabilidade.

Existem outras propriedades muito importantes dos biosurfactantes: tolerância à temperatura hostil, à mudanças de pH e a força iônica. Nitschke e Pastore (2005) submeteram um biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* à alta (121°C por 20 min) e à baixa temperatura (-18°C por 6 meses), em diferentes faixas de pH (5 a 11) e em diferentes concentrações de NaCl (de até 20%). Os pesquisadores observaram que o biosurfactante permaneceu estável sem sofrer nenhum tipo de mudança.

2.3 Aplicações dos biossurfactantes

Os biossurfactantes têm muitas aplicações, entre elas auxílio na biorremediação, recuperação de poços maduros de petróleo, emulsificador nas indústrias de alimentos e cosméticos, separador na mineração e agentes antivirais, antitumorais e antimicrobianos na medicina.

Biossurfactante em aplicações ambientais

Devido à grande importância ambiental, o ato de biorremediar é o de maior impacto, utilizando-se seres microbianos ou os seus componentes de fermentação na recuperação de áreas contaminadas para degradação de poluentes. Esta é uma aplicação muito importante devido a grandes derramamentos de petróleo onde é necessário degradar moléculas com estruturas complexas a moléculas menores.

Os danos causados ao meio ambiente pelo derramamento de petróleo são catastróficos, pois provocam impactos agudos que causam efeitos letais aos organismos. Mesmo tendo contato por um curto período de tempo, pequenas frações tóxicas se dissolvem na água. Quando há grandes exposições de petróleo, essas frações tóxicas são capazes de poluir cronicamente os meios em contato. Estes “impactos crônicos” sempre afetam algum estágio do ciclo de vida de organismos presentes naquele meio, crescimento, reprodução e desenvolvimento dos seres (SILVA, 2004).

O derramamento de petróleo pode provocar, ainda, alterações químicas e físicas a um habitat natural, como junção de óleo aos sedimentos; recobrimento da fauna e flora, e efeitos visíveis caracterizados pela morte de animais (aves, peixes, mamíferos e etc), além de sujeira nas praias e embarcações (KHANNA, 2001).

Muito embora existam ações preventivas a poluição, a extração e transporte do petróleo sempre estarão sujeitos a acidentes podendo causar um potencial risco ao meio ambiente. Por esta questão a tecnologia de biorremediação é amplamente estudada. Como é o caso do estudo da degradação de hidrocarbonetos totais em petróleo e metais pesados em amostras de solo (MANCHOLA e DUSSÁN, 2014). Os pesquisadores perceberam que cepas de *Lusinibacillus sphaericus* e *Geobacillus sp* foram capazes de

produzir biossurfactante tendo como única fonte de carbono amostras hidrocarbonetos contaminados com arsênio e cromo, reduzindo significativamente estes contaminantes nas amostras.

A aplicação de biossurfactantes não é apenas para recuperar áreas contaminadas por desastres, mas também pode ser aplicado para melhorar a recuperação de petróleo. Youssef et al. (2013) injetaram em poços de petróleo maduros uma mistura de glicose, nitrato e minerais e cepas de *Bacillus* para que a produção de biossurfactante fosse *in situ*. A estratégia deu resultados positivos no aumento de óleo na mistura final proveniente do poço.

Biossurfactante em aplicações biológicas

A importância dos biossurfactantes tem crescido nas últimas décadas por causa da identificação de atividades antivirais, antitumorais e bactericidas, podendo ser aplicados como uma alternativa no combate de doenças. A atuação dos biossurfactantes se dá diretamente pela interação com as superfícies celulares, podendo desnaturar membranas através de emulsificação de lipídios, lipoproteínas e fosfolipídios.

A surfactina, um ciclolipopeptídeo produzido pelo microrganismo *Bacillus subtilis*, é o composto surfactante mais relatado de importância farmacêutica. Kim et al. (1998) relataram a aplicação da surfactina como um agente anti-inflamatório devido à inibição da atividade da adenosina monofosfato cíclica 2 (PLA2), uma molécula extremamente importante na transdução de sinal extracelular, por supressão de respostas inflamatórias. Outros estudos indicaram que baixa concentração de surfactina, cerca de 30 μM foi capaz de desencadear atividade antiproliferativa de células de câncer do colo (KIM et al., 2007).

A surfactina pode ser um agente de superfície contra vários vírus, como Herpesvírus Humano (HSV), Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV), Calicivírus felino (FCV) e Estomatite Vesicular (VSV) (SEYDLOVÁ e SVOBODOVÁ, 2008). Faria (2010) testou a atividade antiviral da surfactina contra o Bovine Herpesvirus-1 (BoHV-1). O estudo mostrou que o biossurfactante em baixa concentração (0,25 μM) foi capaz de inibir 100% a infectividade. Isso aconteceu, porque a surfactina promoveu a

desnaturação dos componentes lipídicos e glicoprotéicos que constituem o envelope viral do vírus.

2.4 Produção de biosurfactante

Na produção de biosurfactantes não se pode negligenciar fatores, como (1) fontes de carbono e nitrogênio, (2) condições ambientais como pH, temperatura, agitação e aeração e (3) concentração de nutrientes como Mg, Fe, Mn, P, S e outros, que influenciam o tipo e a concentração. Fonte de carbono é o fator mais importante na produção, porque determina a estrutura do biosurfactante. Os outros fatores aliados à fonte de carbono ajudam substantivamente no aumento do rendimento. A depender do microrganismo produtor, a produção pode ser induzida por substratos solúveis e insolúveis em água (KARANTH et al., 1999).

Pseudomonas aeruginosa conseguem se adaptar e produzir biosurfactantes em meios de fermentação em que a fonte de carbono seja um hidrocarboneto. Déziel et al. (1999) proporcionaram um meio de fermentação a base de naftaleno para este microrganismo, que em comparação com o meio convencional (fonte de carbono base de glicose) houve um aumento significativo da concentração.

O *Bacillus subtilis* possui maior afinidade por meios de fermentação com fonte de carbono miscível em água. Faria (2010) comparou a utilização de glicerina e óleo de mamona como fonte de carbono na fermentação por *Bacillus subtilis* e verificou uma redução da tensão superficial apenas no meio contendo glicerina, o que evidencia a produção de biosurfactante.

Produção de biosurfactante a partir de substratos de baixo valor agregado

Do ponto de vista econômico, os biosurfactantes ainda não são competitivos como os surfactantes sintéticos, pois seu custo de produção é de 3 a 10 vezes maior (KRONENBERGER et al., 2008). O que justificaria a substituição dos surfactantes sintéticos pelos biosurfactantes, além das vantagens nas aplicações, é a melhoria na rota de produção, utilizando fontes renováveis como matéria-prima para constituir os meios de fermentação. A utilização de resíduos na produção de biosurfactantes tem

sido incentivada, porque além do apelo ambiental de destinação dos mesmos (dependendo do resíduo) há uma grande carga nutricional nessa matéria-prima que não seria aproveitada.

Ultimamente, têm surgido estudos empenhados em buscar meios de fermentação economicamente viáveis. Os meios de cultivo empregados como substratos para o crescimento microbiano à base de peptona, extrato de carne e sais minerais são muito caros, equivalendo a quase 30 % do custo de produção. O uso de resíduos agroindustriais representa a alternativa mais viável para esse problema, uma vez que os mesmos são gerados em grandes quantidades, devido ao Brasil ser um dos maiores produtores agrícolas.

Rahman et al. (2002) estudaram a produção de biosurfactante usando materiais de baixo custo na fermentação por duas cepas que degradam óleo, *Pseudomonas aeruginosa* GS9-119 e DS10-129. Os meios de cultivo foram óleo de soja, óleo de girassol e glicerol. A relação entre as diferentes concentrações e o quanto elas são significativas no processo de produção foram determinadas pela otimização. Foi identificada a produção de biosurfactante ramnolipídico pela caracterização, usando um espectrômetro de massa. A atividade emulsificante do biosurfactante foi maior que 70% para todos os hidrocarbonetos testados: xileno, benzeno, hexano, óleo cru, querosene, gasolina e diesel.

O trabalho de Hónorio (2003) selecionou, após análise dos resultados de tensão superficial, duas linhagens de leveduras (*Geotrichum terrestre* e *Cryptococcus sp*) como potenciais produtoras de biosurfactante utilizando efluentes provenientes de uma oficina de reparo de caminhões como fonte de carbono.

Matsuura et al. (2004) avaliaram a produção de biosurfactante em meios de cultura diferentes por *Planococcus citreus*. Os meios eram compostos tanto por uma parte sintética (base mineral: Mg, P, K) quanto por uma parte de resíduos (óleo de fritura e óleo diesel). Maior produção de biosurfactante se deu quando havia a mistura de óleo de fritura e sais minerais.

Resíduos agroindustriais que contém altas concentrações de carboidratos ou lipídeos são bastante usados na produção de biosurfactante. Prova disso é o estudo da produção de biosurfactante usando melaço e proteína do leite, desenvolvido por Joshi et al.(2007), tendo o *Bacillus subtilis* como principal cepa produtora. Rodrigues (2006) substituiu meio sintético à base de glicose por proteína de queijo e melaço na produção de biosurfactante por *Lactococcus lactis* e *Streptococcus thermophilus*. Esta substituição acarretou no aumento da concentração micelar em cerca de 1,5 vezes, promovendo mais interações e também uma redução dos custos de produção em aproximadamente 60%.

Foi estudada também a habilidade do microrganismo *Rhodococcus* em produzir agentes redutores de tensão superficial (biosurfactantes) a partir do óleo de fritura residual. Esta fonte de carbono se mostrou bastante efetiva, reduzindo a tensão superficial da água, de 72,24 para 31,9 mN/m (SADOUK et al., 2008).

Como os primeiros indícios de aparecimento de biosurfactante foi no mar, a produção dos mesmos por uma aceto bactéria marinha (*Bravbacterium aureum* MSA13) foi analisada usando uma combinação de resíduos por Kiran et al. (2010). O meio fermentativo que continha melaço, óleo de oliva, acrilamida e $FeCl_3$ apresentou produção de agente tensoativo com características de um lipopeptídeo com uma sequência de pequenos aminoácidos. Percebeu-se, também, que o pH influenciava negativamente na produção se atingisse valores fora do intervalo 5-9. A média de tensão superficial alcançada entres esses limites chegou a 28,56 mN/m, considerada satisfatória à produção.

Guadiña et al. (2015) estudou a produção de biosurfactante em meios que continham melaço e água de maceração de milho suplementados por micronutrientes pela fermentação de *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados mostraram que o biosurfactante produzido reduziu a tensão da água para 30 mN/m, apresentou índice de emulsificação de 60 % e concentração micelar crítica de 50 mg/L.

A inserção parcial de resíduos ao meio de fermentação é observada em muitos trabalhos, mas não se descarta a utilização dos substratos sintéticos. Por isso surge a

necessidade de buscar por metodologias que utilizam apenas resíduos. A exemplo da manipueira (BARROS et al., 2007) e resíduos de laranja com óleo de fritura (SANTOS et al., 2010) como único substrato para fermentação do microrganismo. O resíduo da manipueira (que é altamente tóxico) proveniente do processamento da farinha de mandioca, porém rico em carboidratos e minerais essenciais, foi testado como fonte de substrato na fermentação de *Bacillus subtilis* por Costa (2005). Para tanto foi utilizado um fermentador de bancada de onde se conseguia acompanhar a evolução do pH, atividade superficial, consumo de carboidratos e produção de biosurfactante. O metabólito produzido teve característica surfactante, reduzindo a tensão superficial de 47,74 (do meio) para 25,96 mN/m e índice de emulsificação em óleo de Palma de mais 94%.

2.5 Aspectos de engenharia ligados à produção de biosurfactante

Embora haja alguns trabalhos empenhados em descobrir meios de fermentação alternativos, como o uso de resíduos, isso às vezes não é o suficiente para tornar o processo atrativo a uma produção industrial. Utilizar estratégias de planejamento experimental de processos e adaptar uma planta de produção às necessidades de fermentação por microrganismos pode ser o começo de uma produção em larga escala. A Figura 2.3 representa os passos experimentais necessários para aumentar a escala de produção como preparo do inóculo, que representa uma das fases de adaptação, até chegar ao biorreator industrial.

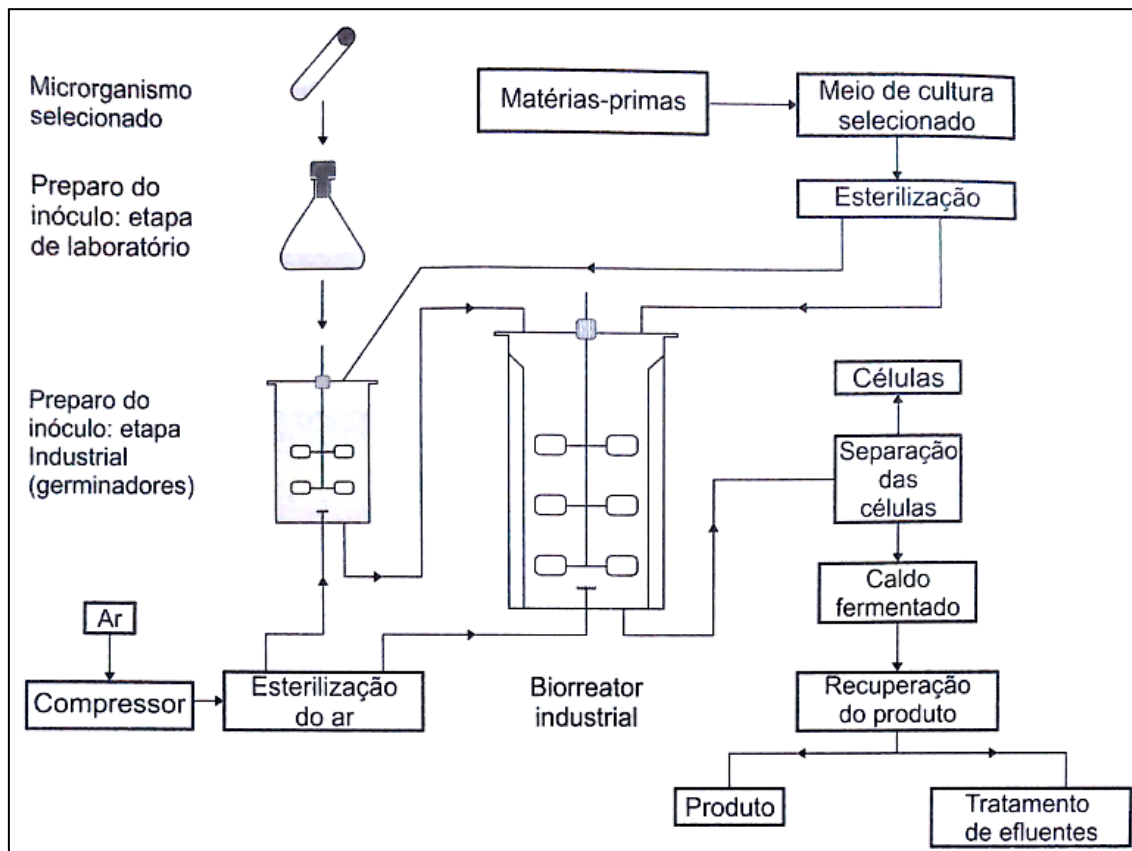


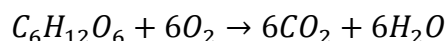
Figura 2.3: Esquema geral de um processo fermentativo (SCHMIDELL et al., 2001).

Muitos fatores podem influenciar na produção de biossurfactante como a presença de compostos lipofílicos, por variação do pH, aeração, agitação, temperatura, ou quando o crescimento celular é mantido sob condições de estresse, como baixa concentração da fonte de nitrogênio (DESAI & BANAT, 1997).

A importância da agitação e aeração na maioria dos processos que produzem biossurfactante é, sobretudo, na formação de espuma que neste caso é necessário. A espuma formada no meio é um forte indicativo da produção de biossurfactante e é onde o mesmo se concentra. Por isso, contar com um sistema de exaustão acoplado ao fermentador é algo interessante na hora de desenvolver projetos de engenharia.

Além disso, o oxigênio é um elemento utilizado no metabolismo dos microrganismos aeróbios ou aeróbios facultativos. Ao final da cadeia respiratória o oxigênio é reduzido à água, permitindo que ocorra a reoxidação das coenzimas que participam das reações de desidrogenação e permitindo o armazenamento de energia

(SCHMIDELL, 2001). O consumo da fonte de carbono aumenta como o aumento do consumo de oxigênio (visto na estequiometria), por conseguinte o aumento da concentração de células.



As rotas metabólicas destinadas na produção de biossurfactante são diversificadas e dependem da natureza da principal fonte de carbono disponível no meio de cultivo (FONTES et al., 2008). A exemplo quando se utiliza apenas carboidratos como fonte de carbono no substrato para a produção de glicolípídeo, o fluxo de carbono é regulado de tal forma que ambas as vias lipogênicas (para formação de lipídeos) e de formação da porção hidrofílica (via glicolítica) são supridas pelo metabolismo microbiano, como mostra Figura 2.4 (SYLDATK & WAGNER, 1987).

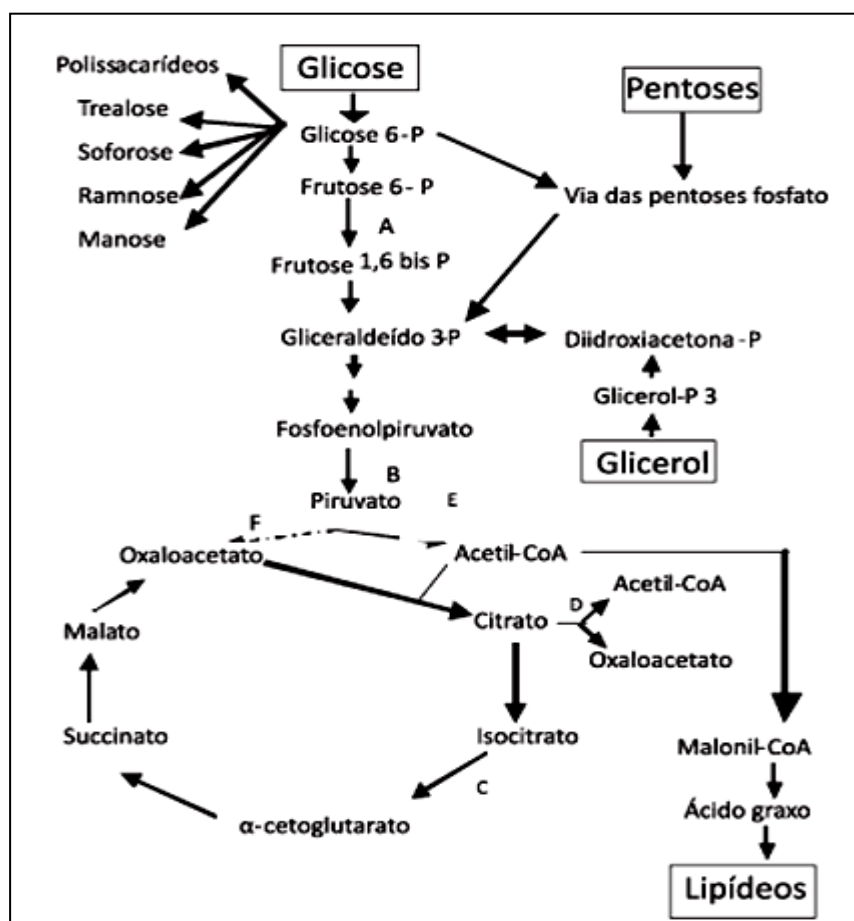


Figura 2.4: Metabolismo intermediário para produção de biossurfactante a partir de carboidratos como substrato (SYLDATK & WAGNER, 1987).

Assim é possível entender que o sistema de agitação e aeração pode fornecer uma dada quantidade de oxigênio para a manutenção de uma dada atividade respiratória, fazendo a transferência do oxigênio da fase gasosa para fase líquida e assim chegando às células para serem consumidos na reação.

Planejamento experimental

A teoria estatística pode ser utilizada como uma metodologia para tomada de decisão em processos através de análises de planejamento experimental e dos gráficos de superfície de resposta, minimizando custos e/ou maximizando rendimento e produtividade. O delineamento de planejamento experimental com adição de pontos axiais é uma estratégia de investigação inicial em relação aos efeitos das variáveis estudadas sobre as respostas desejadas, afinando-se para fazer a otimização necessária.

Segundo Rodrigues e Iemma (2009) os delineamentos em esquema fatorial 2^k , ocorrem quando temos k fatores e dois níveis. Eles são muito utilizados em laboratórios e/ou locais onde as fontes de variações são, normalmente, bem controladas. As interações entre os fatores e a conformação espacial entre os pontos axiais podem ser vistos na Figura 2.5.

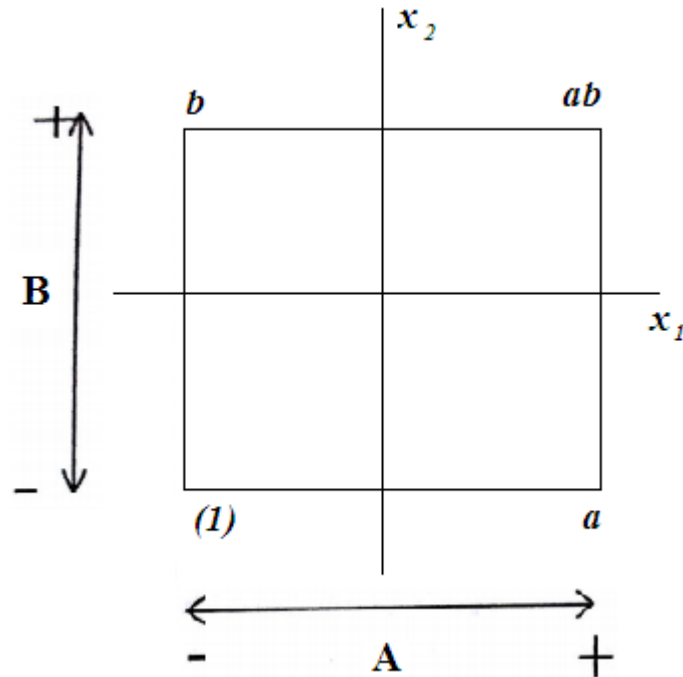


Figura 2.5: Esquema de cálculo dos efeitos principais no fator 'A' e 'B'.

Onde os efeitos são calculados por conforme Equações (2.1)

$$A = \frac{a+ab}{2} - \frac{(1)-b}{2} \quad (2.1)$$

$$B = \frac{b+ab}{2} - \frac{(1)+a}{2} \quad (2.2)$$

$$AB = \frac{ab-1}{2} - \frac{a+b}{2} \quad (2.3)$$

O modelo estatístico é ajustado em relação a um limite de confiança determinado pelo operador (Equação 2.4), inerente a variações controladas (pontos centrais) constituindo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 \quad (2.4)$$

Onde x_1 e x_2 são variáveis codificadas, β_0 é a média geral das respostas e β_1 , β_2 , β_{12} , β_{11} e β_{22} são os parâmetros do modelo de regressão, que são estimados através do método dos mínimos quadrados, assim:

$$\beta_1 = \frac{A}{2}, \beta_2 = \frac{B}{2}, \beta_{12} = \frac{AB}{2}$$

Para validar o modelo estatístico faz-se análise da variância (ANOVA), construindo uma tabela com os coeficientes de regressão, soma dos quadrados, quadrados médios e a porcentagem da distribuição F.

Visando a otimização do rendimento de processos e formulações que conduzem a maior aceitação do produto, faz-se necessário a utilização de planejamento experimental, que é a constatação da influência de variáveis sobre as suas respostas. Essa metodologia estatística permite a redução do número de experimentos (ou tentativas) uma vez que os fatores conseguem ser combinados, sem utilizar procedimentos isolados de tentativa e erro.

No trabalho de Santos et. al. (2010) o uso de óleo de fritura, glicerina e bagaço de laranja configurou na produção de biosurfactante através da fermentação pela cepa LB09 isolada de borra de petróleo. As condições de fermentação foram otimizadas usando o software STATISTICA 6.0. Dessa maneira os autores perceberam que o caldo proveniente da fermentação era capaz de reduzir a tensão superficial da água até 27,49 mN/m, além de apresentar um índice de emulsificação acima de 40 % em hexano e tolueno. O biosurfactante produzido foi aplicado em teste de biorremediação, simulando contaminação do solo por petróleo. Com a lavagem desse biosurfactante, o resíduo oleoso conseguiu ser totalmente removido da areia.

Barros (2007) também trabalhou usando manipueira como substrato na fermentação por *Bacillus subtilis* em escala piloto. Primeiramente foram identificadas as melhores condições de operação utilizando planejamento experimental fracionado 2^{4-1} com repetição dos pontos centrais para melhorar o rendimento na fermentação. Foram identificadas três variáveis como significativas no processo, partindo assim para um delineamento composto central 2^3 , através do qual as mesmas foram otimizadas. Em seguida, os experimentos foram realizados num biorreator de bancada em batelada de 40 litros por 60 horas adaptado com sistema de recolhimento de espuma e condições fixas de temperatura, agitação e aeração. A cada 12 horas de fermentação eram coletadas amostras para análises de açúcares totais e redutores, pH, contagem de

UFC/ml e tensão superficial no caldo e na espuma. Os resultados mostraram o perfil da fermentação, com metabolização dos açúcares, aumento exponencial do número de microrganismos após 12 horas de fermentação. O pH variou de 5,40 para 7,63 em aproximadamente 36 horas devido ao metabólitos lançados no meio. A tensão superficial no início do experimento era de 50 mN/m, diminuiu com o crescimento exponencial das células para 33 mN/m, e finalizou a fermentação nos 50 mN/m. Isso aconteceu, porque a espuma produzida no meio arrastou quase que todo o biosurfactante, a mesma apresentou valores de tensão superficial por volta de 27 mN/m.

Faria (2010) testou a produção de biosurfactantes por *Bacillus subtilis* em substratos orgânicos não convencionais como glicerina padrão, glicerina bruta (proveniente da produção de biodiesel), óleo diesel, petróleo, óleo de mamona, óleo de fritura e torta de algodão. Dentre eles, o resíduo que apresentou menor valor da tensão superficial foi a glicerina bruta (redução de 50 para 28 mN/m). Para ser avaliado o efeito de temperatura e concentração de glicerina bruta, foi utilizado um planejamento experimental 2^2 completo com axiais tendo como resposta a CMC e Tensão Superficial. Através do gráfico de superfície de resposta e de contorno foi possível identificar as regiões ótimas de trabalho, temperatura 31-37°C e glicerina 3-5,5% (v/v). O autor ainda reportou fermentações em batelada simples em fermentador de bancada de 1,5 litros em três rotações diferentes (150, 250 e 350 rev.min⁻¹) para testar o crescimento microbiano e a formação efetiva de espuma com o menor valor de tensão superficial, onde o valor de 250 rev.min⁻¹ apresentou o maior rendimento de espuma com ação surfactante. Após os melhores resultados no fermentador de 1,5 litros, foram realizados experimentos em maior escala num fermentador de 10 litros que apresentou cinética de crescimento e produção de espuma semelhante.

Controle do processo de produção de biosurfactante

Uma metodologia para controle das variáveis envolvidas em planta industrial ou planta piloto também é algo importante, pois mantém a variável controlada no valor especificado, comparando o valor da variável medida, ou a condição a controlar, com o valor desejado (ponto de ajuste ou *set point*), e fazendo as correções em função do

desvio existente entre estes dois valores, sem a necessidade da intervenção do operador. O planejamento experimental, também, pode ser essencial para definição de estratégia de controle como a determinação de *set points* e o tipo do controlador a ser implementado, convencional ou avançado (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

Do ponto de vista de controle de processos, existem poucos trabalhos que tratam de manter as variáveis significantes à produção de biosurfactante dentro de limites que garantam melhor ou maior rendimento do produto. Kronemberger et. al. (2008) trabalhou na produção de biosurfactante do tipo Ramnolipídeo em um biorreator adaptado para controle do processo. A cepa usada para fermentação foi *Pseudomonas aeruginosa* isolada de meio oleoso. Para o estudo do microrganismo na dependência de oxigênio, um dispositivo de oxigenação não dispersiva e um controlador lógico programável foram utilizados para acionar o controle de oxigênio dissolvido (OD). As taxas de oxigenação obtidas devido as concentrações diferentes de OD foram comparadas com o crescimento bacteriano, com o consumo da fonte de carbono e concentração de ramnolipídeo. Então, percebeu-se que a demanda de oxigênio durante a fermentação variava muito à medida que havia o aumento da concentração de biomassa e o consumo do substrato. Os ensaios, também, mostraram que o sistema de controle de OD funcionou bem, mantendo as concentrações dentro das variações desejadas.

O potencial de *Lactococcus lactis* CECT-4434 como produtor de biosurfactante para aplicações industriais, explorando a possibilidade de recuperação dos metabolitos foi investigado (RODRÍGUEZ et. al., 2010). O estudo contemplou, dentre outras coisas, a habilidade dessa cepa em produzir biosurfactante sob pH controlado e foi feita uma comparação com experimentos sem controle. Os resultados desse trabalho mostraram que sob condições controladas de pH a cepa consome suas fontes de energia a diferentes taxas, na maioria das vezes mais rapidamente quando o valor tende a neutralidade, diminuindo o tempo de fermentação em relação aos experimentos sem controle (RODRÍGUEZ et. al., 2010).

Sensores virtuais ou soft sensors

A grande dificuldade enfrentada na produção industrial de biossurfactantes é que não se consegue medir determinadas variáveis em tempo real, pois os sensores que podem realizar tais medições não existem. Pode-se citar pertinente a esse contexto a medição da concentração de biomassa, índice de emulsificação e o valor de tensão superficial, sendo necessária a coleta de amostras de forma manual para que posteriormente passe por análise laboratorial e assim serem fornecidos os valores. Uma alternativa a isso é a construção de *soft sensor* que tem a mesma função de um sensor físico, porém o valor da variável lida não vem direto do processo e sim de cálculos de um modelo matemático, que tem como entrada valores de variáveis secundários medidas durante a execução.

Segundo Fortuna et al.(2006) e Keeler (1997) os *soft* sensores oferecem inúmeras vantagens:

- Podem trabalhar em paralelo com sensores de *hardware*, dando informações úteis para tarefas de detecção de falhas, e também permitindo a realização de processos mais confiáveis;
- Representam uma alternativa de baixo custo em relação aos dispositivos de *hardware* utilizados em sensores comuns, permitindo a realização de redes de monitoramento mais abrangentes e evitando as frequentes manutenções necessárias nos dispositivos dos sensores;
- Permitem uma estimativa em tempo real dos dados, ultrapassando os atrasos de tempo introduzidos por sensores físicos lentos ou análises laboratoriais demoradas, melhorando a performance das estratégias de controle.

Redes neurais artificiais para modelagem do processo

Um dos métodos empregados para construção de um *soft* sensor é a modelagem baseada em redes neurais artificiais (RNA). RNAs se constituem em um modelo matemático inspirado no funcionamento dos neurônios biológicos. Eles são modelos multivariáveis que aprendem a dinâmica de processos, a interação entre as variáveis e as

não-linearidades dos mesmos. Por meio de ajustes de pesos da rede neural, diversas aplicações envolvendo predições de dados podem ser alcançadas, como em Santos et al. (2012) que desenvolveram modelagem para predição de temperatura em um processo de polimerização de estireno. Dessa forma, os soft sensores baseados em redes neurais podem aprender com boa precisão numérica o comportamento do processo (FERREIRA et. al., 2010).

Para o funcionamento das RNAs é necessário designar o algoritmo de aprendizado e as funções de ativação. Segundo o livro Redes Neurais Artificiais de Braga, Carvalho e Ludermir (2007) o aprendizado é o processo pelo qual os parâmetros livres de uma RNA (pesos e bias) são ajustados por meio de uma forma continuada de estímulo pelo ambiente externo. E a função de ativação é responsável por gerar a saída do neurônio a partir dos valores dos vetores de peso e de entrada (ver Figura 2.6). As funções de ativação frequentemente aplicadas são para problemas não-lineares são:

1) Função Logística (logsig): $f(x) = \frac{1}{1+e^{-ax}}$, onde a é o parâmetro de inclinação da função.

2) Função Tangente Hiperbólica (tansig): $f(x) = \frac{1-e^{-x}}{1+e^{-x}}$.

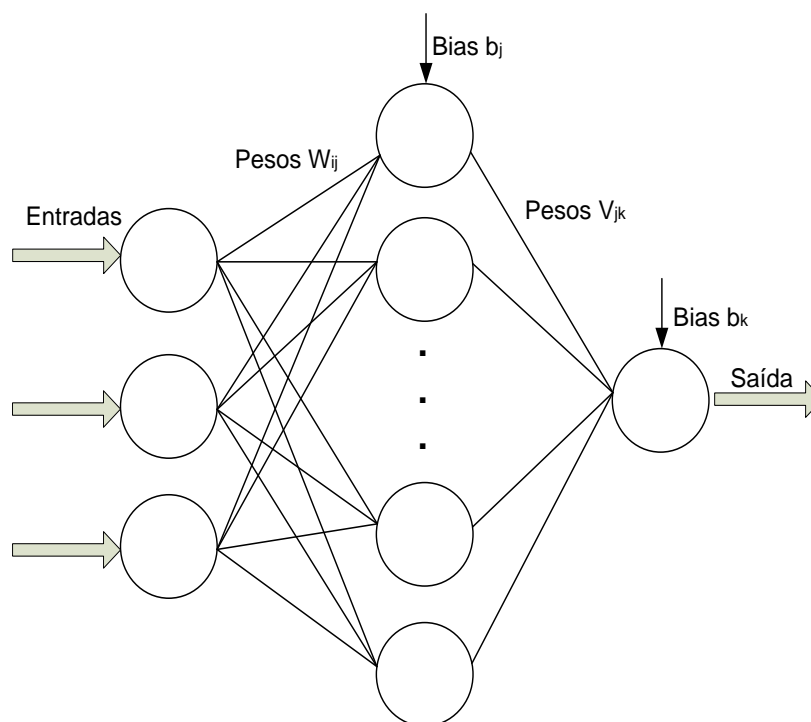


Figura 2.6: Funcionamento de uma rede neural.

De uma forma geral, os sinais normalizados vindos da camada de entrada ativam a camada intermediária, onde são ajustados pelos pesos e *bias*, em seguida os resultados calculados pelas funções de ativação são emitidos como sinais para a camada posterior. Ao chegar na camada de saída, o conjunto de sinal calculado é desnormalizado, denominado como resposta da rede. Normalmente o banco de dados disponível é dividido em duas partes: 75% destinado para o treinamento e 25% destinados para o teste.

A definição da estrutura de uma RNA para resolução de um determinado problema depende de vários fatores, como a complexidade do problema, características dinâmicas ou estáticas, conhecimento *a priori* do problema e representatividade dos dados.

Albuquerque et. al. (2008) desenvolveram um *soft sensor* baseado em redes neurais para fazer estimativas *on-line* da concentração de biomassa na produção de biossurfactante a partir de *Candida lipolytica*. A configuração para a construção do *soft sensor* contou com 2 neurônios na camada de entrada (pH e OD), 4 neurônios na camada intermediária e 1 na camada de saída. Os dados utilizados para treinamento e

teste foram os obtidos do planejamento experimental 2^2 e o meio otimizado foi à base de água do mar. Os resultados mostraram que o soft sensor teve uma boa capacidade preditiva, com um coeficiente de correlação de 0,972 e raiz do erro quadrático médio de 0,021.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Metodologia

3.1.1 Seleção de microrganismo e meio cultivo alternativo para produção de biossurfactante

Há uma variedade de microrganismos produtores de biossurfactantes. Neste estudo investigou-se o emprego do *B. subtilis* isolado de solo contaminado com petróleo preservado no laboratório de microbiologia do CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas). O potencial para produção de biossurfactante pode depender da genética singular de cada microrganismo, mas também depende de fatores como condições ambientais e natureza dos substratos.

A cepa de *Bacillus subtilis* foi mantida em tubos de ágar nutriente inclinado a 4°C e replicada periodicamente.

Preparo dos resíduos

Os resíduos adquiridos precisaram ser separados em lotes para garantir a mesma ou quase a mesma composição para todos os experimentos realizados no presente estudo.

A glicerina residual advinda do processo de produção de biodiesel (doada pela SPbio Sumaré/SP) foi tratada com ácido clorídrico para separação em fases: ácidos graxos e glicerol. A fase correspondente ao glicerol foi homogeneizada antes de ser separada em recipientes adequados para ser levada a refrigeração. Desta forma, toda vez que se faziam experimentos, apenas um destes recipientes era retirado e o restante se mantinha reservado.

O resíduo à base da casca de beterraba foi adquirido da rede de restaurantes Tempero Maneiro, onde foi triturado com ajuda de um liquidificador para melhor aproveitamento pelo microrganismo. O resíduo seco é irregular, por isso foi batido com água destilada, obtendo-se resíduo homogêneo líquido. Para cada 1 kg de resíduo seco foi utilizado 750 mL de água. A utilização da água modifica a característica do resíduo

originalmente seco, por isso utilizaram-se proporções de volume para formação do meio. Uma vez processado, todo o resíduo foi homogeneizado, separado e congelado.

A água de maceração de milho, doada pela Cargill Brasil Mogi Mirim/SP, não precisou de nenhuma manipulação para ser utilizada, pois esse resíduo já vem processado e semi-purificados.

3.1.2 Preparo e padronização do inóculo

Fermentação em frascos Erlenmeyer

Os inóculos para a fermentação em frascos Erlenmeyer foram preparados através da transferência de alçadas do microrganismo contido em estoque para frascos Erlenmeyer de 50mL, contendo 20 mL de caldo nutriente, em seguida levado a agitação orbital a 100 rpm durante 8 horas (Figura 3.1). A temperatura foi mantida em 30°C. Após esse tempo o meio contendo as células foi adicionado na proporção de 10% em volume nos frascos contendo 100 mL de caldo nutriente. Os frascos foram mantidos a 30°C e agitação de 100 rpm no agitador orbital durante 14 horas até que o número de células atinja a concentração ideal para inoculação (fase logarítmica). Para padronização das células inoculadas, a cultura foi submetida à leitura de densidade óptica em espectrofotômetro modelo *GENESYS 10S UV-VIS (Thermo Scientific, co)* a 625 nm e avaliou-se a concentração celular, ajustando (através de diluição com solução salina, quando necessário) para que as mesmas apresentassem absorbância entre 0,08 e 0,1 que correspondem à ordem de 10^8 UFC/mL (procedimento padrão do Laboratório de Microbiologia do CPQBA).

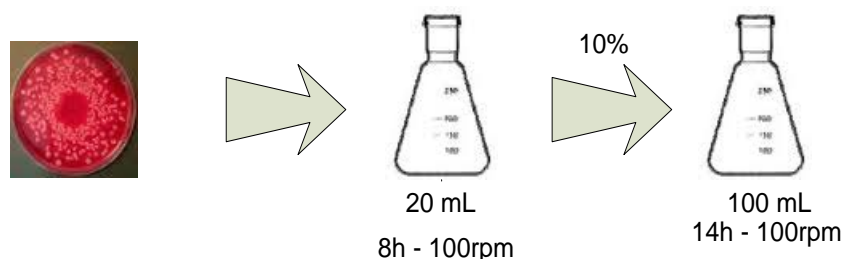


Figura 3.1: Preparo do inóculo para fermentação em frascos Erlenmeyer.

3.1.3 Teste de produção com o meio alternativo

O potencial de produção do biossurfactante foi avaliado em escala laboratorial através do cultivo do microrganismo produtor disponível (*Bacillus subtilis*) no meio de fermentação alternativo (glicerina residual, casca de beterraba e água de maceração de milho). O uso de resíduos é de difícil incorporação em meios de fermentação. Para tanto, deve-se verificar se os mesmos podem fazer parte diretamente do meio que receberá os microrganismos. No estudo em questão, foi necessário fazer tratamento ácido (ácido clorídrico 6M) da glicerina residual, ajustando o pH $\cong 2,0$ para eliminação de impurezas que pudessem prejudicar o desenvolvimento do microrganismo. Assim, foi levada a um funil de separação onde observaram-se duas fases formadas: uma contendo principalmente ácidos graxos e a outra contendo principalmente o glicerol. A fase contendo o glicerol (a desejada) foi levada à chapa de aquecimento, ficando a 40 °C por 15 min para que diminuísse a concentração dos resíduos voláteis (como alcoóis). Por fim, ajustou-se o pH $\cong 7,0$ com hidróxido de sódio e a fase foi guardada em recipiente sob refrigeração a -4°C.

3.1.4 Determinação do crescimento microbiano (CM)

Para determinar a crescimento microbiano, amostras foram colhidas e levadas imediatamente ao espectrofotômetro para leitura de absorbância (ABS) em espectrofotômetro modelo *GENESYS 10S UV-VIS (Thermo Scientific, co)* a 625 nm e avaliou-se a crescimento microbiano.

3.1.5 Oxigênio Dissolvido (OD)

O oxigênio dissolvido foi mensurado a partir da amostra recolhida. A mesma foi levada ao oxímetro, onde em poucos segundos obteve-se o valor de sua concentração em mg/L.

3.1.6 Índice de emulsificação (E_{24}) e tensão superficial (TS)

Para realização da análise do índice de emulsificação, baseou-se no método de Cooper e Goldenberg (1987). O caldo fermentado foi centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos, ficando livre das células. Em seguida foi coletado 2 mL do sobrenadante e

misturarado com 2 mL de tolueno em tubos de ensaio. Após a agitação por 2 minutos em vortex, a mistura ficou em repouso por 24 horas e o índice de emulsificação foi calculado pela equação:

$$E_{24} = \frac{AE_{24h}}{AE_{0h}} \times 100 \quad (3.1)$$

Onde,

AE_{24h} é a altura da emulsão formada em 24 horas;

AE_{0h} é a altura da emulsão no tempo zero.

Para a medida de tensão superficial, o sobrenadante obtido no ponto de amostragem foi centrifugado e levado para leituras em um tensiômetro (K10S-Krüß) por meio da técnica de placa iridiada em condições controladas (temperatura ambiente de 25 °C) e rapidamente (15 min) obteve-se o valor da tensão do meio. Assim, foi possível comparar a tensão das amostras com a da água (padrão $\cong 72$ mN/m a 25°C).

3.1.7 Determinação da concentração de glicose (CG)

Para determinação da concentração de glicose usou-se kit de glicose bioquímica da marca LaborLab. Para tanto, 10 μ L da amostra do sobrenadante (quando necessário fez-se diluição) foi coletada e adicionada a 1mL da solução reagente (fornecida pelo fabricante) e em seguida foi levado ao banho-maria por 5 minutos a 37°C. Ao mesmo tempo, uma amostra da solução com concentração padrão de glicose também foi feita, para comparação, e foi levada as mesmas condições da amostra com o sobrenadante. Logo após foram levadas ao espectrofotômetro a 505 nm e lidas as absorbâncias imediatamente o que possibilitou o cálculo do resultado abaixo:

$$f = \frac{100mg/dL}{P} \quad (3.2)$$

Onde f é o fator de correção e P é absorbância da solução padrão.

$$CG = A * f \quad (3.3)$$

CG é a concentração de glicose e A é a absorvância da amostra.

3.1.8 Concentração do biossurfactante (CB)

A recuperação da surfactina foi realizada através da coleta da espuma formada durante a fermentação. Assim, forçou-se a liquefação da espuma com o auxílio de um secador. A mesma foi centrifugada a 10000 rpm por 15 minutos para remoção de células. O sobrenadante foi submetido à precipitação ácida por adição de ácido clorídrico concentrado até $\text{pH} \cong 2$, ficando em repouso por 24 horas, refrigerado a 4°C para total decantação. O precipitado foi separado do sobrenadante através de microfiltração em membranas de 0,22 μm e levados à estufa por 24h a 50 °C, totalizando um tempo de 48 h até que a resposta pudesse ser mensurada.

3.2 Planejamento experimental e otimização do meio de produção

Desenvolveram-se no *software STATISTICA* planejamentos com o objetivo de determinar a melhor composição do meio de fermentação proposto, correspondente aos experimentos em frascos Erlenmeyer. Desenvolveu-se outro planejamento experimental para determinar as melhores condições experimentais a partir de duas variáveis de operação (agitação e concentração de oxigênio dissolvido) no fermentador, tendo como resposta o índice de emulsificação, concentração do biossurfactante e redução da tensão superficial.

Planejamento experimental para determinação da composição do meio de fermentação

Para este estudo, foram utilizados os resíduos de glicerina bruta, resíduo de beterraba e água de maceração de milho, como descrito no item 3.1.3. Os resíduos utilizados foram selecionados para se obter fontes de carbono, minerais e de nitrogênio para suprir a necessidade de produção de biossurfactante pela cepa.

A proposta para formulação do meio de fermentação foi a utilização de uma estratégia experimental de planejamentos. Primeiramente foi utilizado o Delineamento Composto Central Rotacional 2^3 com três pontos centrais e seis pontos axiais,

totalizando 17 experimentos e as respostas avaliadas foram: a concentração de biossurfactante e o índice de emulsificação.

Neste contexto, a Tabela 3.1 mostra os níveis do planejamento experimental. Os pontos do tipo $\pm\alpha$, onde $\alpha = (2^k)^{\frac{1}{4}}$. Então, para 2^3 , $\alpha = \pm 1,68$.

Tabela 3.1: Tabela de fatores para formulação do meio de fermentação.

Variáveis (% V/V)	Código	Níveis				
		-1,68	-1	0	+1	+1,68
Glicerina	X ₁	0,0	2,0	5,0	8,0	10,0
Resíduo de beterraba	X ₂	0,0	1,2	3,5	5,4	7,0
Água de maceração de milho	X ₃	0,0	1,0	2,5	4,0	5,0

Os cálculos para composição da Tabela 3.1 foram feitos através de interpolação entre os pontos centrais e axiais definidos pela faixa de estudo, alguns valores dos níveis foram aproximados, mas muito próximos da geometria definida. Assim, determinada a composição do meio de fermentação, em frascos Erlenmeyers de 500 mL, que possa produzir biossurfactante, segue-se para utilização das mesmas no fermentador de 7L. No fermentador também foi aplicada a estratégia de otimização por planejamento experimental.

3.3 APARATO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi desenvolvido com apoio da Divisão de Microbiologia do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) e do Laboratório de Bioaromas, localizado na Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) na Unicamp.

O aparato experimental utilizado foi adaptado para o estudo (Figura 3.2) e continha: Fermentador encamisado; Agitador com propulsor de três pás planas; Sensores de temperatura; Sensor de pH; Sensor de Oxigênio dissolvido; Bomba

peristáltica; Linha de ar comprimido; Válvula para controle do oxigênio; Frasco para ácido e base; Controlador lógico programável; Sistema Supervisório.



Figura 3.2: Fotos do Fermentador de bancada automatizado (Laboratório da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp).

3.3.1 Ensaio em fermentador

Preparo do inóculo

A fermentação foi conduzida em biorreator ou fermentador (Bioflow 310 New Brunswick, co) com capacidade nominal de 7L, sendo neste trabalho utilizado o volume de 4,5L. O inóculo para condução da fermentação no fermentador foi preparado através da transferência de alçadas do microrganismo para frasco Erlenmeyer contendo 50 mL de caldo nutriente, seguido da incubação em agitador orbital a 100 rpm e 30 °C durante 8 horas. Após esse tempo, o meio contendo as células foram adicionados na proporção

de 10% em volume em frasco Erlenmeyer em maior volume, formando 500 mL de caldo nutriente (Figura 3.3). O frasco foi levado ao agitador orbital nas mesmas condições por mais 14h. Após este período, foi realizada a padronização das células através da leitura da densidade óptica em espectrofotômetro *GENESYS 10S UV-VIS – Thermo Scientific* a 625 nm e avaliou-se para obter uma concentração padrão de absorbância do meio entre 0,08-0,1.

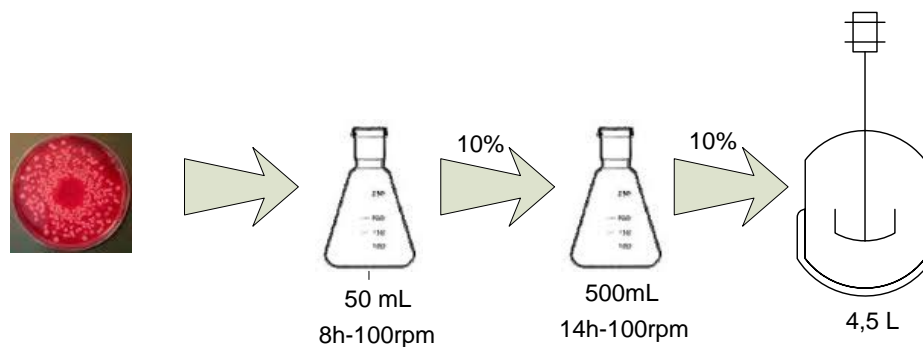


Figura 3.3: Preparo do inóculo para fermentação em fermentador.

3.3.2 Planejamento experimental para variáveis do fermentador

As variáveis que foram monitoradas na fermentação são agitação, aeração, temperatura, concentração microbiana (CM), concentração de glicose (CG), oxigênio dissolvido (OD), tensão superficial (TS), tensão superficial diluída 10x (TS^{-1}), tensão superficial diluída 100x (TS^{-2}) e concentração de biossurfactante (CB). Algumas delas foram mensuradas online (como agitação, aeração e temperatura). Para as variáveis restantes foi necessária coleta de amostras para determinação dos valores. Todas as variáveis puderam ser mensuradas rapidamente, com exceção da concentração biossurfactante que demorou aproximadamente 48h. É bom ressaltar que os experimentos foram realizados em duplicata, uma vez que dois fermentadores foram utilizados.

Nesta seção, a aplicação de planejamento experimental foi realizada para investigar o melhor valor de operação, possibilitando o aumento da concentração de biossurfactante. Para composição do estudo foram selecionadas como variáveis independentes agitação e aeração, e como variáveis dependentes a redução da tensão

superficial (relação entre a tensão superficial do meio antes e após fermentação) e concentração de biossurfactante produzido.

A temperatura é uma variável importante para investigação, mas por avaliação de outros trabalhos decidiu-se fixá-la em 37°C para todos os experimentos. Esta decisão foi baseada nos trabalhos de Farias (2010) e Barros (2007) que utilizaram o microrganismo *Bacillus subtilis*, pois nessa temperatura foi observado o melhores resultados de tensão superficial.

Assim foi determinado um DCCR 2² com 3 pontos centrais e 4 pontos axiais, (Tabela 3.2) totalizando 11 experimentos.

Tabela 3.2: Fatores para estudo em processo.

Variáveis	Código	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Agitação (rpm)	X ₁	100	129	200	270	300
Aeração (vvm)	X ₂	0,50	0,86	1,75	2,60	3,00

3.3.3 Desenvolvimento, validação e uso do *soft sensor*

Os dados gerados a partir do aparato experimental ao longo do tempo serviram para desenvolvimento do *soft sensor*. Com os mesmos, foi possível formar uma biblioteca de dados para o treinamento e para testar o modelo desenvolvido por modelagem com redes neurais artificiais (RNAs).

A topologia da rede neural foi desenvolvida por investigação em função dos melhores resultados alcançados em simulações de combinações de parâmetros. Os neurônios da camada de entrada devem corresponder aos valores lidos de concentração microbiana (CM) em absorvância, concentração de glicose (CG), tensão superficial (TS), tensão superficial 10x diluída (TS⁻¹), tensão superficial 100x diluída (TS⁻²) e oxigênio dissolvido (OD). A escolha destas variáveis para entrada da rede neural foi feita, porque o tempo de obtenção das respostas foi rápido ainda que fossem lidas fora

do fermentador. Na camada intermediária, a quantidade de neurônios deve ser definida com análise do erro do conjunto de treinamento e o fator de determinação (R^2). Para os parâmetros de erros avaliados, temos:

- Soma dos erros quadráticos (Sum of Square Error – SSE);
- Erro quadrado médio (Mean Square Error – MSE);
- Raiz do Erro quadrado médio (Root Mean Square Error – RMSE).

A camada de saída possuiu um neurônio, correspondente ao valor de concentração de biossurfactante. Toda a modelagem foi realizada usando-se o *toolbox* do MATLAB 7b.

A escolha do algoritmo de treinamento se deu com o propósito de evitar sobre ajuste dos dados, como, por exemplo, a utilização do Levenberg-Marquardt com regularização bayesiana (*trainbr*). Na camada intermediária (*logsig* ou *tansig*) e de saída (*purelin*) podem ser usadas algumas funções de ativação de acordo com o desempenho do modelo.

Para validação *offline*, os dados calculados foram comparados com os dados experimentais obtidos da medição da concentração de biossurfactante.

Para validação do *soft sensor* (validação *online*), os pesos e bias ajustados no treinamento das redes foram transferidos para uma planilha Excel e montada a base de cálculos. Assim que mensuradas as variáveis de entrada (por exemplo a cada 3 horas), a planilha calculará automaticamente o valor predito de saída, neste caso o valor da concentração do biossurfactante.

O procedimento de construção do modelo na planilha do Excel consistiu em programar as células segundo a topologia da rede neural. Desta forma, escreveu-se valores máximos e mínimos das variáveis (Var_{max} e Var_{min} respectivamente) dentro da faixa observada na biblioteca de dados. Em seguida fez-se cálculo de normalização entre -1 e +1 para harmonizar as escalas como apresentado na Equação 3.4.

$$P = 2 \frac{(Var - Var_{min})}{(Var_{max} - Var_{min})} \quad (3.4)$$

Programou-se células na planilha para cálculo da camada intermediária (L_1), recebendo o valor normalizado da variável. Então fez-se o somatório da multiplicação das variáveis pelo peso (IW_1) e acrescentou-se os bias (b_1), conforme Equação 3.5.

$$L_1 = [\sum P(IW_1)] + b_1 \quad (3.5)$$

Esta camada pode ser ativada pelas funções de ativação Logística (logsig):

$$a_1 = \frac{1}{1+e^{-ax}}, \text{ ou pela Tangente Hiperbólica (tansig): } a_1 = \frac{1-e^{-x}}{1+e^{-x}}.$$

Da mesma forma que procedeu-se para cálculo da camada intermediária (L_1) fez-se para camada de saída (L_2). Então fez-se o somatório da multiplicação dos valores correspondente a ativação pelo peso da camada de saída (IW_2) e acrescentou-se o bia da camada de saída (b_2), conforme Equação 3.6.

$$L_2 = [\sum a_1(LW_2)] + b_2 \quad (3.6)$$

Esta camada foi ativada pela função linear (purelin) fornecendo o valor predito da variável normalizada (a), Equação 3.7:

$$(purelin) * L_2 = a_2 \quad (3.7)$$

O último passo é desnormalizar a variável achando o valor real ($Y(CB)$), Equação 3.8:

$$Y(CB) = 0,5(a_2 + 1)(Var_{max} - Var_{min}) + Var_{min} \quad (3.8)$$

A Figura 3.3 ilustra todo esquema de cálculo topológico do modelo neural desenvolvido.

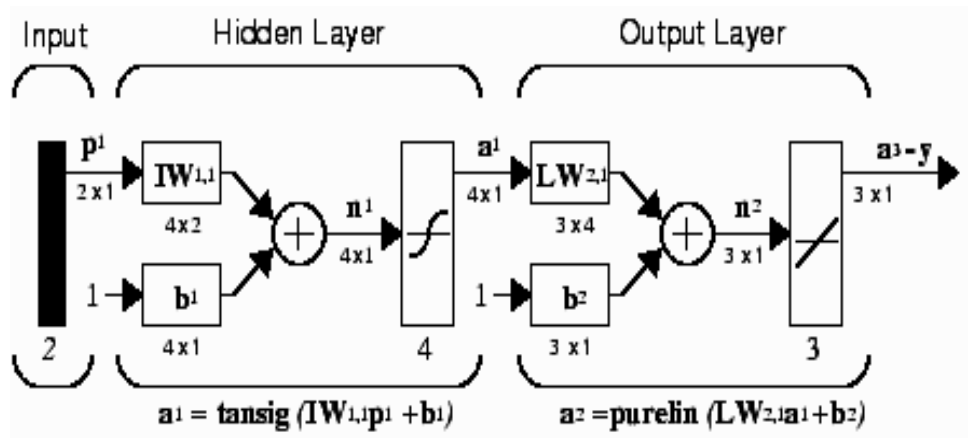


Figura 3.3: Esquema topológico da rede neural (toolbox MATLAB R2015a).

3.3.4 Testes de aplicação do biossurfactante produzido

Para os testes de aplicação, avaliou-se a capacidade do biossurfactante produzido em formar emulsão estável em 24h. Assim utilizou-se a metodologia do Índice de Emulsificação descrito no item 4.16 e testou-se a emulsão estável formada com: gasolina, óleo diesel, óleo de soja, heptano e hexano.

Fez-se também avaliação visual da dispersão de petróleo em água, simulando remediação de petróleo (ensaio baseado em Dye & Frydenborg, 1980). Assim quando o dispersante (biossurfactante) é incorporado ao sistema a tensão interfacial reduz, dispersando o petróleo. Para tanto, utilizou-se placa de petri contendo 20 mL de água destilada e sobre ela foi gotejado 40 μ L de petróleo, formando uma película escura. Em seguida gotejou-se a solução de biossurfactante produzido e o meio padrão sem ter sido fermentado.

3.3.5 Caracterização do meio de fermentação alternativo

Fez-se análise no meio de fermentação definido pelos experimentos de otimização (Glicerina e beterraba), quanto ao teor de sacarose, açúcares totais, cálcio, ferro, fósforo, manganês e proteínas (Tabela 4.22). O ensaio foi conduzido no Centro de Qualidade Analítica (CQA) segundo metodologias: AOAC (A.O.A.C.INTERNATIONAL, Official methods of analysis, 18th edition,

Maryland/USA: Current Through - Revision 3, 2010); FDA (FDA - Food And Drug Administration. Elemental Analysis Manual. United States of America. Section 4.4 Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometric Determination of Elements in Food Using Microwave Assisted Digestion. August 2010).

4. RESULTADOS

4.1 Seleção do meio de fermentação

A escolha dos substratos que compuseram o meio de fermentação foi algo voltado para o valor nutricional que cada um dos resíduos pudesse contribuir. A glicerina proveniente de biodiesel, que vem da reação com óleo de soja, pode servir como fonte de carbono (pequena cadeia carbônica) e micronutrientes (Ca, Mg, P e Na) (RIVALDI et al, 2007). A casca de beterraba também como fonte de carbono, fonte de micronutrientes (Fe, Ca e K) e fonte de proteínas (Monteiro, 2009). A água de maceração de milho como fonte de nitrogênio por possuir na maior parte da sua composição proteínas, neste resíduo também está presente lactose (pouco assimilável pelo microrganismo) (CANUTO, 2006).

A metodologia de delineamento composto central rotacional (DCCR) é amplamente utilizada por pesquisadores para investigar em faixas os melhores valores. No trabalho de Mutalik et al. (2008) foi definido um meio de fermentação para *Rhodococcus spp.* à base de manitol, extrato de carne, peptona e n-hexadecano, tendo como resposta a concentração do biossurfactante. Averiguou-se o R^2 de 0,94 pelo modelo validado na análise de variância (ANOVA). A resposta conseguida ao longo das fermentações variaram de 3,2 até 10,9 g/L e fez-se testes da redução da tensão superficial da água, atingindo valor de 30,8 mN/m.

Tendo em vista esse conhecimento, os experimentos nos Erlenmeyer com volume de 100 mL de meio alternativo foram realizados e as respostas avaliadas (Índice de Emulsificação- E_{24} e Concentração de Biossurfactante-CB) segundo as combinações da Tabela 4.1.

Os experimentos foram conduzidos ao mesmo tempo no agitador orbital, com as mesmas condições (37°C, 100 rpm) e retirados para análise após 96h (todos os experimentos foram feitos em duplicata). Contudo, pôde-se perceber que a única condição experimental a obter algum resultado foi o do ensaio de número 13 (Figura 4.1), com 55,53 % para E_{24} e 389 mg/L para CB, enquanto os demais foram zero.

Tabela 4.1: Combinação dos fatores (X_1 =Glicerina residual % v/v; X_2 =Resíduo de beterraba % v/v; X_3 =Água de maceração de milho % v/v).

Ensaio	X_1	X_2	X_3	$E_{24}(\% \text{ V/V})$	CB(mg/L)
1	2,0(-1)	1,2(-1)	1,0(-1)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
2	8,0(+1)	1,2(-1)	1,0(-1)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
3	2,0(-1)	5,4(+1)	1,0(-1)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
4	8,0(+1)	5,4(+1)	1,0(-1)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
5	2,0(-1)	1,2(-1)	4,0(+1)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
6	8,0(+1)	1,2(-1)	4,0(+1)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
7	2,0(-1)	5,4(+1)	4,0(+1)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
8	8,0(+1)	5,4(+1)	4,0(+1)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
9	0,0(-1,68)	3,5(0)	2,5(0)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
10	10,0(+1,68)	3,5(0)	2,5(0)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
11	5,0(0)	0,0(-1,68)	2,5(0)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
12	5,0(0)	7,0(+1,68)	2,5(0)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
13	5,0(0)	3,5(0)	0,0(-1,68)	55,53 \pm 0,9	389,0 \pm 50
14	5,0(0)	3,5(0)	5,0(+1,68)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
15	5,0(0)	3,5(0)	2,5(0)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
16	5,0(0)	3,5(0)	2,5(0)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
17	5,0(0)	3,5(0)	2,5(0)	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0

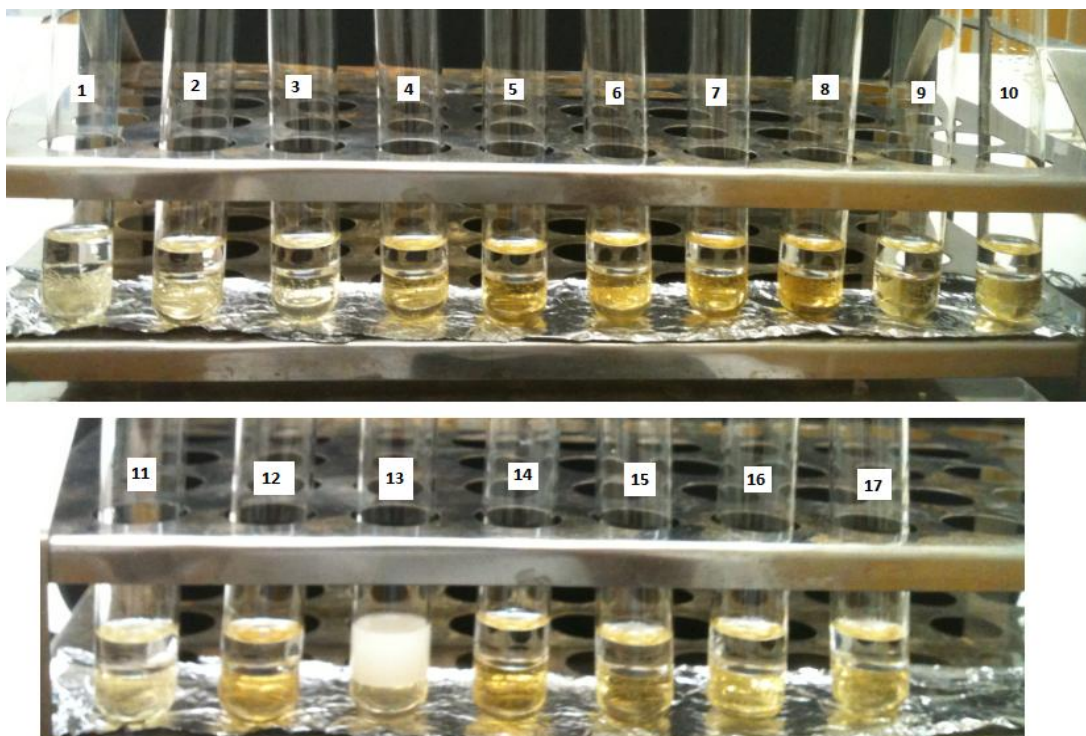


Figura 4.1: Índice de Emulsificação após realização de planejamento em Erlenmeyers $2^3 + 6$ pontos axiais e 3 pontos centrais .

Este experimento inicial serviu para entender a afinidade da cepa (*Bacillus subtilis*) com o meio proposto de fermentação. Não foi necessária análise dos efeitos gerados com os experimentos, pois apenas uma condição revelou resultado. Acredita-se que a influência da água de maceração de milho (variável X_3) afetou a cepa na produção de biossurfactante, devido ao experimento 13 ser o único a não conter este resíduo em sua composição. Esta condição que apresentou resultado, pode ter produção induzida por baixas concentrações da fonte de hidrogênio (DESAI & BANAT, 1997). Este fato foi imprescindível para retirada do resíduo do estudo e seguir o planejamento apenas com a glicerina residual e a casca de beterraba (X_1 e X_2).

Assim, prosseguiu-se com o experimento com as duas variáveis na mesma faixa de estudo, conforme Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Fatores para estudo das faixas de busca no processo.

Variáveis (% V/V)	Código	Níveis				
		-1,41	-1	0	+1	+1.41
Glicerina residual	X ₁	0,0	1,5	5,0	8,5	10,0
Resíduo de beterraba	X ₂	0,0	1,0	3,5	6,0	7,0

A matriz experimental foi montada (Tabela 4.3) e avaliada segundo resposta do software STATISTICA 7 a cada resultado obtido. Desta forma foi feito planejamento contendo 2^2 mais 4 pontos axiais e 3 pontos centrais, totalizando 11 experimentos com as mesmas condições do experimento anterior (37°C, 100 rpm por 96h).

Tabela 4.3: Combinação dos fatores (X_1 =Glicerina residual % v/v; X_2 =Resíduo de beterraba % v/v).

Ensaio	X_1	X_2	$E_{24}(\% \text{ V/V})$	CB(mg/L)
1	1,45(-1)	1,0(-1)	0,0±0,0	0,0±0,0
2	8,5(+1)	1,0(-1)	27,0±5,0	100,0±40,0
3	1,45(-1)	6,0(+1)	10,4±2,0	0,0±0,0
4	8,5(+1)	6,0(+1)	38,0±1,0	400,0±105,0
5	0,0(-1,41)	3,5(0)	0,0±0,0	0,0±0,0
6	10,0(+1,41)	3,5(0)	24,0±7,0	200,0±0,0
7	5,0(0)	0,0(-1,41)	0,0±0,0	0,0±0,0
8	5,0(0)	7,0(+1,41)	65,5±0,0	600,0±30,0
9	5,0(0)	3,5(0)	57,16±1,1	420,0±80,0
10	5,0(0)	3,5(0)	55,08±0,9	310,0±5,0
11	5,0(0)	3,5(0)	60,9±0,0	300,0±10,0

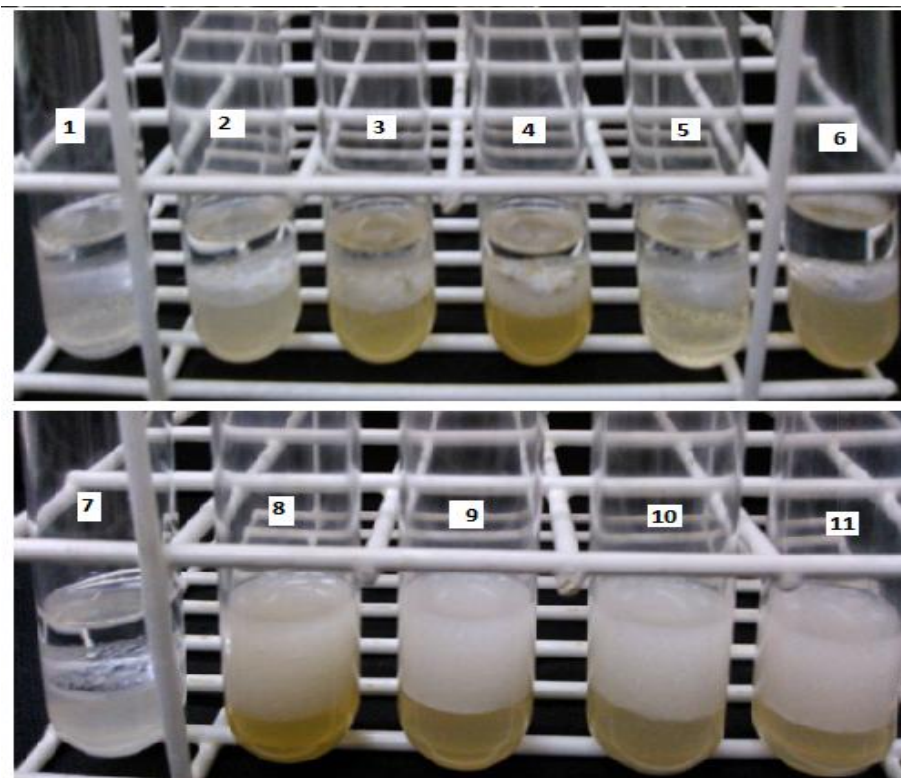


Figura 4.2: Índice de Emulsificação após realização de planejamento em Erlenmeyers $2^2 + 4$ pontos axiais e 3 pontos centrais.

O novo planejamento mostrou que na faixa estudada os resultados são expressivos, com índices de emulsificação (E_{24}) e concentração de biossurfactante (CB) bem diferentes do ensaio anterior, evidenciado também na Figura 4.2. É bom ressaltar os ensaios de número 5 e 7, onde nos experimentos apresentava apenas um dos resíduos (segundo a combinação do planejamento) e nenhum deles apresentou resultado maior que zero, tanto para índice de emulsificação quanto para concentração de biossurfactante. Este fato pode ter ocorrido porque: ou microrganismo pode ter consumido todo seu substrato e o mesmo não o favorecia sozinho na produção de biossurfactante; ou microrganismo pode ter consumido o substrato, produzido biossurfactante em menos de 96 horas (tempo amplamente reportado na literatura possível de produção de biossurfactante em frascos Erlenmeyers) e o consumiu para assimilar outros substratos no meio garantindo sua sobrevivência. Com isso, pode se perceber que para este estudo a produção é favorecida com os dois resíduos acima do fator mínimo de glicerina e casca de beterraba.

As análises destes experimentos montados na planilha de planejamento puderam ser acompanhadas por uma série de informações estatísticas. A Tabela 4.4 mostra os coeficientes de regressão para construção do modelo de E_{24} em função da sua significância com p -valores menores que 10 %, por se tratar de fermentação.

Tabela 4.4: Coeficientes de regressão para resposta E_{24} .

Fatores	Coef. Regressão	Erro Padrão	t(5)	p -valor
Média	57,70	3,59	16,05	<0,0001
$X_1(L)$	6,92	2,20	3,14	0,02
$X_1(Q)$	-23,53	2,62	-8,98	0,00
$X_2(L)$	17,88	2,28	8,12	0,00
$X_2(Q)$	-13,91	2,62	-5,31	0,00
$X_1 \times X_2$	0,16	3,11	0,05	0,96

Assim não foi significativo o termo de interação da variável glicerina residual com a concentração de biossurfactante ($X_1 \times X_2$), sendo incluído aos resíduos para cálculo da ANOVA (Tabela 4.6) e o modelo matemático ajustado ou reparametrizado foi caracterizado pela Equação (4.1).

$$E_{24}=57,70+6,92X_1-23,53X_1^2+17,88X_2-13,91X_2^2 \quad (4.1)$$

Foi possível analisar através da Tabela 4.5 os coeficientes de regressão para construção do modelo matemático da concentração de biossurfactante (CB) também com p -valores menores que 10%.

Tabela 4.5: Coeficientes de regressão para resposta concentração de biossurfactante (CB).

Fatores	Coef. Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor
Média	305,29	348,53	7,03	<0,0001
X ₁ (L)	72,85	29,72	2,45	0,05
X ₁ (Q)	-140,41	35,37	-3,96	0,01
X ₂ (L)	168,56	29,72	5,67	0,00
X ₂ (Q)	-40,41	35,37	-1,14	0,30
X ₁ x X ₂	75,00	42,03	1,78	0,13

A partir desta avaliação, entendeu-se que o termo CB quadrático (X₂) não foi significativo e, portanto, foi incluído aos resíduos para cálculo da ANOVA (Tabela 4.6). O termo de interação do índice de emulsificação e concentração de biossurfactante (X₁ x X₂) foi mantido no cálculo de regressão, porque o processo possui muitas variações inerentes às fermentações então manter p-valor um pouco acima do tolerado pode corresponder a essas variações. Assim, o modelo matemático ajustado ou reparametrizado foi caracterizado pela Equação (4.2).

$$CB=305,29+72,85X_1-140,41X_1^2+168,56X_2-75X_1X_2 \quad (4.2)$$

Os diagramas de Pareto mostram resultados da magnitude dos efeitos padronizados através das alturas das barras para os termos em estudo de ordem decrescente.

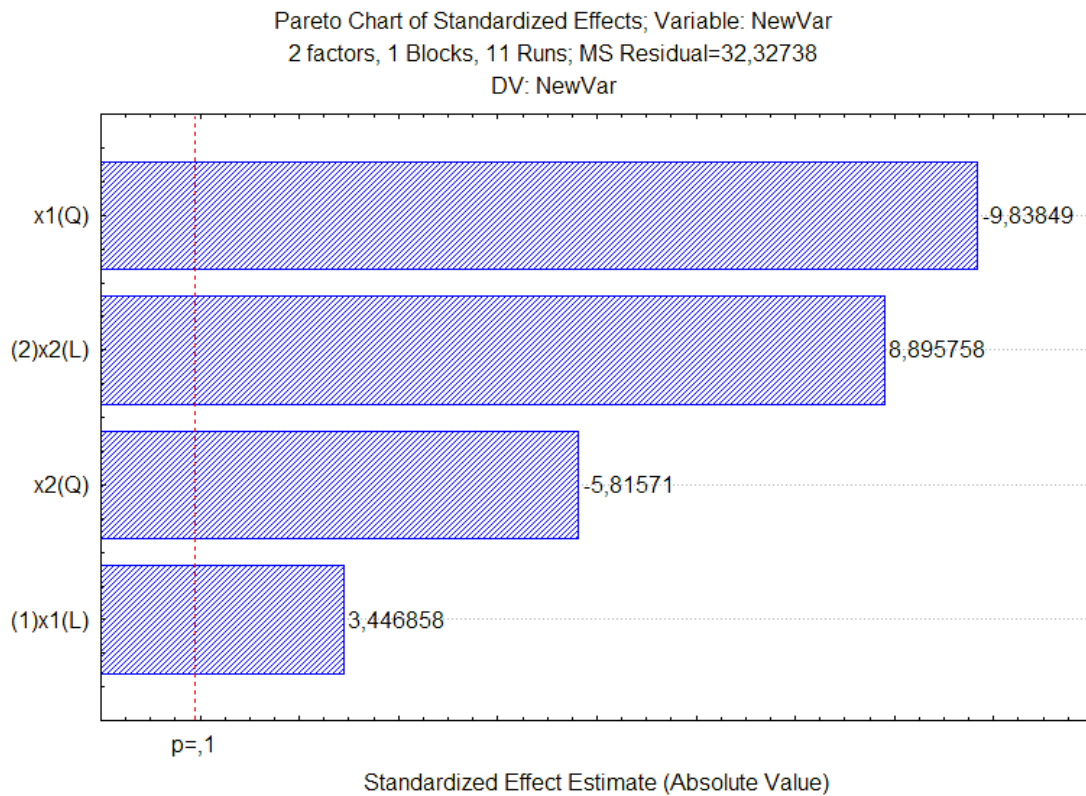


Figura 4.3: Diagrama de Pareto para Índice de Emulsificação (E_{24}).

A variável com maior efeito para o estudo da resposta E_{24} (Figura 4.3) é a glicerina residual quadrática (X_1^2), seguida pela casca de beterraba linear (X_2), casca de beterraba quadrática (X_2^2) e glicerina residual linear (X_1). Os valores das barras ultrapassam o $p=0,1$ (valor de $t_{\text{Tab}} = t_{(5;10\%)} = 2,92$) a partir do qual os efeitos são significativos por frequências das ocorrências.

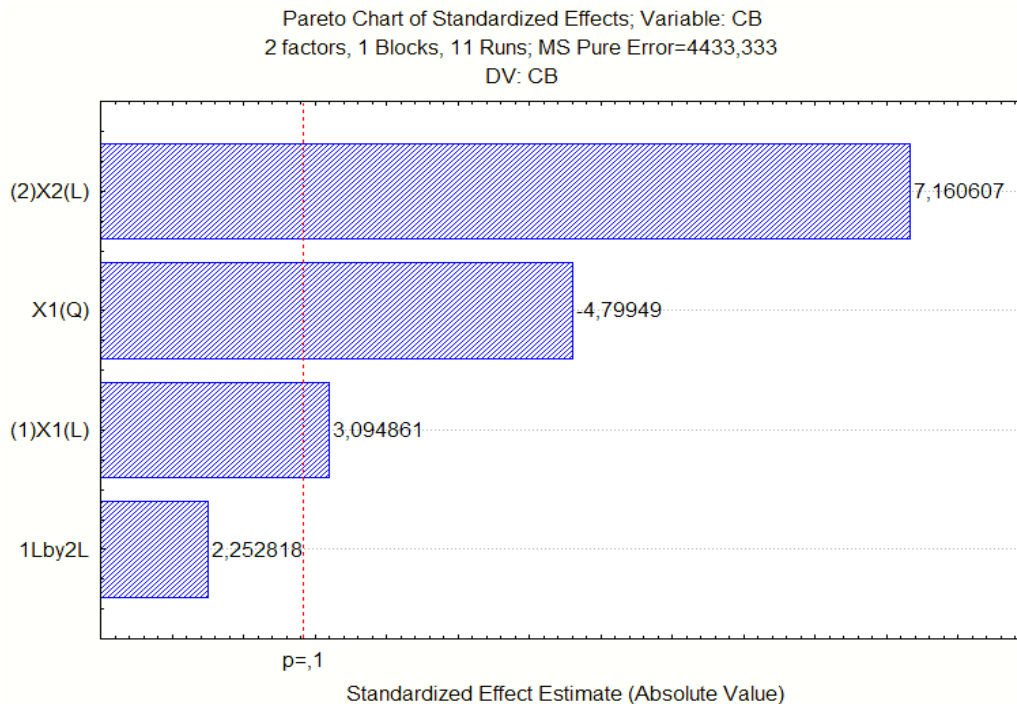


Figura 4.4: Diagrama de Pareto para Concentração de Biossurfactante (CB).

Já para a CB (Figura 4.4) tem-se casca de beterraba linear (X_2) como maior efeito, em seguida glicerina residual quadrática (X_1^2), glicerina residual linear (X_1) e por último a interação ente a glicerina residual e casca de beterraba ($X_1 \times X_2$). O $X_1 \times X_2$ não ultrapassa $p=0,1$ (valor de $t_{\text{Tab}} = t_{(5;10\%)} = 2,92$) com pequenas frequências de ocorrências, porém manteve-se essa variável com cálculos da regressão, pois o seu valor $p=0,13$ muito próximo do p estipulado no processo.

A análise de variância (ANOVA) foi construída para validar os modelos estatísticos desenvolvidos Equações 4.1 e 4.2, estudando a relação entre os coeficientes de regressão e os resíduos. O teste F para a regressão dos dois modelos foi significativo, já que o valor calculado (55,42 e 13,27) de cada um foi maior que o valor tabelado (3,18 para os dois) segundo grau de liberdade para regressão (4) e para os resíduos (6) nos pontos de porcentagem da distribuição F a 10%. O coeficiente de determinação explica variações em 97,04% do modelo de E_{24} e 89,84% do modelo CB. O teste F também dá ideia da magnitude dos erros do modelo entre a razão da falta de ajuste com o erro puro (valor calculado a partir do quadrado dos pontos centrais), assim esse valor de F_{cal} para falta de ajuste tem que ser menor o F_{tab} . Observou-se neste estudo que os valores do F_{cal}

(5,15 e 2,01) estão próximos dos valores do F_{tab} (3,18), o que reflete direto nos cálculos dos valores preditos do modelo.

Tabela 4.6: ANOVA para respostas E_{24} e CB.

Fonte de variação	Graus de Liberdade		Soma dos Quadrados		Quadrado Médio		F_{cal}	
	E_{24}	CB	E_{24}	CB	E_{24}	CB	E_{24}	CB
Regressão	4	4	7164,82	394401,7	1791,2	98600	55,42	13,27
Resíduos	6	6	193,95	44562	32,3	7427		
Falta de ajuste	4	4	176,75	35695,3	44,1	8923,8	5,15	2,01
Erro Puro	2	2	17,20	8866,7	8,6	4433,3		
Total	10	10	7358,77	438963,7				

E_{24} : $F_{4;6;0,10}=3,18$; Coeficiente de Correlação: $R^2=97,04$.

CB: $F_{4;6;0,10}=3,18$; Coeficiente de Correlação: $R^2=89,84$.

Foi possível gerar os gráficos de superfície (Figuras 4.5 e 4.7) de resposta e curva de contorno (Figuras 4.6 e 4.8) para identificar as condições ótimas descritas pelos modelos para índice de emulsificação (E_{24}) e concentração de biossurfactante (CB).

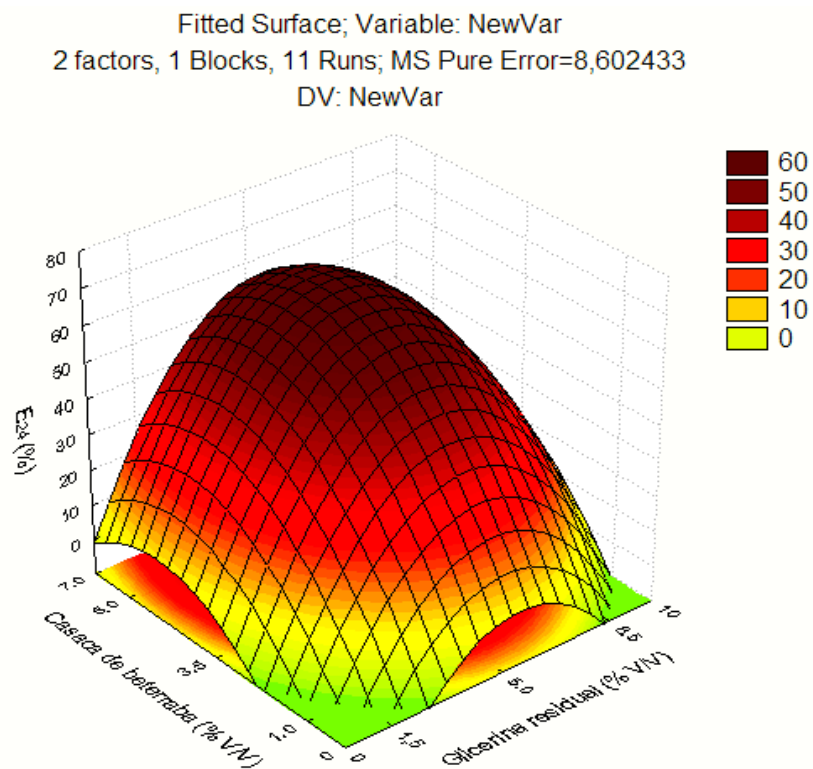


Figura 4.5: Superfície de resposta para o modelo índice de emulsificação (E_{24}).

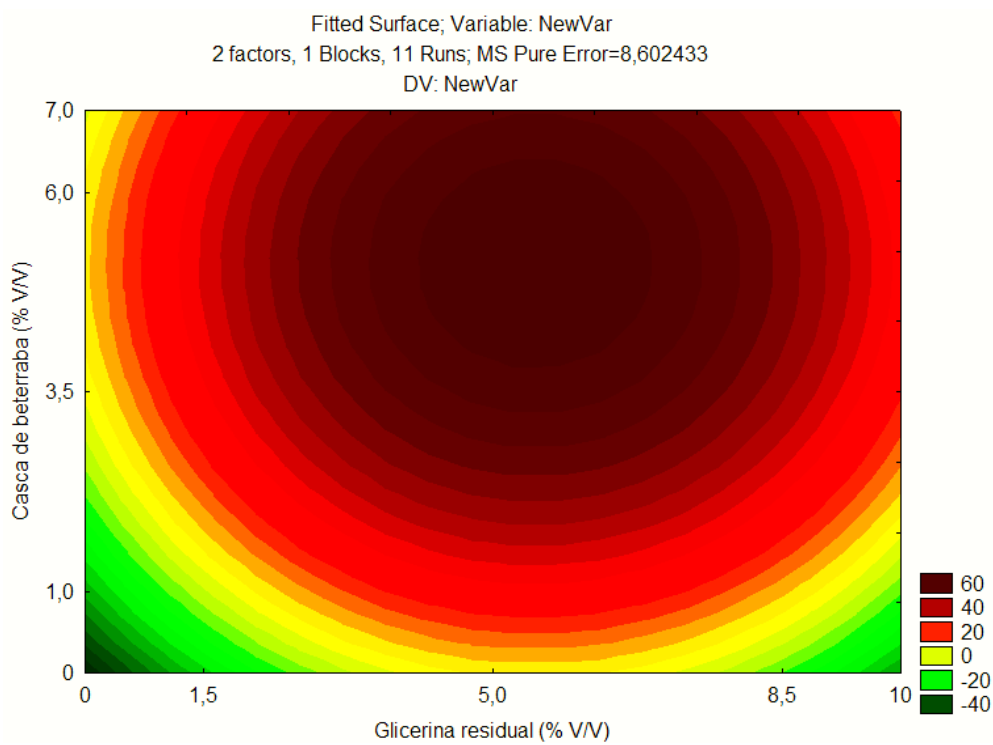


Figura 4.6: Curva de contorno para Índice de Emulsificação (E_{24}).

A interpretação dos gráficos de superfície de resposta e curva de contorno sugere que as melhores condições de trabalho são as mesmas, onde se atinge o maior valor de E_{24} usando em 3 a 7% para glicerina residual e de 3 a mais 7% para casca de beterraba, ou seja, uma faixa definida para glicerina residual e concentrações maiores do resíduo de beterraba do que foi definido no estudo.

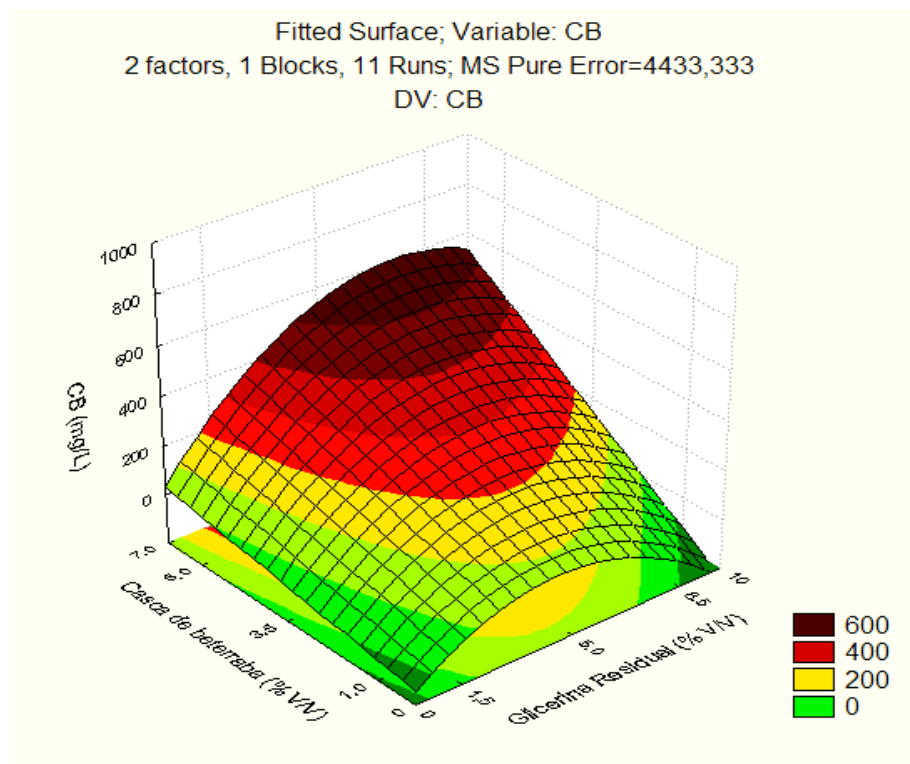


Figura 4.7: Superfície de resposta para concentração de biosurfactante (CB).

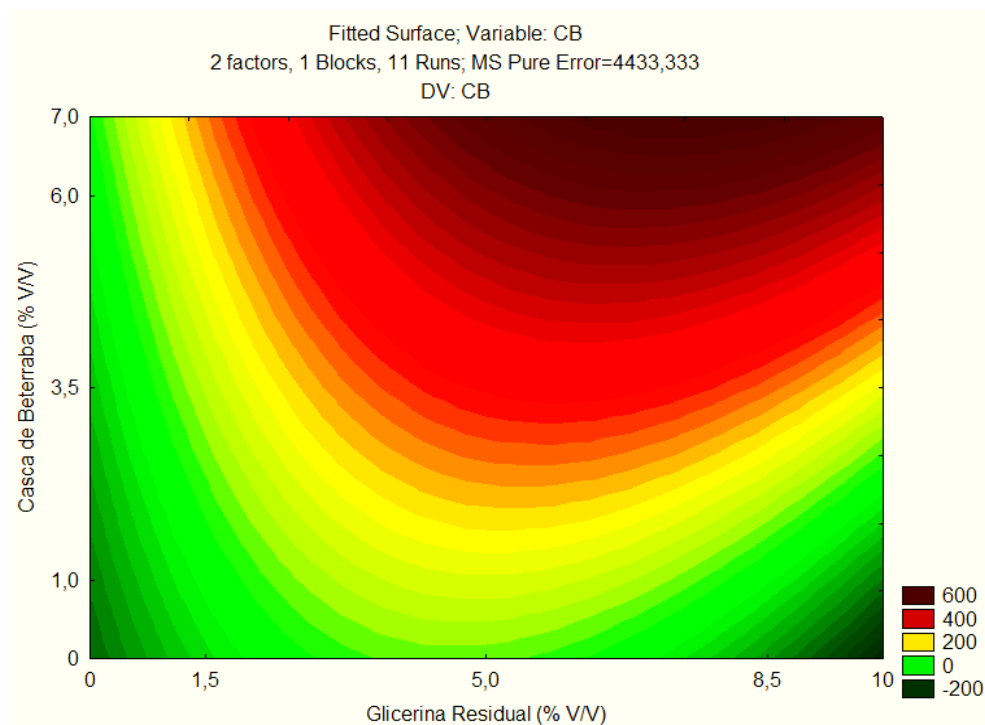


Figura 4.8: Curva de contorno para Concentração de Biosurfactante (CB).

A partir dos gráficos de superfície de resposta e curva de contorno do modelo da CB, as faixas ótimas são 4,8 a mais de 10 % para a glicerina residual e 6,2 a mais de 7%. Estas faixas são diferentes das faixas alcançadas com o modelo E₂₄, no entanto as faixas possuem convergência. A metodologia sugere continuação do estudo em faixas maiores de concentração de biosurfactante (CB), mas por uma questão operacional resolveu-se fixar as condições alcançadas e partir para experimentos em escala maior.

Com base nisto, traçou-se como pontos operacionais para validação dos valores em 6 % de glicerina residual e 7,5% de resíduo a base cascas de beterraba.

As Figuras 4.9 e 4.10 mostram os gráficos de dispersão que descrevem os valores observados experimentalmente e os valores previstos pelo modelo estatístico.

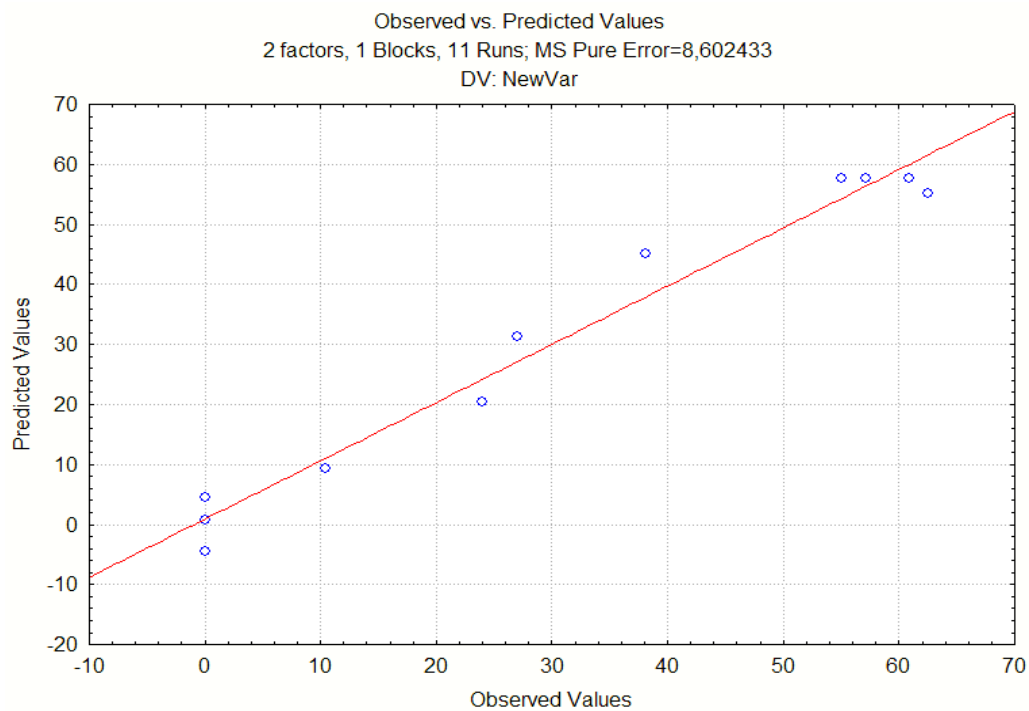


Figura 4.9: Dispersão para o modelo Índice de Emulsificação (E_{24}).

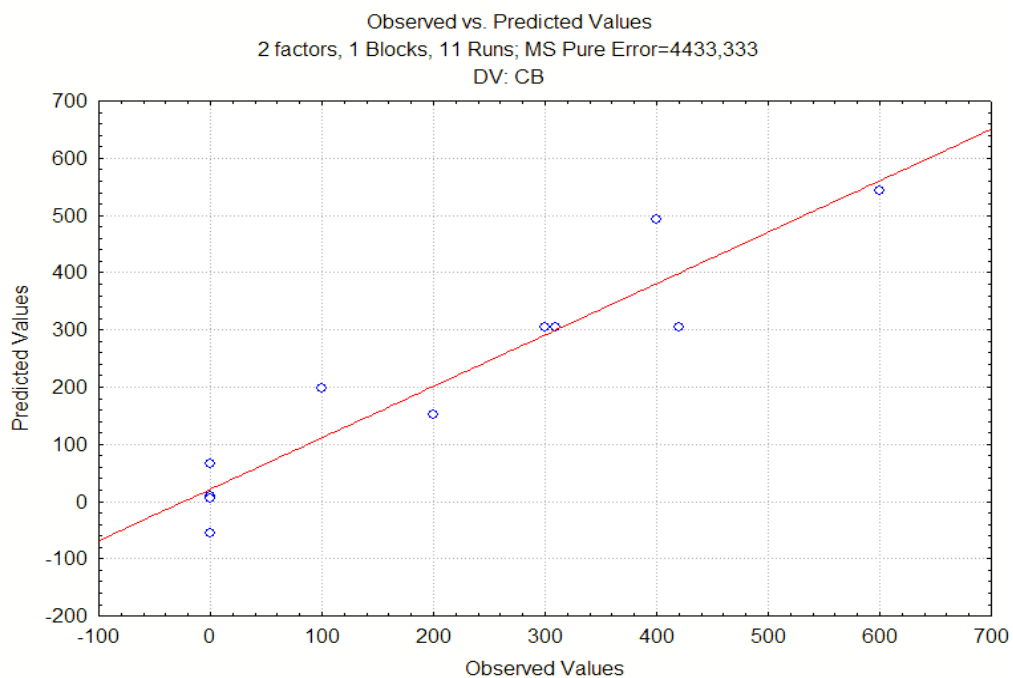


Figura 4.10: Dispersão para modelo de concentração de biossurfactante (CB).

Tais gráficos mostram as especificações sendo satisfeitas para os R^2 e resultados da ANOVA do modelo, com uma boa concordância.

A Tabela 4.7 apresenta os valores experimentais do Índice de Emulsificação (E24) e Concentração de Biossurfactante (CB), valores previstos pelos modelos codificados validados pela ANOVA e valores dos desvios (erros) para cada ensaio. Mesmo o modelo validado e analisado estatisticamente, obteve-se alguns valores de desvios altos, mas sem comprometer na área de interesse estudada.

Tabela 4.7: Valor do Índice de Emulsificação (E24) e Concentração de Biossurfactante (CB) experimental, os valores preditos pelos modelos e os desvios gerados.

Ensaio	E ₂₄ (Y)	Predito E24 (Ŷ)	Desvio	CB (Y)	Predito CB(Ŷ)	Desvio
1	0,0	-4,5	4,5	0,0	10,3	-10,3
2	27,0	31,2	-4,2	100,0	197,4	-97,4
3	10,4	9,2	1,1	0,0	6,0	-6,0
4	38,0	45,0	-6,9	400,0	493,1	-93,1
5	0,0	0,8	-0,8	0,0	-54,7	54,7
6	24,0	20,4	3,5	200,0	151,2	48,7
7	0,0	4,5	-4,5	0,0	66,9	-66,9
8	65,5	55,1	10,3	600,0	543,6	56,3
9	57,1	57,7	-0,5	420,0	305,2	114,7
10	55,0	57,7	-2,6	310,0	305,2	4,7
11	60,9	57,7	3,1	300,0	305,2	-5,2

A validação experimental da condição selecionada se deu com a formulação de dois ensaios com 6% de glicerina e 7,5% de casca de beterraba. O valor alcançado para

o Índice de Emulsificação (E_{24}) foi de $61,8 \pm 3,5 \%$ e para Concentração de Biossurfactante (CB) foi 576 ± 14 mg/L, valores dentro das faixas ótimas prevista pelo modelo.

Pereira et al. (2013) testou 3 cepas de *Bacillus subtilis*, oriundo de poços de petróleo no Brasil, para produção de biossurfactante em meios sintéticos, dentre eles a sacarose. Este estudo foi realizado em frasco Erlenmeyers de 100 mL em temperatura de 40°C por 120h. Em comparação com o atual estudo, os pesquisadores conseguiram chegar a valores de E_{24} de $35,3 \pm 17\%$, $29,8 \pm 2,3\%$ e $27,1 \pm 16 \%$ e CB de $325,1 \pm 12$ mg/L, $233 \pm 57,2$ mg/L e $725,9 \pm 114$ mg/L. Os valores de E_{24} obtidos pelos pesquisadores ficaram um pouco abaixo dos valores obtidos neste estudo. Isto pode ter acontecido devido à utilização de um solvente de cadeia molecular grande, o n-hexadecano, enquanto que no estudo foi utilizado tolueno. Este fato não inviabiliza a possibilidade de formar emulsões, mas com menor tempo de estabilidade. Para os valores de CB obtidos pelos pesquisadores, pode-se considerar muito próximo dos valores no estudo, dentro do erro experimental.

Com toda a avaliação feita a partir do planejamento experimental e devido aos dados da literatura, pode-se destacar os resíduos com potenciais para produção de biossurfactante nas condições estudadas.

4.2 Análise do substrato alternativo

As análises confirmam que o meio alternativo tem potencial nutritivo ao *Bacillus subtilis* (Tabela 4.8). A quantidade de sacarose foi a maior e representa a principal fonte de carbono. Por identificar a presença de ferro e fósforo, percebe-se que houve a constituição de cofatores enzimáticos, possibilitando o funcionamento de enzimas para o metabolismo do microrganismo (Faria, 2010).

Tabela 4.8: Análise do substrato alternativo (Glicerina residual + resíduo de beterraba).

Parâmetro	Valor (mg/100g)	Método
Sacarose	1323,8	AOAC
Cálcio	11,92	FDA
Ferro	25,05	FDA
Fósforo	9,41	FDA
Manganês	<LQ*	FDA
Proteínas	ND**	AOAC

Cada 100g corresponde à 94,5mL da amostra. <LQ*- menor que o limite de quantificação. ND** - Não Detectado.

4.3 Seleção das condições de fermentação

Ampliar escala de fermentação pode ser algo difícil, porque além de mudar o número de variáveis estudadas nos experimentos, mudam-se também as condições de operação. A respeito do estudo, que se iniciou em frascos Erlenmeyers com volume de 100 mL e posteriormente foi projetado no fermentador usando-se 4500 mL, não foi diferente. Fazendo uma breve comparação entre as condições dos experimentos, percebe-se, por exemplo, que as taxas de aeração e os tipos de agitação são completamente diferentes em fermentador e Erlenmeyers. Nos experimentos conduzidos em Erlenmeyers, o oxigênio disponível foi unicamente vindo do contato com o ar dentro do próprio frasco e a agitação foi feita pela rotação dos frascos presos no agitador. Nos experimentos conduzidos no fermentador o tipo de obtenção de oxigênio foi através do borbulhamento de ar comprimido e a agitação foi através de pás planas, em contato direto com meio de fermentação.

Antes de conduzir experimentos no fermentador, simulou-se uma situação 8 vezes a dimensão do que foi feito no Erlenmeyer, ou seja, 800 mL de meio alternativo à base de glicerina e casca de beterraba nas concentrações definidas previamente no item 5.1 (6% e 7,5% v/v respectivamente). Deste modo pôde-se avaliar em situação intermediária a do fermentador. Este experimento foi realizado no Kitassato de 1000

mL, onde se adaptou o sistema em uma chapa magnética aquecedora, possibilitando manter o experimento em uma temperatura de $\approx 37^{\circ}\text{C}$ e com agitador magnético no meio a 100 rpm. O Kitassato foi fechado com uma rolha de borracha, onde tinha um orifício que permitia borbulhar ar comprimido a 0,9 vvm no meio de fermentação (Figura 4.11). O sistema contou, também com um medidor de temperatura eletrônico e uma mangueira acoplada na saída lateral do Kitassato para recolhimento de espuma. Vale a pena ressaltar que todo o sistema foi esterilizado junto com o meio antes de começar o ensaio.



Figura 4.11: Sistema adaptado para fermentação em volume de 800 mL.

O sistema em funcionamento foi mantido por 96h, semelhante ao tempo dos experimentos nos frascos. Com isso, resolveu-se fazer coleta de amostra a cada 12h acompanhando a Concentração de Biossurfactante como mostrado na Figura 4.12.

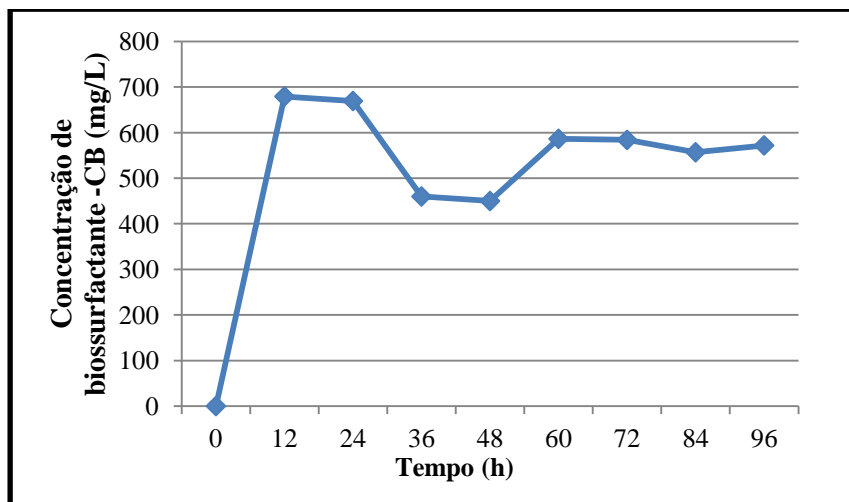


Figura 4.12: Concentração de biossurfactante para sistema adaptado de 800 mL.

O maior valor de concentração de biossurfactante foi para o tempo de 24h o que justificaria reduzir o tempo de fermentação para 24h ao invés de 96h como era antes. Partindo deste princípio, ficou evidente que existem diferenças entre os experimentos, principalmente no que diz respeito à obtenção do produto. As taxas de aeração e agitação proporcionadas pelo fermentador podem fazer com que a concentração de biossurfactante seja diferente da obtida no kitassato.

Para o fermentador, optou-se por estudar somente as variáveis agitação (X_1) e aeração (X_2) através do planejamento experimental 2^2 mais 4 pontos axiais e 3 pontos centrais com a construção da matriz (Tabela 4.9) no software STATISTICA, onde as variáveis dependentes são a Concentração de Biossurfactante (CB) e a Redução da Tensão Superficial (TS), o quanto a tensão reduziu desde o começo do experimento até aquele ponto. O tempo de fermentação na batelada foi fixado em 24h e foram coletadas amostras a cada 3 horas. Os valores correspondentes as resposta estão expressos no tempo de 9h (escolha que será explicada no item 4.4, porque neste tempo o valor da concentração de biossurfactante foi máximo em 24 h) através da combinação dos fatores apresentados na tabela 4.9.

Tabela 4.9: Combinação dos fatores (X_1 =Agitação rpm e X_2 =Aeração vvm) dos ensaios no fermentador em 9 horas.

Ensaio	X_1	X_2	CB(mg/L)	RT (% mN/m)
1	129(-1)	0,86(-1)	855,3±92,0	31,9±5,0
2	270(+1)	0,86(-1)	850,6±6,0	37,7±0,0
3	129(-1)	2,6(+1)	800,2±30,0	37,7±0,0
4	270(+1)	2,6(+1)	792,9±70,0	34,8±3,0
5	100(-1,41)	1,75(0)	550,5±80,0	35,5±2,0
6	300(+1,41)	1,75(0)	203,2±10,0	8,3±0,5
7	200(0)	0,5(-1,41)	1931,2±52,0	46,4±1,5
8	200(0)	3,0(+1,41)	920,6±104,0	40,8±0,0
9	200(0)	1,75(0)	1041,6±8,0	42,6±0,5
10	200(0)	1,75(0)	1028,7±33,0	40,0±0,9
11	200(0)	1,75(0)	1032,8±38,0	41,8±0,0

Os experimentos mostraram que dentro das faixas estudadas pode-se atingir valores muito distintos de concentração de biossurfactante (CB) em um tempo de 9h. Merece destaque o valor de 1931,25 mg/L da CB e 46% de redução da tensão para o ensaio 7 e os valores dos experimentos nos pontos centrais (ultrapassaram 1000 mg/L). Tabela 4.10 mostra os valores de tensão superficial do começo da fermentação e a atingida com as concentrações da Tabela 4.9 para expressar os valores de redução da tensão.

Tabela 4.10: Tensão superficial inicial e após 9h (mN/m).

Ensaio	TS _{inicial}	TS-9h
1	47,64	32,42
2	53,15	33,05
3	54,12	33,62
4	52,00	33,90
5	55,01	35,47
6	54,10	49,50
7	53,00	28,37
8	54,00	31,92
9	53,40	30,40
10	52,20	31,15
11	53,23	30,82

A análise das variáveis começou com a construção da Tabela 4.11 dos coeficientes de regressão e dos p -valores do modelo para CB em função da sua significância com valores menores que 10 %, como tratado nos primeiros planejamentos.

Tabela 4.11: Coeficiente de regressão para CB, X_1 =agitação e X_2 =aeração.

Fatores	Coef. Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor
Média	1034,41	136,80	7,56	<0,0001
X_1 (L)	-75,47	83,77	-0,90	0,40
X_1 (Q)	-347,93	99,71	-3,48	0,01
X_2 (L)	-180,15	83,77	-2,15	0,08
X_2 (Q)	176,61	99,77	1,77	0,13
$X_1 \times X_2$	-0,64	118,47	-0,00	0,99

As análises apontam que o termo agitação linear (X_1) e o termo de interação ente a agitação e aeração ($X_1 \times X_2$) não seriam significativos (p-valores maiores que 10%) e por isso foram incluídos nos cálculos dos resíduos. Embora o termo aeração quadrática (X_2^2) esteja fora do tipo de análise (p-valor maior que 10%) ele foi incluído nos cálculos de regressão, pois o valor está muito próximo e por se tratar de um experimento inerente a muitas variações, tais quais são os bioprocessos. O modelo CB com os termos de regressão foi descrito pela Equação 4.3.

$$CB=1034,41-347,93X_1^2-108,15X_2+176,61X_2^2 \quad (4.3)$$

Foi possível, também, analisar a resposta redução da tensão superficial (RT) através da Tabela 4.12 com os coeficientes de regressão para construção do seu modelo matemático e com p-valores menores que 10%.

Para a construção do modelo de redução da tensão superficial (RT) o termo aeração linear (X_1), aeração quadrática (X_2^2) e interação agitação e aeração ($X_1 \times X_2$) não se apresentaram significativos, por isso foram inclusos nos cálculos dos resíduos. O modelo reparametrizado está esquematizado na Equação 4.4.

$$RT=41,32-4,44X_1-9,01X_1^2 \quad (4.4)$$

Os diagramas de Pareto, que relacionam os efeitos de cada resposta com a variação da agitação (X_1) e aeração (X_2), podem ser vistos nas Figuras 4.13 e 4.14.

Tabela 4.12: Coeficiente de regressão para redução da tensão superficial.

Fatores	Coef. Regressão	Erro Padrão	t(5)	p-valor
Média	41,32	4,04	10,22	<0,0001
X ₁ (L)	-4,44	2,47	-1,79	0,13
X ₁ (Q)	-9,01	2,94	-3,06	0,02
X ₂ (L)	-0,63	2,47	-0,25	0,80
X ₂ (Q)	1,86	2,94	0,633	0,55
X ₁ x X ₂	-2,17	3,49	-0,62	0,56

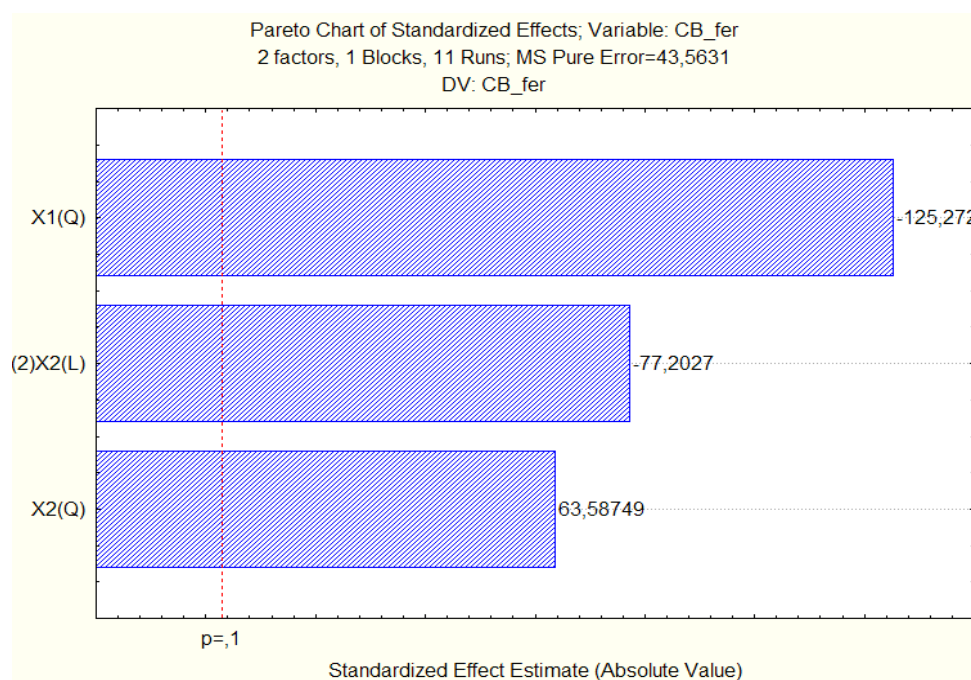


Figura 4.13: Diagrama de Pareto para concentração de biossurfactante (CB) em 4500 mL.

A variável com maior efeito para o estudo da resposta de concentração de biossurfactante (CB) (Figura 4.13) é a agitação quadrática (X_1^2), seguida pela aeração linear (X_2) e aeração quadrática (X_2^2). Os valores das barras ultrapassam o $p=0,1$ a partir do qual os efeitos são significativos por frequências das ocorrências e estes

valores estão muito distantes do valor tabelado (valor de $t_{\text{Tab}} = t_{(5;10\%)} = 2,92$), mostrando qual destas variáveis influenciam mais no modelo.

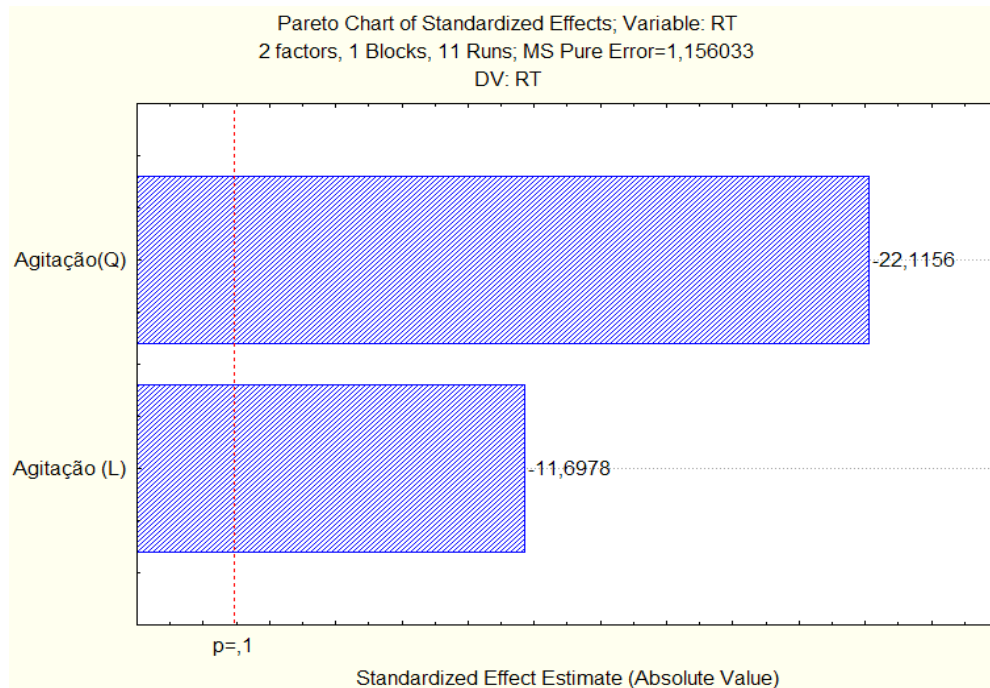


Figura 4.14: Diagrama de Pareto para redução da tensão (RT) de 4500 mL.

A variável com maior efeito para o estudo da resposta RT (Figura 4.14) é a agitação quadrática (X_1^2) e a agitação linear (X_2). Os valores das barras ultrapassam o $p=0,1$ (valor de $t_{\text{Tab}} = t_{(5;10\%)} = 2,92$) a partir do qual os efeitos são significativos pela magnitude dos valores que mais influenciam no modelo.

Uma análise de variância (ANOVA) foi construída com a finalidade de validar o modelo matemático desenvolvido estudando a relação entre os coeficientes de regressão e os resíduos, na Tabela 4.13. O teste F para a regressão dos dois modelos foi significativo, já que o valor calculado (8,0 e 10,1) de cada um dos modelos foi maior que o valor tabelado (3,07 e 3,11) segundo os graus de liberdade para regressão (3 para CB e 2 para RT) e para os resíduos (7 para CB e 8 para RT) nos pontos de porcentagem da distribuição F a 10%. O coeficiente de determinação explica variações em 83,96% do modelo de CB e 75,75% do modelo RT. Estes coeficientes de determinação foram considerados razoáveis (em comparação com os alcançados na fermentação nos frascos Erlenmeyer de 97,04% para modelo de E_{24} e 89,84% para modelo CB), porém

conseguem ser validados dado o tipo do processo. Nesta parte do estudo fica evidente a magnitude dos erros, pois os valores F_{cal} da falta de ajuste (1499,9 e 41,21) são muito altos em relação aos valores de F_{tab} (3,07 e 3,11) indicando que os modelo trazem consigo erros muito altos, confirmados quando confrontados os dados observados com os dados calculados pelos modelos.

Tabela 4.13: ANOVA para CB e RT no fermentador.

Fonte de variação	Graus de Liberdade		Soma dos Quadrados		Quadrado Médio		F_{cal}	
	CB	RT	CB	RT	CB	RT	CB	RT
Regressão	3	2	1119427	723,6	373142,33	361,8	8,0	10,10
Resíduos	7	8	326327	286,74	46618,14	35,8		
Falta de ajuste	5	6	326240	284,43	65248	47,40	1499,9	41,21
Erro Puro	2	2	87	2,31	43,5	1,15		
Total	10	10	1445754					

CB: $F_{3;7;0,10}=3,07$; Coeficiente de Correlação: $R^2=83,96$.

RT: $F_{2;8;0,10}=3,11$; Coeficiente de Correlação: $R^2=75,75$.

Depois da validação do modelo pela ANOVA, foi possível gerar os gráficos de superfície de resposta (Figura 4.15 e 4.17) e curva de contorno (Figura 4.16 e 4.18) para identificar as condições ótimas descritas pelo modelo.

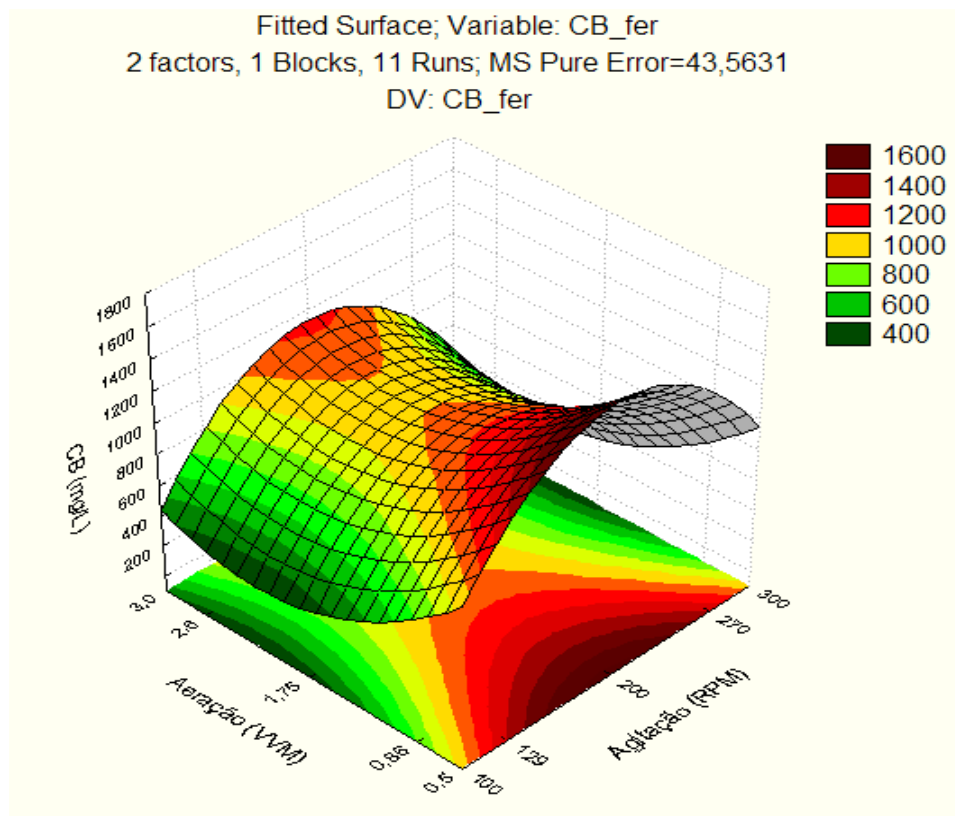


Figura 4.15: Superfície de resposta para modelo estatístico para concentração de biosurfactante (CB) em 4500 mL.

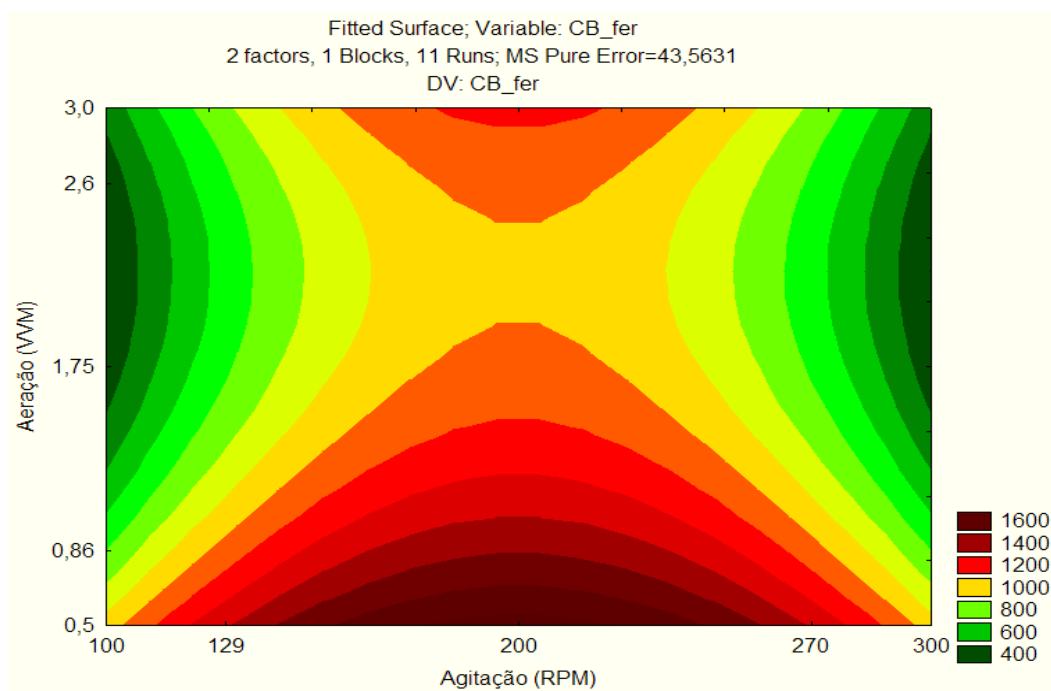


Figura 4.16: Curva de contorno do modelo estatístico para concentração de biosurfactante (CB) em 4500 mL.

Com os gráficos de superfície de resposta e curva de contorno percebeu-se que as melhores condições de trabalho (levando em conta a concentração de biossurfactante) estão entre 130 e 230 rpm de agitação e valores menores de 0,5 até 0,7 vvm de aeração para se atingir uma condição de mais de 1400 mg/L de CB.

Os gráficos de superfície de resposta e curva de contorno do modelo da redução da tensão superficial (RT) mostraram que as faixas ótimas são 140 a 230 rpm para a agitação e sem uma faixa definida para a aeração a fim de alcançar um valor acima de 40 % de redução da tensão superficial (RT). Estas faixas ótimas definidas mostram a dificuldade de se trabalhar com bioprocessos pela grande variação que a fermentação pode apresentar, reflexo da resposta na matriz inicial do planejamento. Pode-se traçar como pontos operacionais para validação no ponto ótimo os valores em 200 rpm de agitação e 0,5 vvm de aeração.

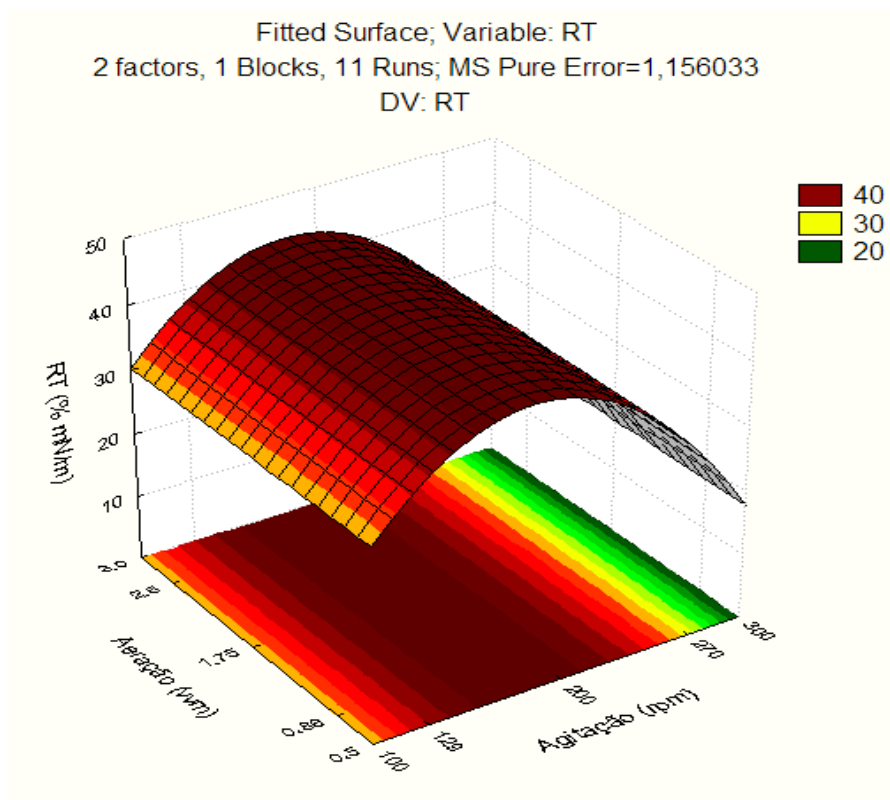


Figura 4.17: Superfície de resposta do modelo estatístico para redução da tensão superficial (RT) em 4500 mL.

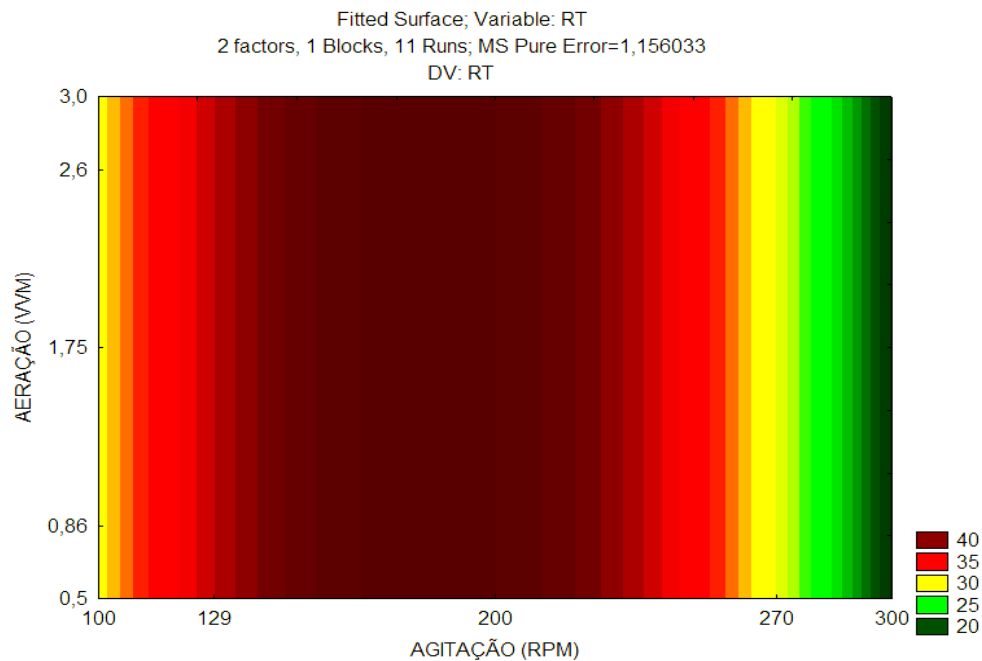


Figura 4.18: Curva de contorno do modelo estatístico para redução da tensão superficial (RT) em 4500 mL.

Nas Figuras 4.19 e 4.20 mostram os gráficos de dispersão que descrevem os valores observados experimentalmente e os valores previstos pelo modelo.

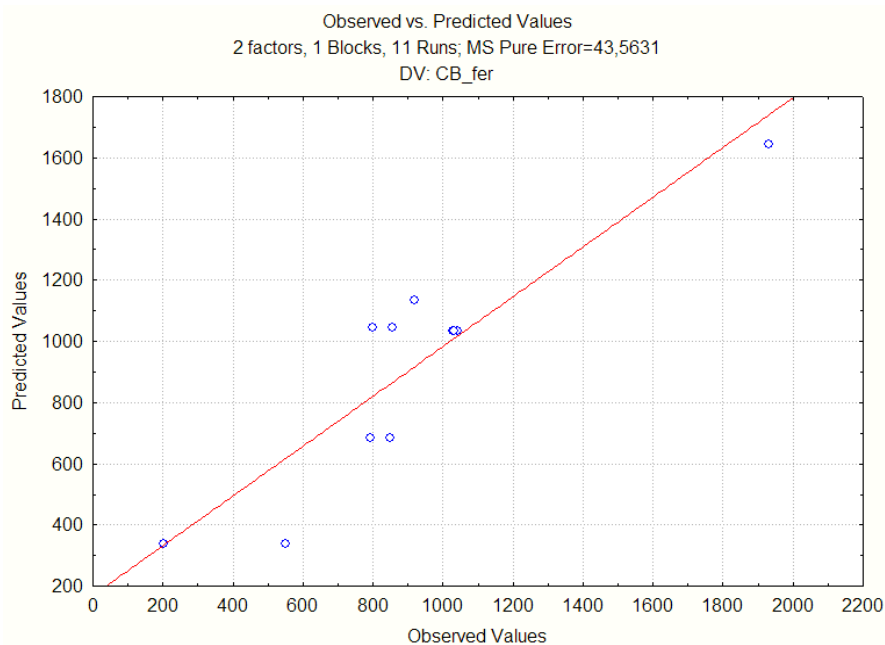


Figura 4.19: Dispersão para modelo concentração de biossurfactante (CB).

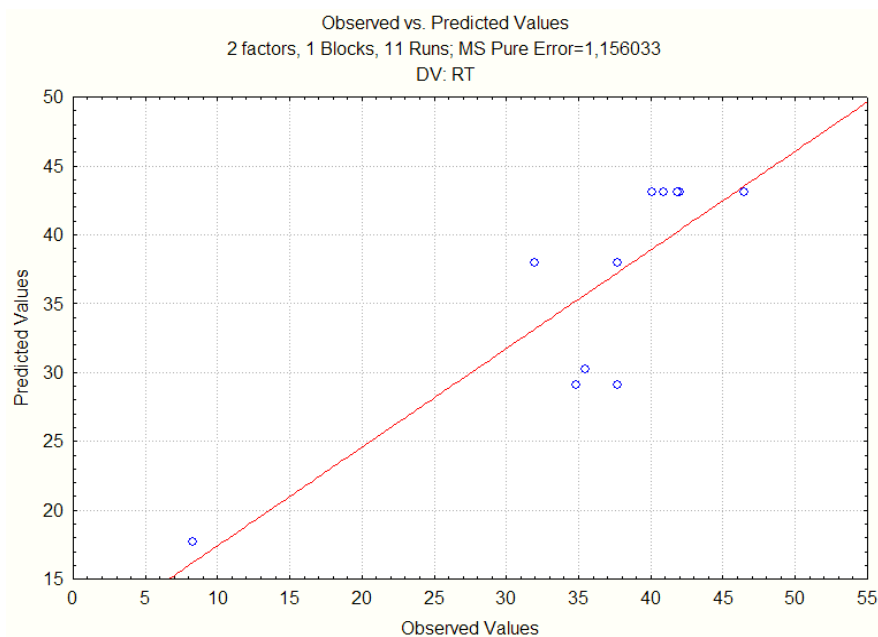


Figura 4.20: Dispersão para modelo da redução da tensão superficial (RT).

Os gráficos de dispersão mostram pouca concordância entre os pontos experimentais e os preditos pelos modelos estatísticos, mesmo sendo validado pela ANOVA, mas justificado pelo valor do R^2 .

Na Tabela 4.14 são apresentados os valores experimentais da Concentração de Biossurfactante (CB) e da Redução da Tensão Superficial (RT), valores previstos pelos modelos codificados e validados pela ANOVA e valores dos desvios (erros) para cada ensaio.

Tabela 4.14: Valor da Concentração de Biossurfactante em mg/L (CB) e Redução da tensão superficial em mN/m (RT) experimental, os valores preditos pelos modelos e os desvios gerados.

Ensaio	CB (Y)	Predito CB (\hat{Y})	Desvio	RT (Y)	Predito RT(\hat{Y})	Desvio
1	855,35	1043,23	-187,87	31,96	37,96	-6,0
2	850,65	682,92	167,72	37,73	37,96	-0,23
3	800,20	1043,23	-243,05	37,74	29,07	8,66
4	792,90	682,92	109,97	34,80	29,07	5,72
5	550,40	338,53	211,86	35,50	30,24	5,25
6	203,28	338,53	-135,25	8,33	17,66	-9,33
7	1931,25	1642,41	288,83	46,47	43,08	3,38
8	920,63	1132,85	-212,22	40,88	43,08	-2,20
9	1041,66	1034,41	7,25	42,64	43,08	-1,04
10	1028,75	1034,41	-5,66	40,09	43,08	-2,99
11	1032,82	1034,41	-1,60	41,85	43,08	-1,23

Observa-se através dos valores dos desvios o quanto o modelo codificado pode prever as respostas nos ensaios, embora na condição escolhida como ótima à predição tenha um desvio de 288,83 para a CB e apenas 3,38 para RT isto não os invalida, porque está dentro do erro estudado na ANOVA. A falta de ajuste fica muito característico nos muitos pontos discrepantes de predição, o que leva a concluir que os modelos podem ser usados apenas para direcionamento das variáveis (através da grandeza), mas não como um bom preditor (comportamento esperado pela ANOVA). Mesmo assim, fez-se a validação com os pontos operacionais escolhidos e obteve-se para a CB foi de $1780,60 \pm 80,50$ mg/L e para RT foi de $45,03 \pm 4,80$ %, de acordo como previsto na otimização.

O fato de otimizar variáveis de operação fez, por exemplo, com que a concentração de biossurfactante (CB) aumentasse mais de 3 vezes em relação aos experimentos realizados nos frascos Erlenmeyer. Precisar-se-ia dar sequência a outras faixas direcionadas pelos gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno, mas isso seria objetivo para um novo estudo.

4.4 Desenvolvimento microbiano no fermentador

Os experimentos conduzidos no fermentador a 4500 mL de fermentado (referentes ao planejamento experimental apresentado na Tabela 4.9) foram analisados em um tempo de batelada de 24h e a cada 3 horas amostras foram coletadas, com exceção dos ensaios 1, 6 e 11 que as tomadas de amostra foram nos tempos 0, 9, 18, 24h. Vale a pena ressaltar que foram feitas duas fermentações para cada ensaio e as amostras lidas em duplicata. Outro ponto que é conveniente salientar é sobre a temperatura, pois em todos os ensaios a temperatura do fermentador foi mantida em 37°C. As Figuras 4.21 a 4.27 mostram o comportamento do *Bacillus subtilis* nas condições do ensaio do planejamento (estudo da agitação e aeração). As variáveis observadas foram: crescimento microbiano (CM), concentração de glicose (CG), concentração de biossurfactante (CB), oxigênio dissolvido (OD), tensão superficial (TS), tensão superficial 10x diluída (TS^{-1}) e tensão superficial 100x diluída (TS^{-2}). Estes perfis foram necessários para o entendimento da construção da biblioteca de dados no modelo neural (item 4.5.1) e compreensão da utilização dos experimentos no tempo de 9h no planejamento experimental.

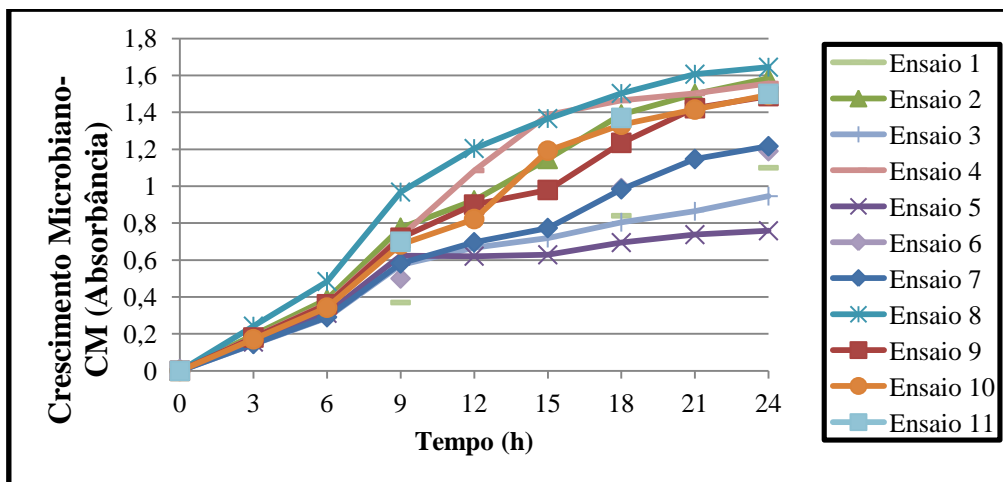


Figura 4.21: Crescimento do microrganismo em 24h.

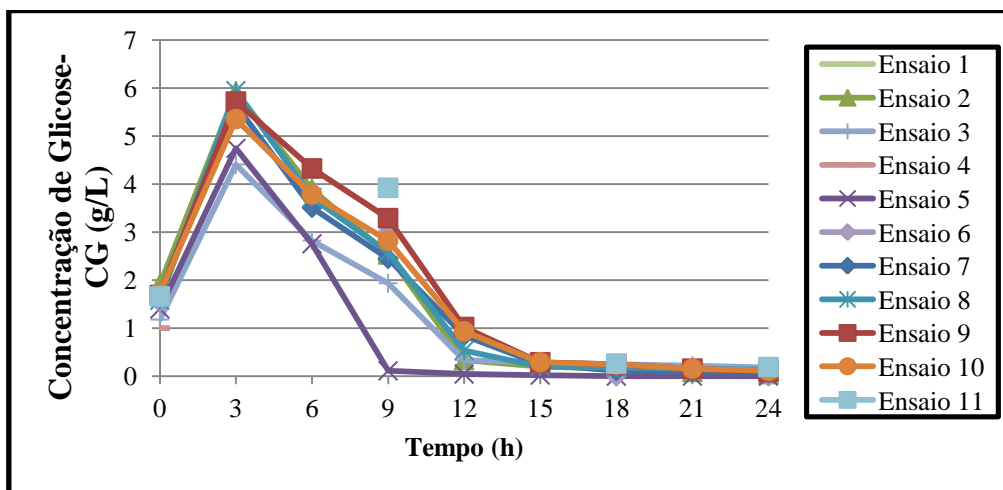


Figura 4.22: Perfil de Concentração de glicose em 24h para os 11 ensaios.

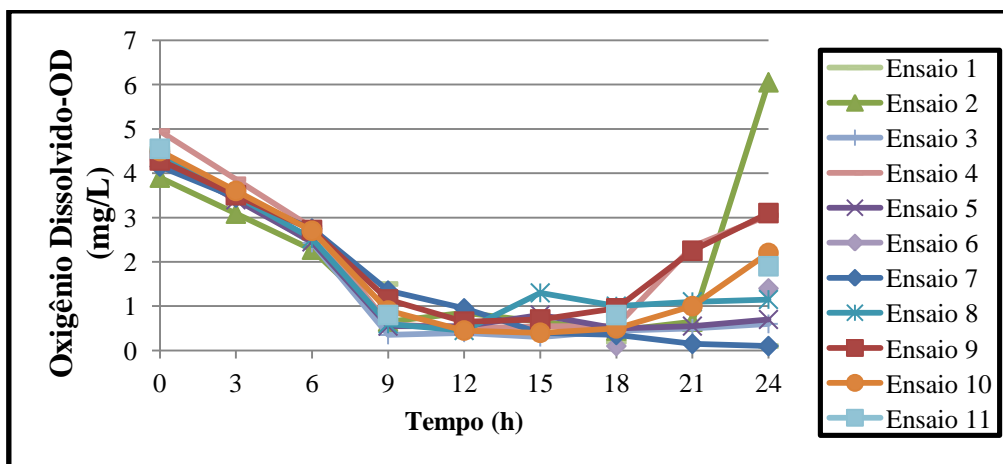


Figura 4.23: Perfil de Oxigênio dissolvido em 24h para os 11 ensaios.

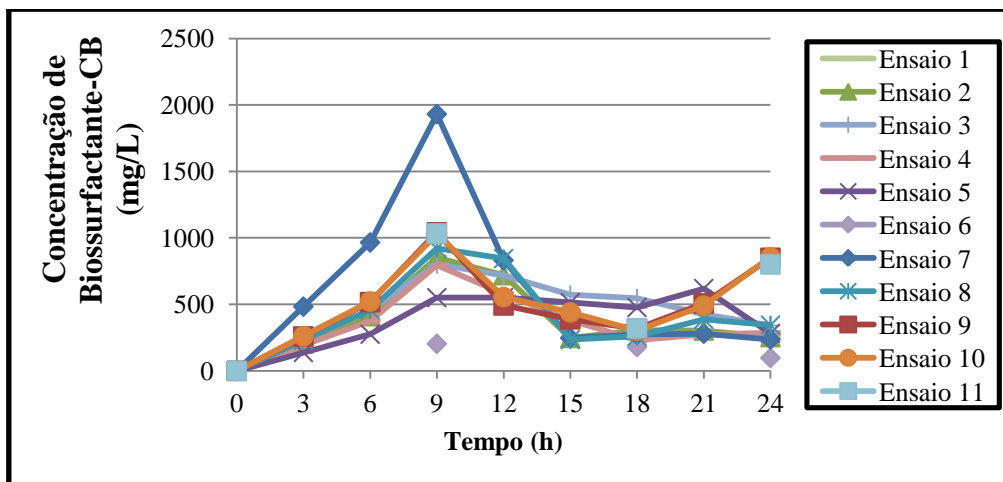


Figura 4.24: Perfil de Concentração de biossurfactante em 24h para os 11 ensaios.

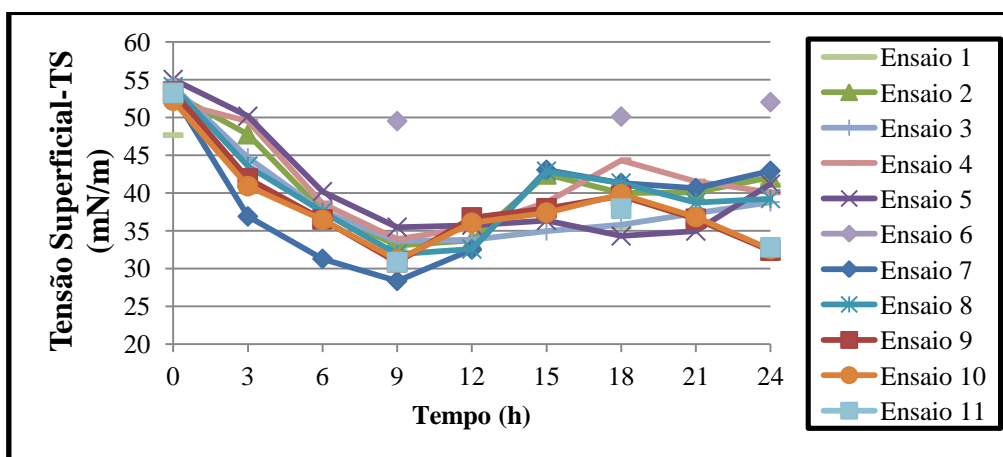


Figura 4.25: Perfil da Tensão superficial em 24h para os 11 ensaios.

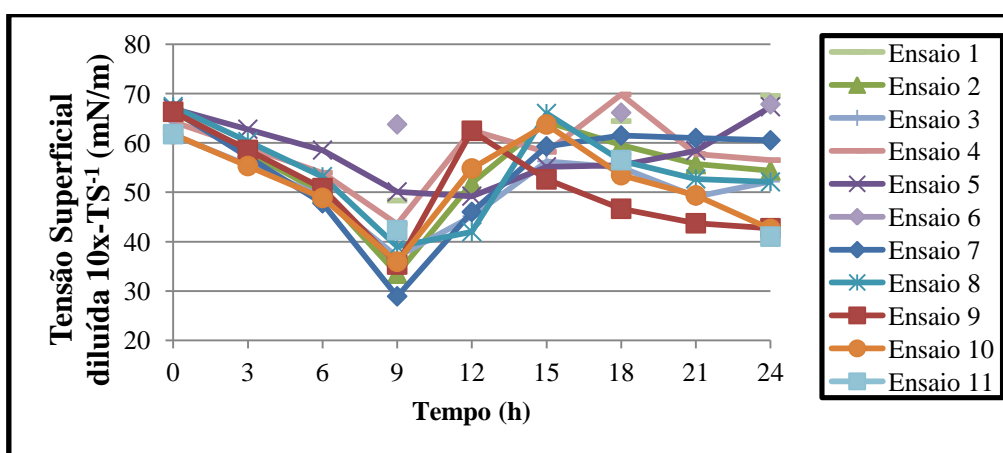


Figura 4.26: Perfil de Tensão Superficial diluída 10x em 24h para os 11 ensaios.

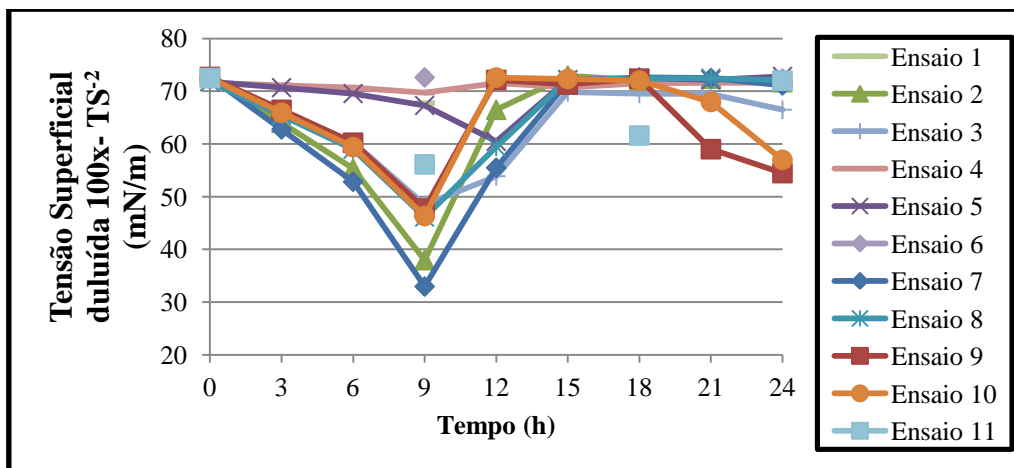


Figura 4.27: Perfil de Tensão Superficial 100x diluída em 24h para os 11 ensaios.

O crescimento microbiano analisado pela absorbância (Figura 4.21) do meio de fermentação ao longo do tempo evidencia que em todos os ensaios o *Bacillus subtilis* se desenvolveu. A condição que mais apresentou crescimento foi a do ensaio 8 (agitação de 200 rpm e aeração de 3,0 vvm), provavelmente permitiu ao meio maior concentração de oxigênio (Figura 4.23) durante a fermentação, condição que a maior parte da batelada ficou acima de 1 mg/L de oxigênio dissolvido. O ensaio 5 apresentou o menor crescimento, pois além de trabalhar no menor nível de da agitação (100 rpm), também trabalhou em um de aeração não tão alto (1,75 vvm). Carvalho et al. (2010) pesquisaram o crescimento de *Bacillus subtilis* em meio de cultivo (tendo glicose como fonte de carbono) aerado e não aerado. O crescimento celular se deu 3,5 mais rápido nos experimentos aerados, por volta de 14h da batelada.

Pelos perfis de concentração de glicose (Figura 4.22), pode-se perceber que para todos os ensaios o consumo aconteceu em 15h. Acredita-se que o consumo de substrato pelo microrganismo foi rápido devido à disponibilidade de oxigênio no meio que outrora não havia. Outra particularidade observada é que nas 3 primeiras horas há um pico de glicose, isso aconteceu porque o açúcar disponível era a sacarose presente na beterraba. Provavelmente no início da fermentação o *Bacillus subtilis* deva ter invertido a sacarose através de ação enzimática, deixando livre para consumo a frutose e glicose. Não se descarta a possibilidade de uma maior concentração de glicose ter acontecido entre 1 e 3 h da fermentação. Voss (2013) estudou o crescimento de *Bacillus subtilis* em biorreatores *airlift* a 30°C com aeração de 2,5 vvm, onde em aproximadamente 15h o

valor da glicose (inicial de 10 g/L) atingiu valor zero. Também foi realizado estudo em frascos Erlenmeyers e o consumo de glicose em 26h era superior a 1 g/L. O comportamento da concentração da glicose visto neste trabalho também é induzido fortemente pela concentração de oxigênio.

Pelo perfil de consumo de oxigênio (Figura 4.23) no meio de cultivo, pode-se perceber que à medida que o crescimento de microrganismo observa-se o decaimento da concentração de oxigênio ao longo do tempo e em aproximadamente 9h a maioria dos ensaios apresentou concentração próxima a zero. Este fato sugere que o fornecimento de oxigênio para o meio de cultivo não era o suficiente para manter concentração necessária para desenvolvimento aeróbio das células, quase tudo que estava disponível era consumido. Mais a frente os níveis de oxigênio no meio voltam a subir, tal comportamento pode ter acontecido devido a sucessivas lises celulares por escassez de metabolitos. Este período de consumo de quase total oxigênio corresponde à fase de crescimento do microrganismo no meio, onde também se percebe o declínio acentuado da glicose.

A produção de biossurfactante apontada no estudo (Figura 4.24) foi consideravelmente boa (concordantes com a literatura) e em particular o ensaio de número 7 mostrou mostrou ponto ótimo para a produção de biossurfactante (200 rpm para agitação e 0,5 vvm para aeração), algo muito expressivo. Este fato é o que justifica considerar no estudo do planejamento de experimentos ligados ao fermentador a concentração de biossurfactante (CB) no tempo de 9 horas de fermentação ao invés do final da batelada em 24h. Entretanto percebe-se que após o pico de concentração há um decaimento (em alguns ensaios até apresenta a tendência de crescimento novamente) na concentração do biossurfactante. O microrganismo deve ter aproveitado parte do biossurfactante produzido como estratégia de sobrevivência por estresse pela falta de nutrientes (fonte de nitrogênio ou mudança de concentração de oxigênio dissolvido) ou para conseguir metabolizar algum substrato que antes não o fazia. Barros (2007) usou *Bacillus subtilis* para produção de biossurfactantes em fermentação com manípua em fermentador a 35°C, 150 rpm e 25 L/h. Foi observado um perfil de comportamento da concentração de biossurfactante (Figura 4.28) parecido com o desenvolvido neste trabalho.

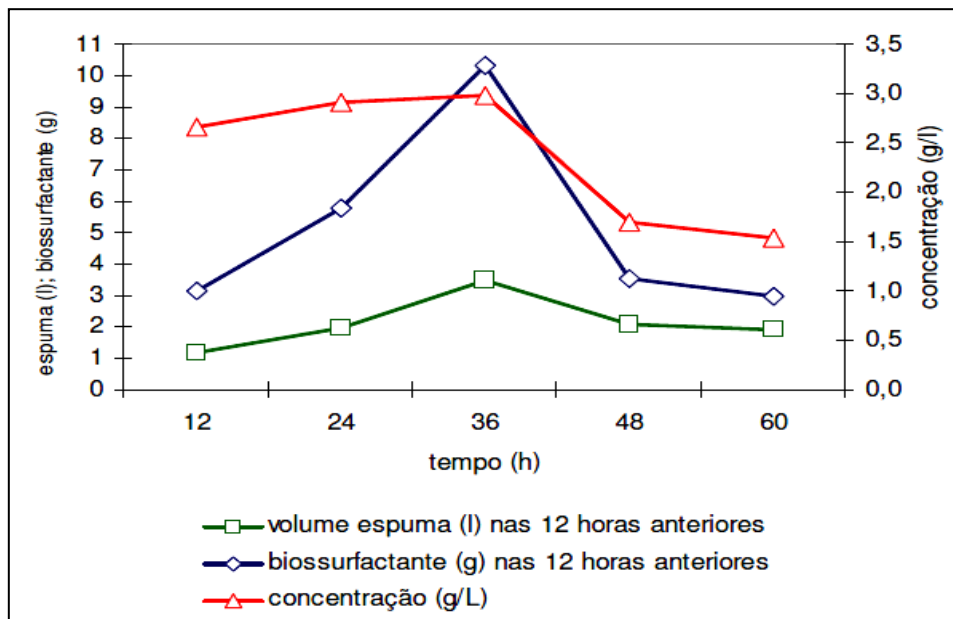


Figura 4.28: Perfil de concentração de biossurfactante da literatura (BARROS, 2007).

A média da tensão superficial alcançada foi por volta de 32 mN/m nos ensaios estudados (Figura 4.25), considerado um bom resultado em comparação com o obtido no início da fermentação. A maior redução na tensão foi para o ensaio 7 assim como foi maior concentração de biossurfactante em 9h de fermentação, por volta de 28 mN/m. A maior quantidade de biossurfactante no meio proporciona baixos valores de tensão, porque aumenta a concentração de micelas para interação interfacial. Entretanto, chega-se a um ponto que por mais que se tenha surfactante no meio não existe mais a redução da tensão, pois atingiu-se a concentração de micelas suficientes para reduzir a tensão. Mano (2008) estudou o processo de purificação por membranas da produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* por fermentação em manipueira, onde foi necessário determinar a concentração micelar crítica. A amostra em uma concentração de biossurfactante de 1,0 g/L foi capaz de reduzir a tensão superficial de 72 para 27 mN/m, a medida que a concentração foi aumentando até 10 g/L não houve mudança nos valores da tensão superficial.

Com esta estratégia de otimização dos parâmetros do fermentador, conseguiu-se avaliar a tensão superficial a uma diluição de 10 vezes do meio com biossurfactante (Figura 4.26). Em geral, as amostras reduziram a tensão mesmo nesta condição de diluição, evidente através da mudança na redução da tensão do início até o tempo de 9h.

Entende-se que nos meios havia grande quantidade de micelas capazes de tal redução para maioria dos ensaios. Pelo ensaio 7, pode-se notar maior redução de tensão, já que possui a menor valor da tensão superficial dentre as outras, por volta de 29 mN/m, ou seja, possui ainda uma quantidade significativa de micelas.

A tensão superficial das amostras diluídas 100 vezes (TS^{-2}) é ainda mais reveladora (Figura 4.27), por testar o poder da amostra em redução da tensão a 100 vezes. Esse tipo de diluição faz com que a amostra seja praticamente água, apresentando tensão de aproximadamente 72 mN/m. Para amostras com concentrações muito baixas de biossurfactante, a tensão aproxima-se a da água. Contudo, ainda percebe-se a presença de micelas em algumas amostras, principalmente na amostra do ensaio 7 que conseguiu reduzir a tensão por volta de 31 mN/m.

Esse conjunto de informações elucidam muitos aspectos envolvidos na cinética de fermentação do *Bacillus subtilis*, como por exemplo, o tempo ideal de fermentação. Nestas condições, 9h apresenta o melhor tempo para produção de biossurfactante, representando uma redução significativa no tempo de batelada. Estas informações da fermentação a 24h também foram importantes para construção de banco de dados a ser usado no desenvolvimento do modelo neural.

4.5 Construção do modelo neural

O estudo de bioprocessos é muito importante para se entender o potencial de transformação dos agentes biológicos de substratos (às vezes a base de resíduos orgânicos) em produtos de grande importância em diversas áreas. A complexidade envolvida nestes tipos de processos é a variabilidade que o comportamento dos microrganismos pode assumir e que muitas vezes é detectado tardiamente, porque as informações sobre o produto não são *online* (muitas vezes não há sensores para este fim).

As informações geradas nos ensaios deste estudo, do planejamento de experimentos do fermentador, vêm dar entendimento para os perfis da fermentação e muitas destas informações foram mensuradas *offline*. Algumas análises foram realizadas em um tempo curto: como é o caso da concentração de glicose (CG) aproximadamente

5 minutos. Em contrapartida, a concentração de biossurfactante (CB) leva aproximadamente 48 h (entre precipitação e secagem da amostra na estufa) para se mensurar.

Uma alternativa a isto é a construção de modelos matemáticos para predição de variáveis que, se bem sucedidos, podem ajudar na virtualização de sensores. Para formulação de modelos matemáticos do processo, principalmente os que levam em conta os fenômenos envolvidos (SCHMIDELL et al., 2001) é necessário resumir os principais parâmetros, fenômenos e interações que influenciam o comportamento cinético de uma população microbiana. Por exemplo, as células consomem nutrientes e os convertem em produto, mas também geram calor que é dissipado para o meio que define a temperatura, além das interações mecânicas de efeitos de fluxo que estão intimamente ligadas às mudanças de viscosidade. Isto leva um tempo exaustivo até chegar-se a um modelo matemático apropriado.

No caso de uma modelagem com redes neurais artificiais (RNAs) é necessário formar uma biblioteca de dados muito bem amostrada com todas variáveis disponíveis para o seu processamento. As RNAs são capazes de “entender” o comportamento de vários processos sem a necessidade de informações pontuais ou particulares, basta que elas sejam treinadas, através da otimização dos parâmetros (pesos e bias).

Neste trabalho foram realizadas modelagens e simulações com redes neurais artificiais (RNAs), cujos dados usados para desenvolver os modelos partiram das informações do item 4.4 gerados com o estudo de planejamento experimental no fermentador. A biblioteca de dados foi formada por 8 bateladas com dados viáveis.

As topologias de RNAs não seguem uma metodologia única para sua definição. Cada pesquisador define de forma heurística ou recorre a artifícios de algoritmos de buscas, visando sempre os melhores desempenhos com os melhores valores do coeficiente de determinação R^2 (próximo de 1) e de análise de erros (próximo de 0). Dhanarajan et al. (2014) desenvolveram uma RNA para um processo de fermentação pelo microrganismo *Bacillus megaterium* baseada em uma topologia alcançada pelo algoritmo de otimização por enxame de partículas (Particle Swarm Optimization-PSO).

Na entrada da RNA foram utilizadas as variáveis temperatura, pH, agitação e aeração do meio em um fermentador de 3,7 L e para o neurônio de saída foi a concentração de lipopeptídeo. A topologia alcançada foi a de 17 neurônios na camada intermediária, ativados pela função tangente sigmoide, que garantiram R^2 de 0,998 e MSE de $2,14E^{-04}$.

Antes de começar a desenvolver os modelos neurais pertinentes ao estudo, ressalta-se que foi necessário aumentar o número de amostras na biblioteca de dados que nesta conjuntura possuía 216 pontos. A técnica mais indicada é a interpolação pelo método *spline*. No geral, métodos *spline* são empregados para ajustar um polinômio de grau “n” a um intervalo de dois pontos de X, aproximando a derivada do polinômio ajustado a ser igual à derivada do polinômio com os pontos experimentais. Assim, ajustou-se com auxílio do software MATLAB as informações das variáveis do processo pelo método *spline*, obtendo dados de cada uma delas em um tempo de amostragem de 1h na fermentação, ao invés de 3h como era antes. Deste modo, o novo número de dados triplicou, totalizando 575 pontos. Assim aproximadamente 75 % dos dados para o conjunto de treinamento (425) e 25% para o conjunto de teste (150).

As simulações a seguir apresentam cenários com topologias diferentes para o treinamento da rede neural em Blocos, como mostrado na Tabela 4.15. Houve combinações entre a quantidade de neurônios na camada de entrada, quantidade de neurônios na camada intermediária e as funções de ativação da camada intermediária. O algoritmo de treinamento implementado foi Levenberg-Marquardt com Regularização Bayesiana (*trainbr*) e a função de ativação para a camada de saída foi a linear (*purelin*), para todos os blocos de simulação.

Tabela 4.15 Situação entre as topologias estudadas.

Bloco	Entrada da rede neural						Função de ativação	Saída
	CM*	CG*	OD*	TS*	TS ⁻¹ *	TS ⁻² *		
I	X	X	X	-	-	-	Logsig	CB*
II	X	X	X	-	-	-	Tansig	CB
III	X	X	X	X	-	-	Logsig	CB
IV	X	X	X	X	-	-	Tansig	CB
V	X	X	X	X	X	X	Logsig	CB
VI	X	X	X	X	X	X	Tansig	CB

CM* - Concentração microbiana; CG* - Concentração de glicose; OD* - Concentração de Oxigênio dissolvido; TS* - Tensão superficial; TS⁻¹* - Tensão superficial 10x diluída; TS⁻²* - Tensão superficial 100x diluída; CB - Concentração de biossurfactante.

Como mostrado na Tabela 4.15, foram consideradas diferentes variáveis na camada de entrada, tais quais concentração microbiana (CM), concentração de glicose (CG), concentração de oxigênio dissolvido (OD), tensão superficial (TS), tensão superficial 10x diluída (TS⁻¹) e tensão superficial diluída 100 x (TS⁻²).

4.5.1 Desenvolvimento e análise de desempenho dos modelos neurais

Bloco I

Nas simulações preliminares considerou-se uma topologia de 3 neurônios na camada de entrada (correspondentes à variáveis: crescimento microbiano, concentração de glicose e concentração de oxigênio dissolvido), 1 neurônio na camada de saída (concentração de biossurfactante). Para a camada intermediária foram feitas combinações, como apresentado na Tabela 4.16, da quantidade de neurônios com função de ativação *logsig*. O desempenho de cada situação (Tabela 4.15) foi através da avaliação do R², parâmetros de erro (SSE, MSE e RMSE) e os coeficientes linear e

angular (os valores têm que ser próximos de zero e de um, respectivamente), referente aos dados de teste.

Tabela 4.16: Variação na topologia da rede neural e os resultados para tomada de decisão, Bloco I.

Neurônios camada intermediária	R^2	SSE*	MSE*	RMSE*	Coefficiente linear	Coefficiente angular
3	0,627	13,69	3,22E-02	1,79E-01	1,3E02	0,59
6	0,555	9,13	2,14E-02	1,46E-01	1,7E02	0,53
8	0,578	7,17	1,64E-02	1,30E-01	1,4E02	0,62
10	0,651	7,30	1,71E-02	1,31E-01	1,6E02	0,60

SSE* - Soma dos erros quadráticos; MSE* - Erro quadrado médio; RMSE*- Raiz do erro quadrado médio.

Nesta situação, a camada intermediária com 10 neurônios mostrou o melhor desempenho entre os outros cenários, porém o desempenho não foi satisfatório. Com R^2 (referente ao teste) muito inferior a 1 e os valores dos parâmetros de erro, de uma maneira geral, foram altos (já que se possui uma número relevante de dados no treinamento). Para verificar esta situação, os desempenhos estão apresentados nas Figuras 4.29 a 4.31 usando dados do treinamento e Figuras 4.32 e 4.33 usando dados de teste, não vistos no treinamento.

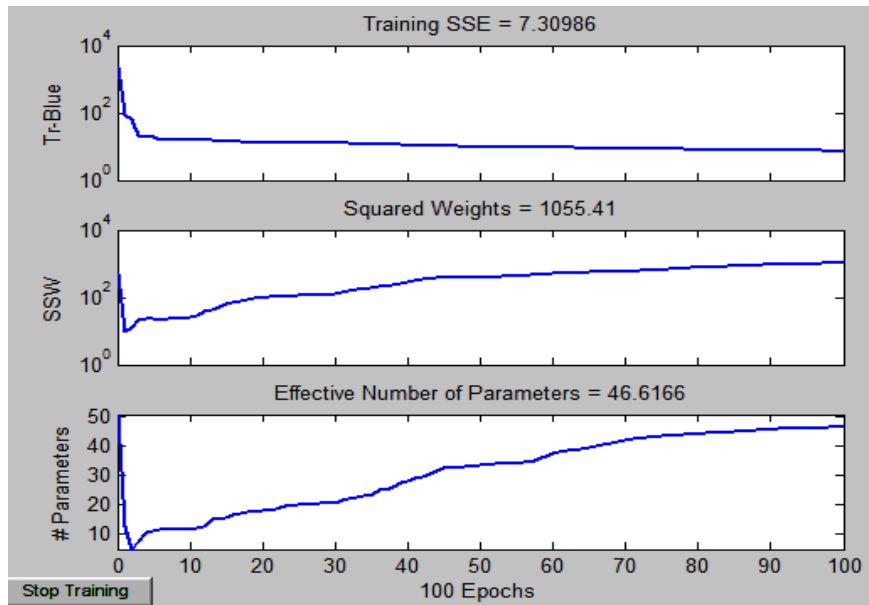


Figura 4.29: Evolução do treinamento com 10 neurônios na camada intermediária, Bloco I.

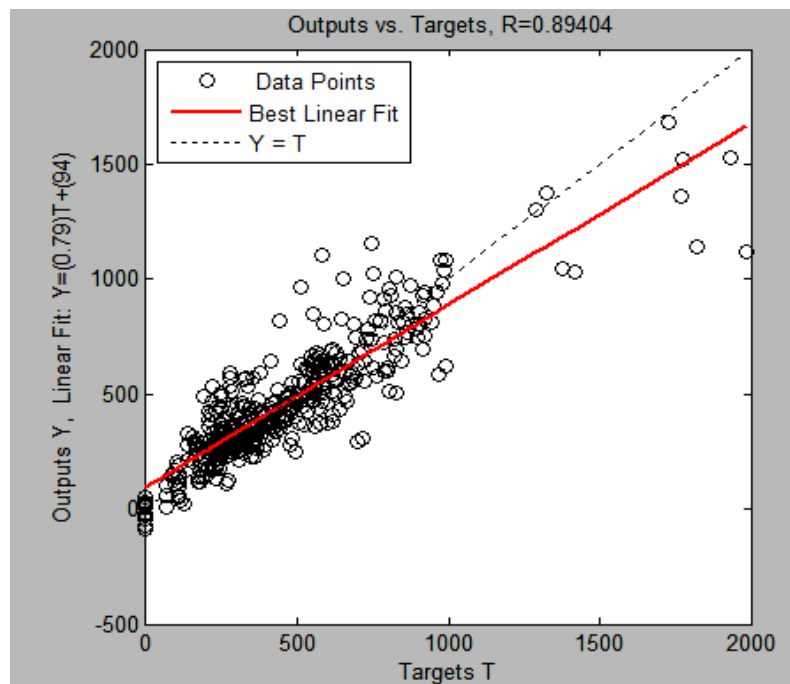


Figura 4.30: Dispersão entre a saída real e calculada usando dados do treinamento, com 10 neurônios na camada intermediária, Bloco I.

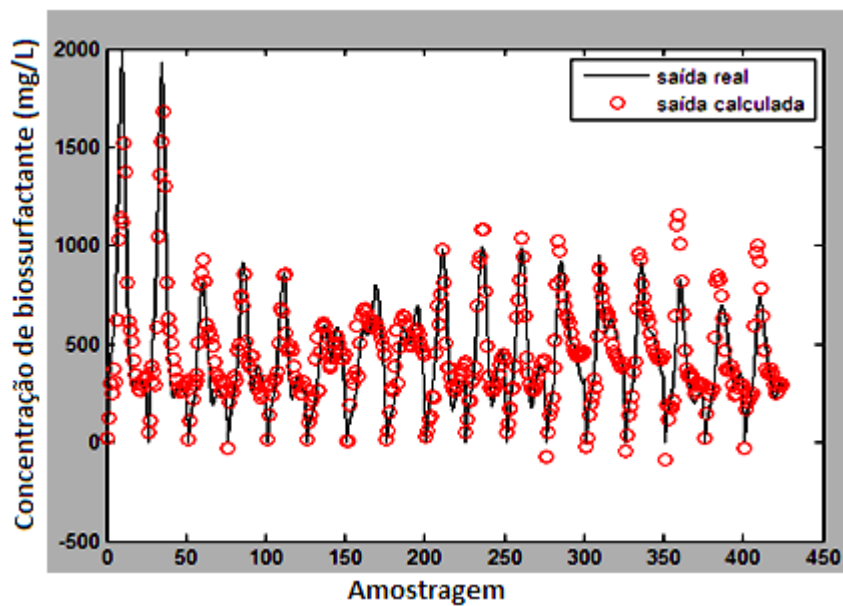


Figura 4.31: Comparação entre a saída real e a saída calculada usando os dados do treinamento, com 10 neurônios na camada intermediária, Bloco I.

É interessante analisar o comportamento do treino da RNA para justificar o comportamento mediante dados de teste. Observa-se que o SSE foi menor do que na primeira situação com 6 neurônios na camada intermediária. O valor do coeficiente de determinação (R^2) do treinamento é maior que no teste, porque os dados utilizados para predição já eram conhecidos pela RNA.

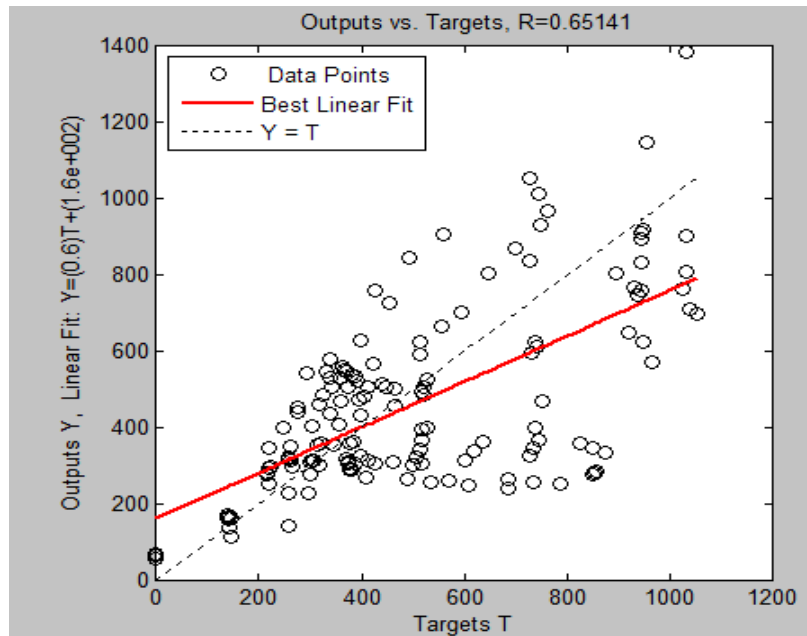


Figura 4.32: Dispersão entre saída real e saída calculada pelo modelo usando dados de teste.

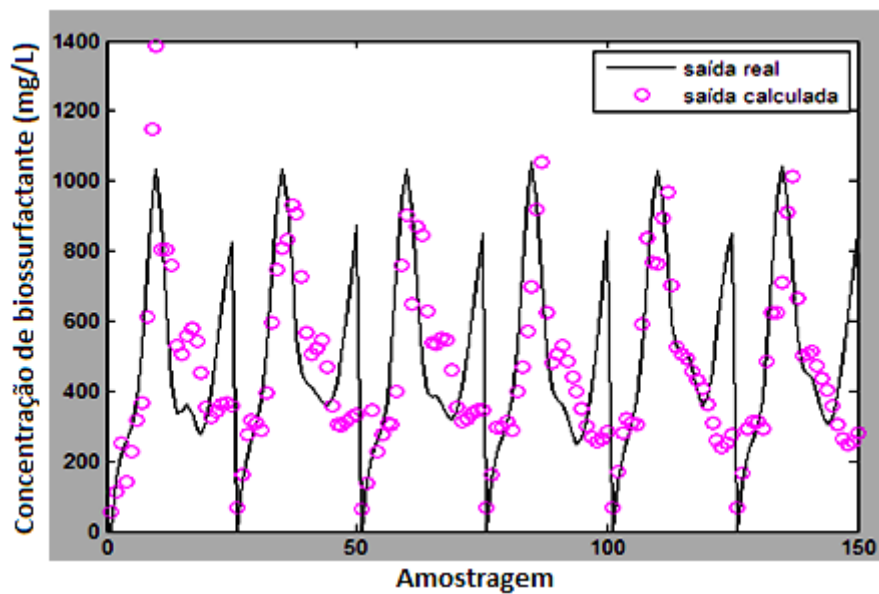


Figura 4.33: Comparação entre saída real e saída calculada no teste.

Percebe-se que na comparação entre os dados experimentais e os dados calculados não há uma boa concordância do modelo. Então, decidiu-se continuar a fazer simulações mudando o cenário da topologia das RNA.

Bloco II

Neste bloco as simulações continuaram a ter 3 neurônios na camada de entrada (correspondentes ao crescimento microbiano, concentração de glicose e oxigênio dissolvido), 1 neurônio na camada de saída. E para camada intermediária houve configurações diferenciadas quanto ao número de neurônios. A função de ativação utilizada em todos os casos foi a *tansig*. Na Tabela 4.17 é mostrado o desempenho das topologias frente aos dados de teste.

Tabela 4.17: Variação na topologia da rede neural e os resultados para tomada de decisão, Bloco II.

Neurônios camada intermediária	R ²	SSE	MSE	RMSE	Coefficiente linear	Coefficiente angular
3	0,737	13,60	3,2E-02	1,78E-01	94,0	0,66
6	0,545	9,10	2,14E-02	1,46E-01	1,7E02	0,52
8	0,645	8,05	1,89E-02	1,37E-01	1,3E02	0,64
10	0,605	7,80	1,83E-02	1,35E-01	1,6E02	0,57

Assim como no Bloco I não houve um desempenho satisfatório para as configurações testadas no modelo. Na verdade os valores de desempenho da topologia foram muito semelhantes e aquém do ideal. Para verificar esta situação, os desempenhos da situação com 10 neurônios na camada intermediária estão apresentados nas Figuras 4.34 até 4.36 usando dados do treinamento e Figuras 4.37 e 4.38 usando dados de teste, não utilizados no treinamento.

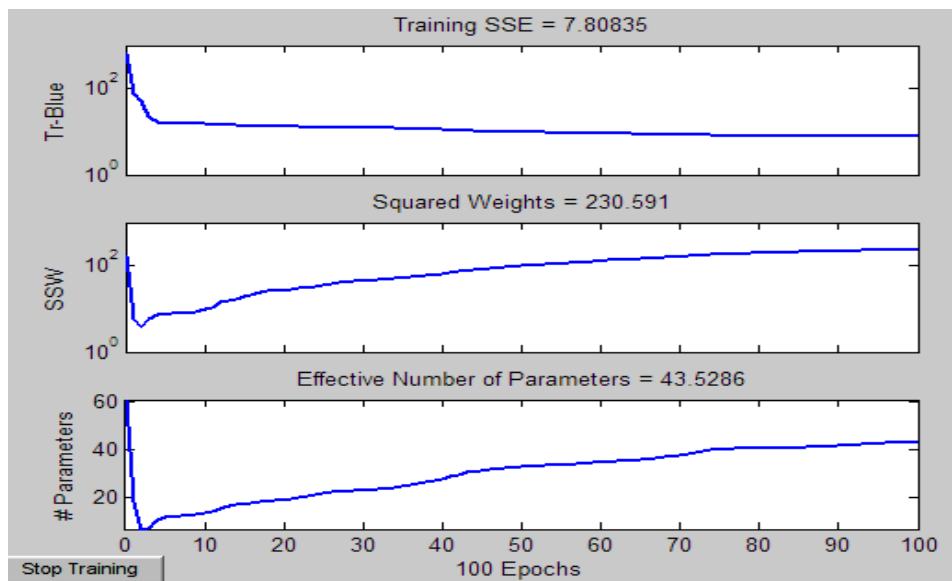


Figura 4.34: Desenvolvimento do treino com 10 neurônios na camada intermediária, Bloco II.

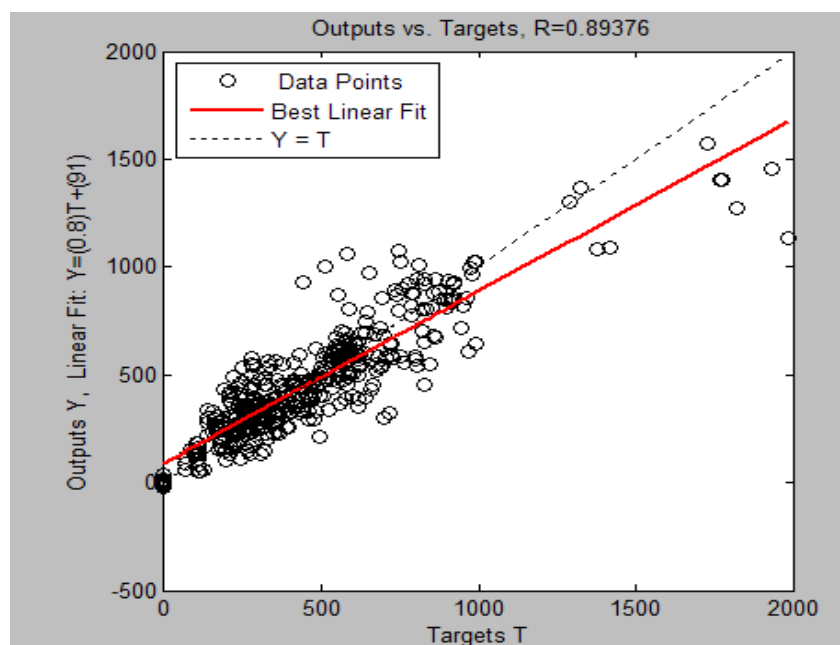


Figura 4.35: Dispersão entre a saída real e a calculada pelo modelo usando dados do treinamento, com 10 neurônios na camada intermediária, Bloco II.

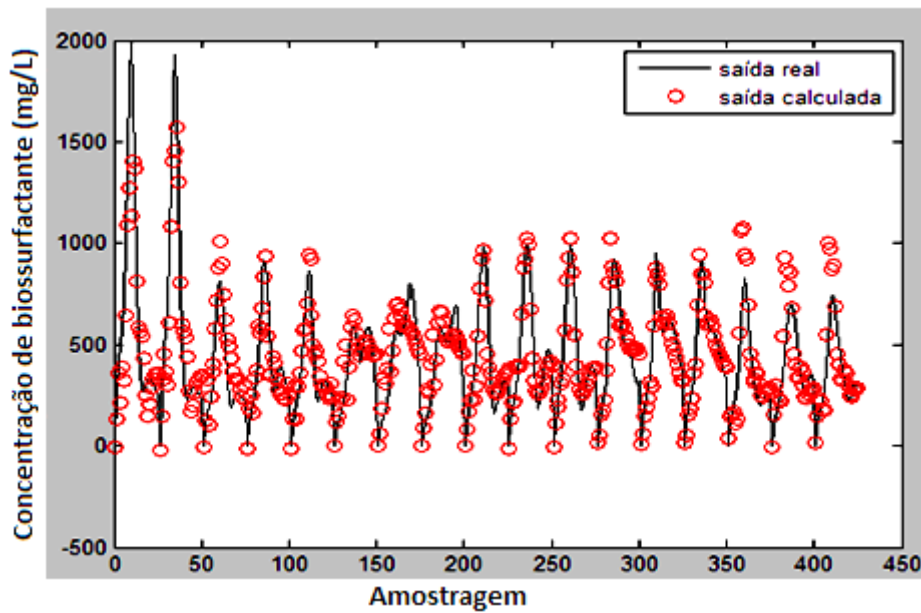


Figura 4.36: Comparação entre a saída real e calculada no treinamento com 10 neurônios na camada intermediária, Bloco II.

O comportamento do treinamento da RNA para o Bloco II, também, não apresentou bom desempenho, evidentes nas Figuras 4.37 e 4.38 (R^2 muito abaixo de 1 e dados preditos não condizentes com dados reais). Observa-se que o valor do coeficiente linear apresentou um valor melhor com 6 neurônios na camada intermediária dentre os vistos, porém distantes do valor zero. O valor do coeficiente de determinação (R^2) do treinamento, também, foi maior que no teste, porque os dados utilizados para predição já eram conhecidos pela RNA.

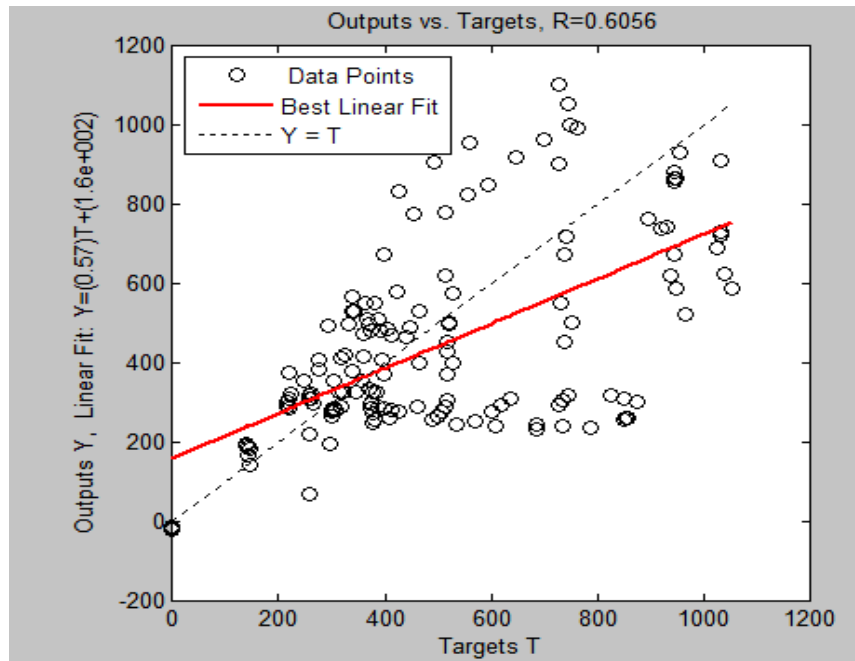


Figura 4.37: Dispersão entre a saída real e a calculada pelo modelo usando dados de teste, Bloco II.

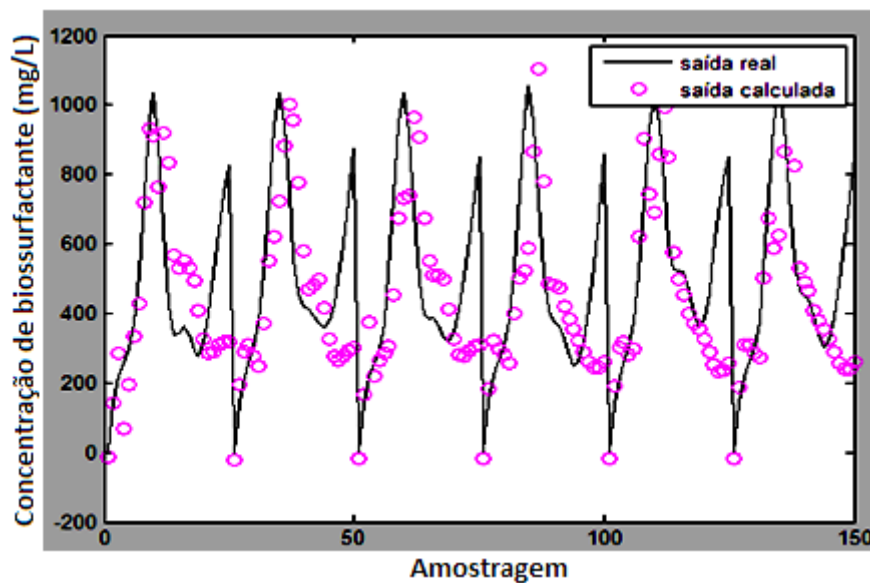


Figura 4.38: Comparação entre a saída real e a saída calculada pelo modelo com dados do teste, Bloco II.

Percebe-se na comparação entre os dados experimentais de teste e os dados calculados o quão o modelo encontra-se distante do ideal. Então, decidiu-se continuar a fazer simulações mudando o cenário da topologia das RNA, novamente. Porém,

entende-se que o modelo precisa de mais informações de entrada para melhor desempenho na predição.

Bloco III

As simulações deste bloco tiveram 4 neurônios na camada de entrada (correspondentes às variáveis: concentração microbiana, concentração de glicose e oxigênio dissolvido e a tensão superficial), 1 neurônio na camada de saída. E para camada intermediária, variou-se a quantidade de neurônios (Tabela 4.18). Nesse caso, a função de ativação utilizada foi a *logsig*. A avaliação do desempenho também se deu através dos valores de R^2 , dos de erros (SSE, MSE, RMSE) e os coeficientes linear e angular, usando dados de teste.

Tabela 4.18: Variação na topologia da rede neural e os resultados tomada de decisão, Bloco III.

Neurônios camada intermediária	R^2	SSE	MSE	RMSE	Coefficiente linear	Coefficiente angular
4	0,984	0,376	8,84E-04	2,97E-02	8,7	1,00
6	0,978	0,286	6,73E-04	2,60E-02	61,0	0,90
10	0,933	0,166	3,90E-04	1,97E-02	52,0	0,88
12	0,945	0,152	3,57E-04	1,89E-02	51,0	0,92

As simulações deste bloco se mostraram melhores que as anteriores (Bloco I e II), o que mostra que a inserção da variável tensão superficial resultou em melhor desempenho. Percebeu-se que os valores R^2 foram maiores que 0,9. Os valores dos erros também foram bem menores para todos os casos e os coeficientes angulares ficaram próximo de um, já os lineares ficaram bem distante de zero. Para se verificar o desempenho, apresentou-se os gráficos do erro, de dispersão da situação com 12 neurônios na camada intermediária, representados nas Figuras 4.39 até 5.41 usando dados do treinamento e as Figuras 4.42 e 4.43 para dados de teste.

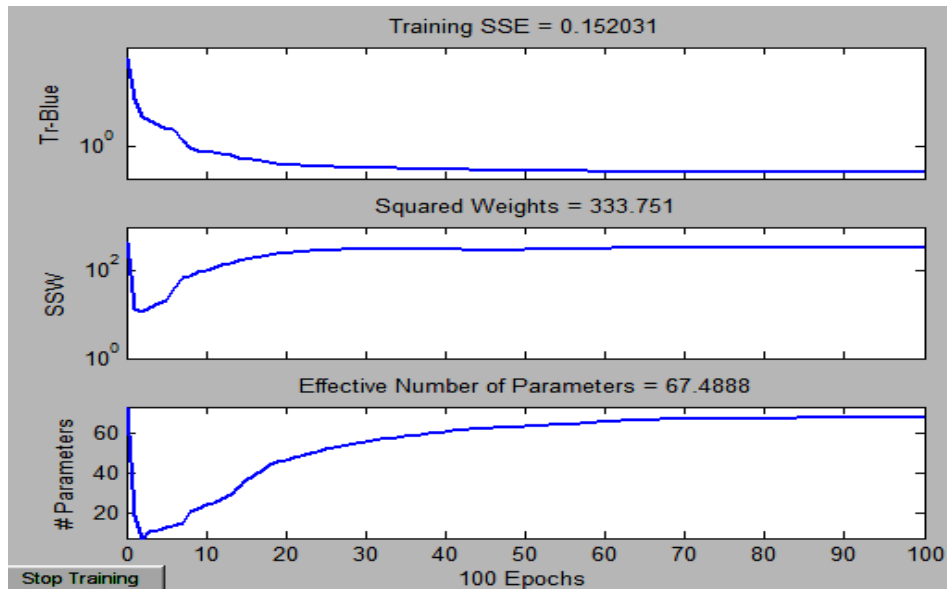


Figura 4.39: Desenvolvimento do erro no treinamento com 12 neurônios na camada intermediária, Bloco III.

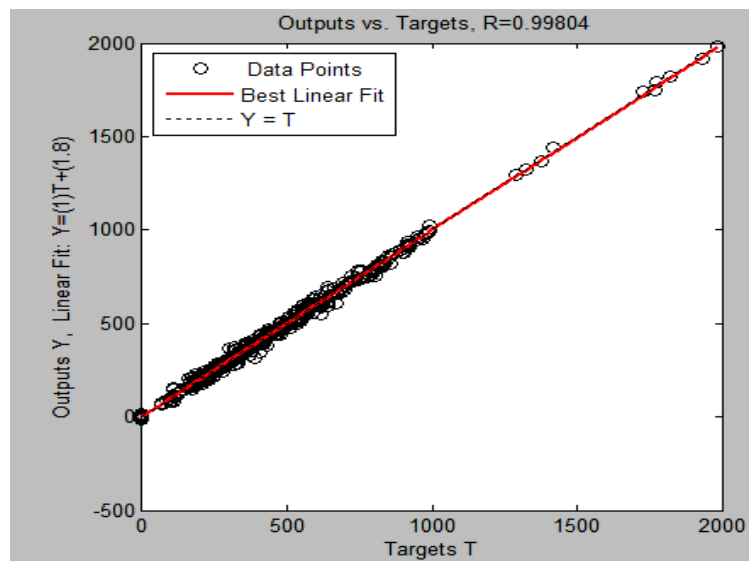


Figura 4.40: Dispersão entre a saída real e a calculada no modelo com 12 neurônios na camada intermediária no treinamento, Bloco III.

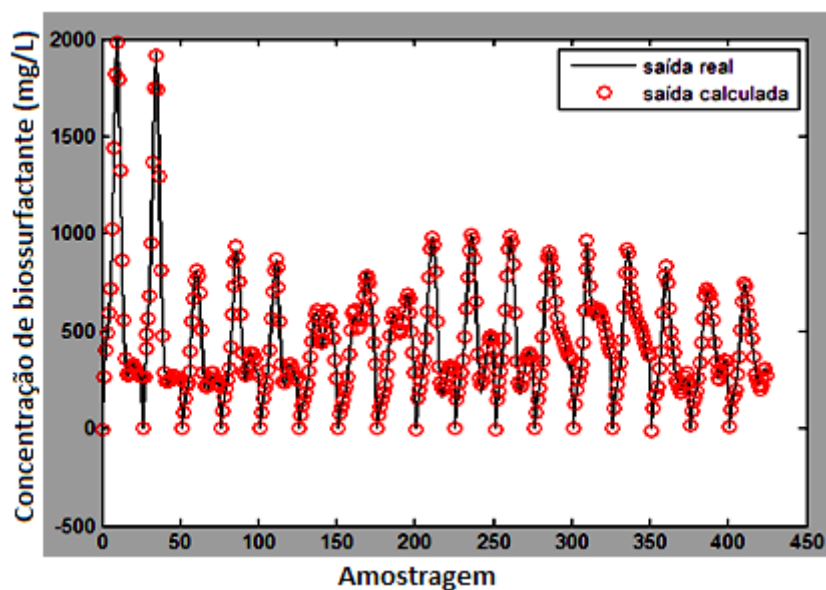


Figura 4.41: Comparação entre a saída real e a saída calculada do modelo com 12 neurônios no treinamento, Bloco III.

O gráfico de dispersão entre a saída real e a calculada pelo modelo apresentou um coeficiente de determinação (R^2) do treinamento maior que no teste (0,998), prova que está mais preciso para predição do que os modelos dos Blocos I e II.

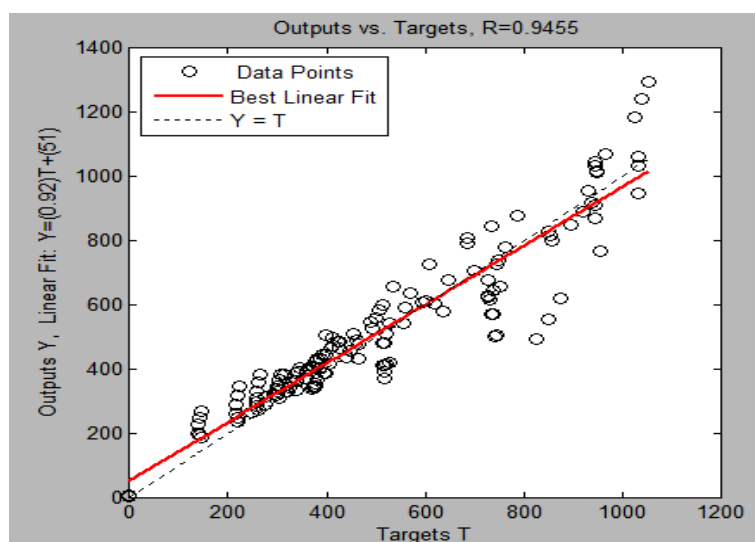


Figura 4.42: Dispersão entre a saída real e a calculada pelo modelo com os dados de teste, Bloco III.

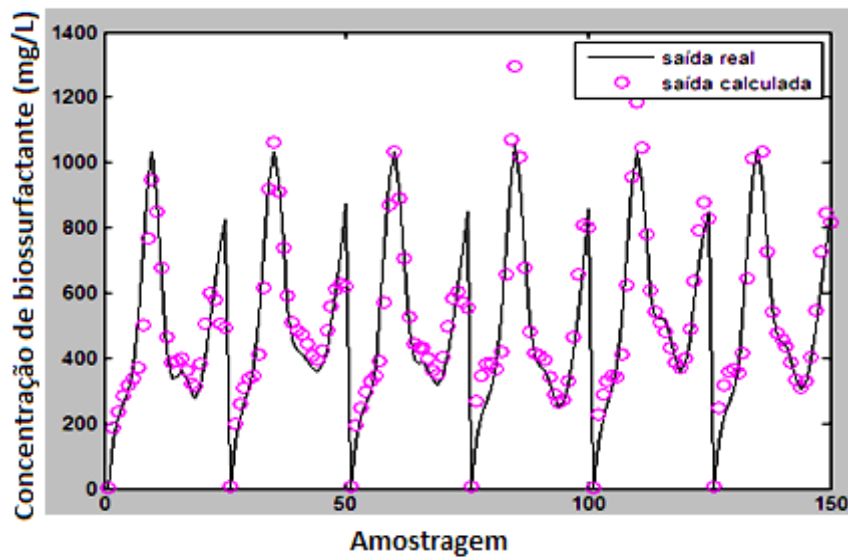


Figura 4.43: Comparação entre a saída real e a calculada pelo modelo com dados de teste, Bloco III.

Percebe-se que dados calculados se ajustaram melhor aos dados experimentais do teste do que nas simulações anteriores, apresentando $R^2=0,945$. Prosseguiu-se então, realizando simulações para outros cenários da topologia das RNA para diferente função de ativação.

Bloco IV

O Bloco IV também teve simulações usando 4 neurônios na camada de entrada (correspondentes ao crescimento microbiano, concentração de glicose, oxigênio dissolvido e tensão superficial), 1 neurônio na camada de saída. E para camada intermediária variou-se a quantidade de neurônios (Tabela 4.19). A função de ativação utilizada em todos os casos foi a *tansig*. A avaliação do desempenho também se deu através dos valores de R^2 , dos parâmetros de erros (SSE, MSE, RMSE) e os coeficientes linear e angular, usando os dados de teste.

Tabela 4.19: Variação na topologia da rede neural e os resultados para tomada de decisão, Bloco IV.

Neurônios camada intermediária	R^2	SSE	MSE	RMSE	Coefficiente linear	Coefficiente angular
4	0,984	0,376	8,84E-04	2,97E-02	8,7	1,00
6	0,978	0,286	6,72E-04	2,59E-02	61,0	0,90
10	0,933	0,166	3,90E-04	1,97E-02	52,0	0,88
12	0,978	0,247	5,81E-04	2,41E-02	34,0	0,92

As simulações deste bloco também foram melhores que nos Blocos I e II. Percebeu-se que todos os valores R^2 das configurações foram maiores de 0,9, como no Bloco III. Os valores dos erros também foram bem menores para todos os casos e os coeficientes angulares ficaram próximo de um, já para os coeficientes lineares apenas a simulação com 4 neurônios na camada intermediária apresentou um valor mais baixo (8,7 mais próximo de zero) em relação aos demais deste e do Bloco III. Para verificar o desempenho, apresentou-se os gráficos do erro, de dispersão da situação com 12 neurônios na camada intermediária, apresentados nas Figuras 4.44 a 4.46 para o treinamento e as Figuras 4.47 e 4.48 para dados de teste.

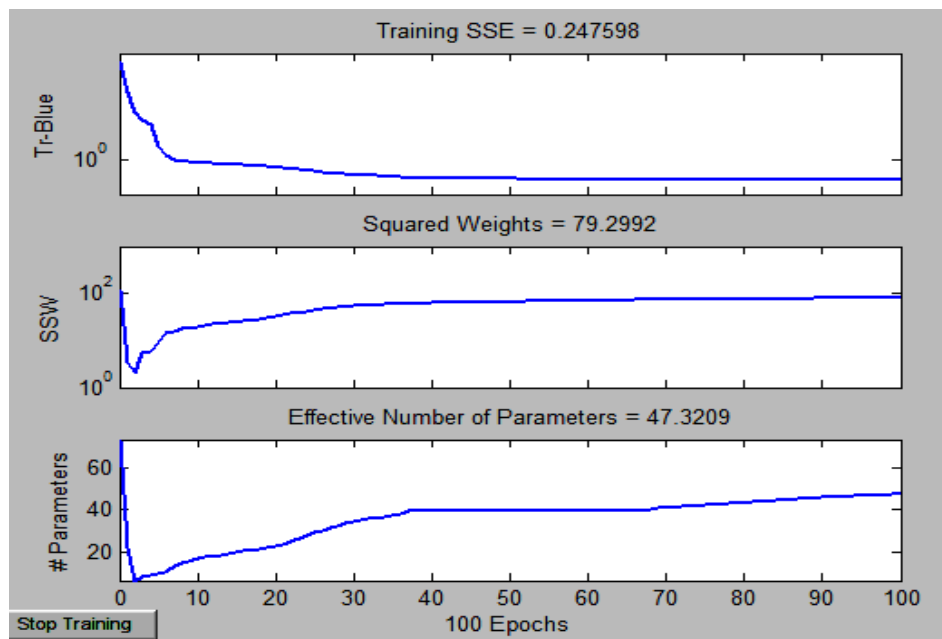


Figura 4.44: Desenvolvimento do treino com 12 neurônios no treinamento, Bloco IV.

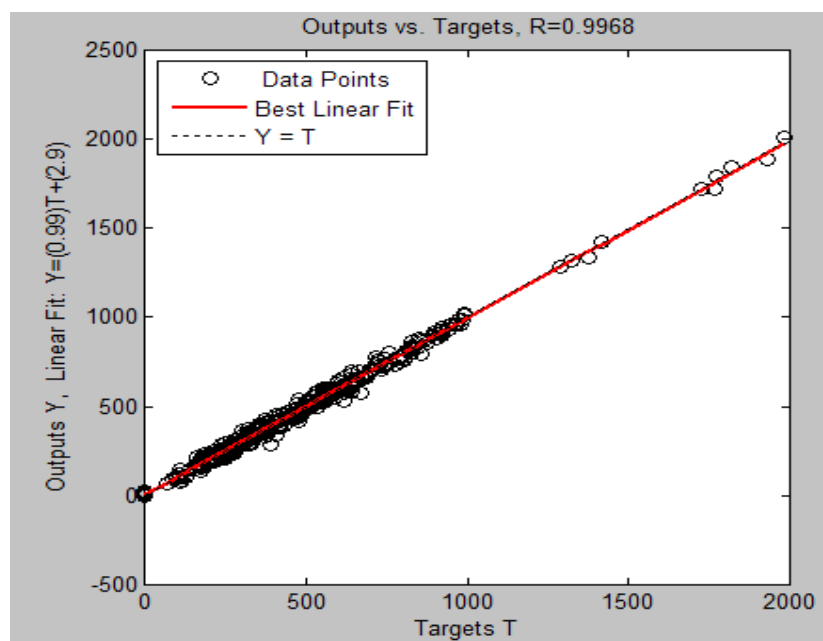


Figura 4.45: Dispersão entre a saída real e a calculada pelo modelo com 12 neurônios na camada intermediária no treinamento, Bloco IV .

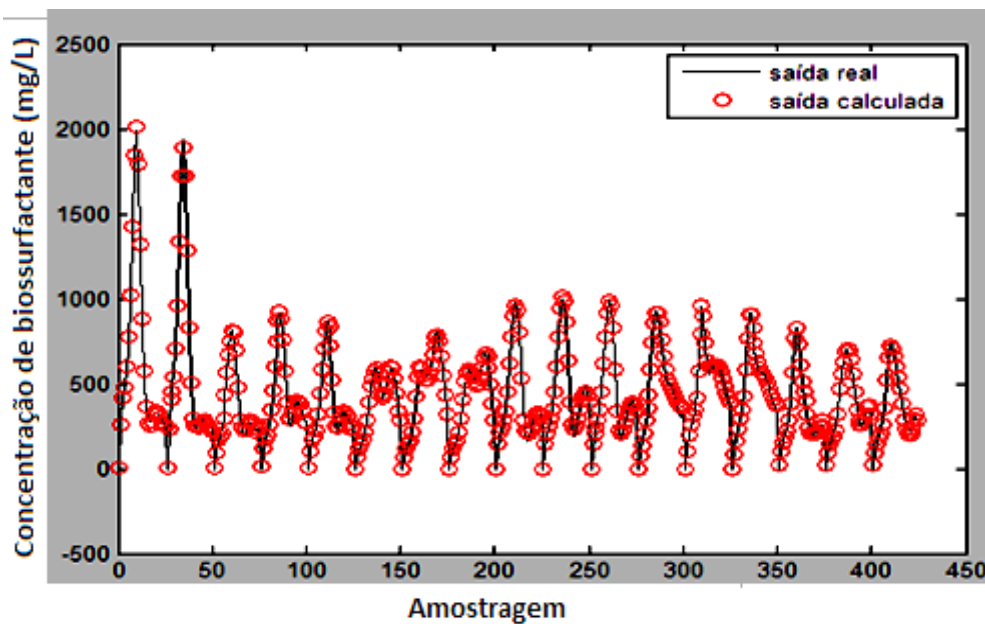


Figura 4.46: Comparação entre a saída real e a calculada pelo modelo com 12 neurônios na camada intermediária do treinamento.

Nesta situação o gráfico de dispersão entre a saída real e a calculada pelo modelo apresentou um coeficiente de determinação (R^2) do treinamento maior que no teste (0,996) e uma precisão muito boa.

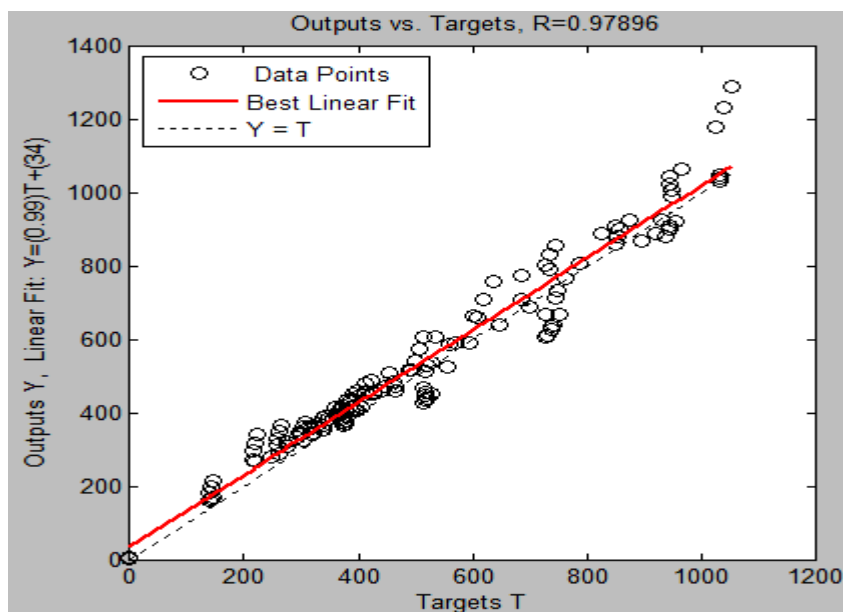


Figura 4.47: Dispersão entre a saída real e a calculada pelo modelo com os dados de teste, Bloco IV.

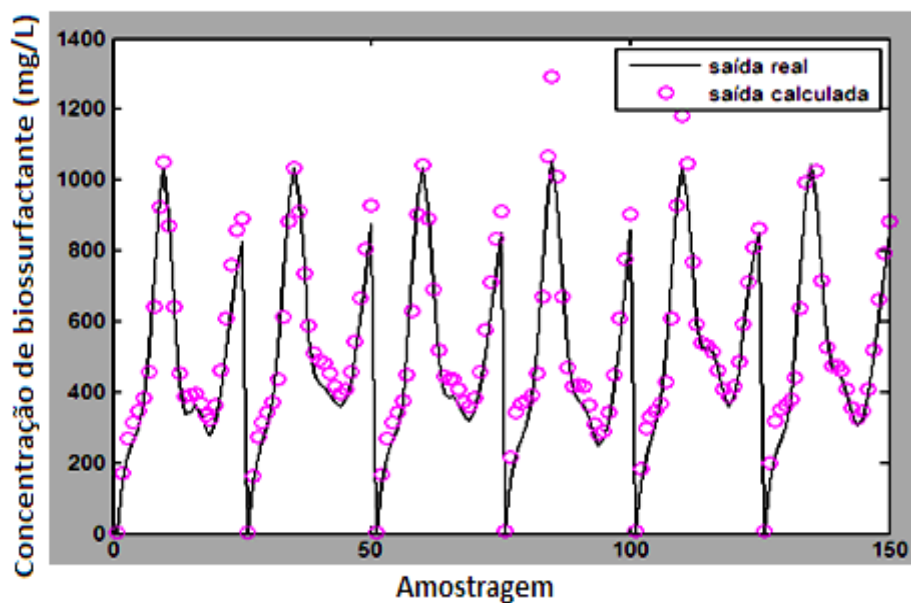


Figura 4.48: Comparação entre a saída real e a calculada pelo modelo com os dados de teste, Bloco IV.

Aqui os dados calculados também tiveram uma boa concordância com os dados experimentais de teste, com R^2 de 0,979. Poder-se-ia tentar escolher a melhor topologia da RNA, porém pode-se melhorar ainda mais esse comportamento. Para tanto, resolveu-se introduzir novas topologias aumentando principalmente o número de neurônios na camada de entrada (fornecendo mais informações a RNA).

Bloco V

O Bloco V foi configurado com 6 neurônios na camada de entrada (correspondentes ao crescimento microbiano, concentração de glicose, oxigênio dissolvido, tensão superficial, tensão superficial 10x diluída e tensão superficial 100x diluída), 1 neurônio na camada de saída. E para camada intermediária, variou-se a quantidade de neurônios (Tabela 4.20). A função de ativação utilizada em todos os casos foi a *logsig*. A avaliação do desempenho também se deu através dos valores de R^2 , dos parâmetros de erros (SSE, MSE, RMSE) e os coeficientes linear e angular, usando dados de teste.

Tabela 4.20: Variação na topologia da rede neural e os resultados para tomada de decisão, Bloco V.

Neurônios camada intermediária	R^2	SSE	MSE	RMSE	Coefficiente linear	Coefficiente angular
6	0,967	0,185	4,11E-03	6,41E-02	21,0	1,00
10	0,956	0,120	2,82E-04	1,68E-02	56,0	0,89
14	0,946	0,124	2,91E-04	1,70E-02	0,56	1,10
16	0,975	0,078	1,83E-04	1,35E-02	27,0	0,96

As simulações do Bloco V foram similares às simulações do Bloco III e do Bloco IV. Percebeu-se que todos os valores R^2 das configurações foram maiores de 0,9. Os valores dos erros também foram baixos para todos os casos e os coeficientes angulares ficaram próximos de um. Os coeficientes lineares também foram próximos anteriores (muito distante de zero), porém a simulação com 14 neurônios na camada intermediária apresentou um valor de 0,56. Observa-se que a inserção de mais duas variáveis na camada de entrada (para estes casos) não apresentou uma melhora significativa (R^2 mais próximo de um, menores valores de erros e valores de coeficiente linear e angular próximos de um e zero, respectivamente) como se esperava. Para verificar o desempenho, apresentaram-se os gráficos do erro, de dispersão da situação com 16 neurônios na camada intermediária, representados nas Figuras 4.49 até 4.51 para o treinamento e as Figuras 4.52 e 4.53 para os dados de teste.



Figura 4.49: Desenvolvimento do erro com 16 neurônios na camada intermediária no treinamento, Bloco V.

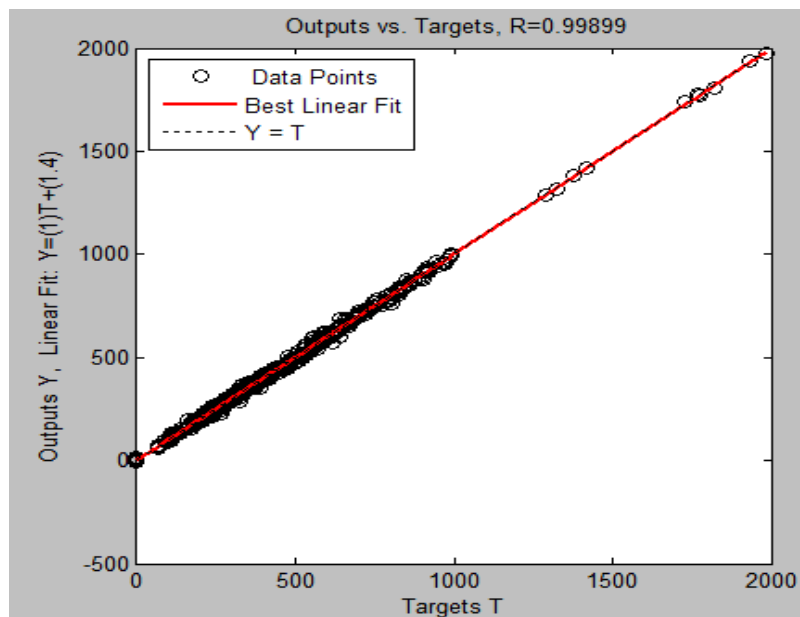


Figura 4.50: Dispersão entre a saída real e a calculada pelo modelo com 16 neurônios na camada intermediária no treinamento, Bloco V.

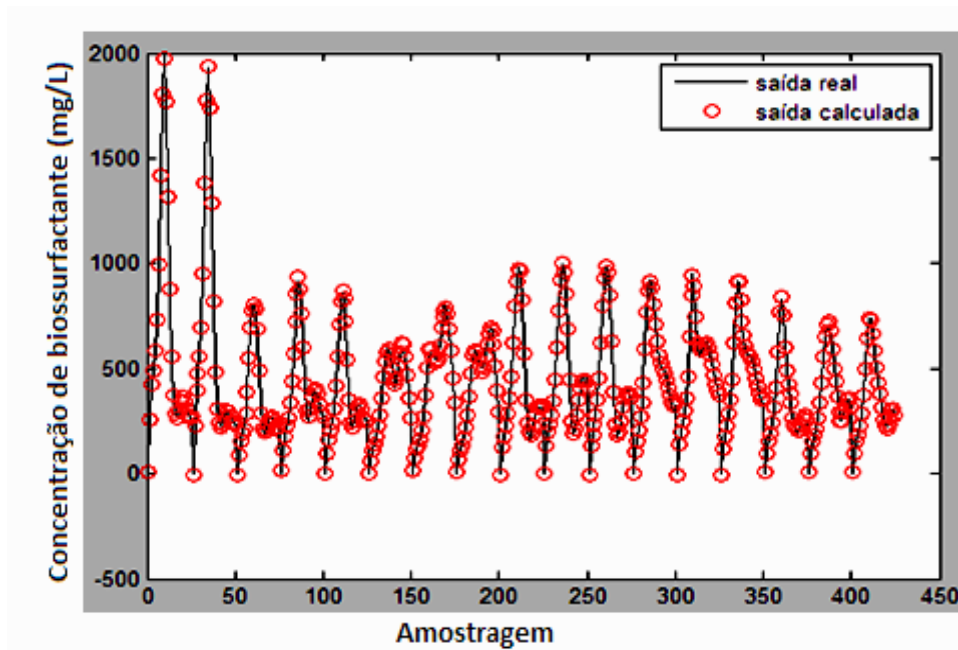


Figura 4.51: Comparação entre a saída real e a calculada pelo modelo com 16 neurônios na camada intermediária do treinamento, Bloco V.

O gráfico de dispersão entre a saída real e a calculada pelo modelo na simulação com 16 neurônios na camada intermediária também apresentou uma precisão muito boa com um coeficiente de determinação (R^2) do treinamento maior que no teste (0,998).

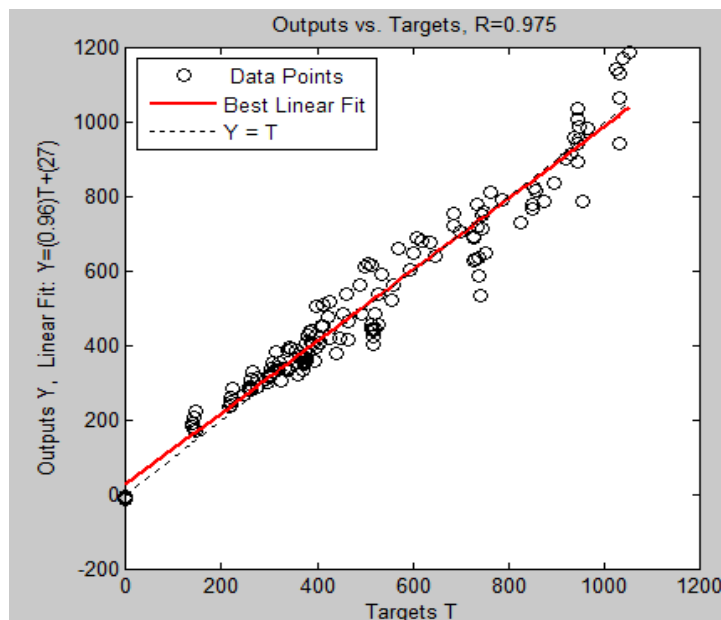


Figura 4.52: Dispersão entre a saída real e a calculada pelo modelo com os dados de teste, Bloco V.

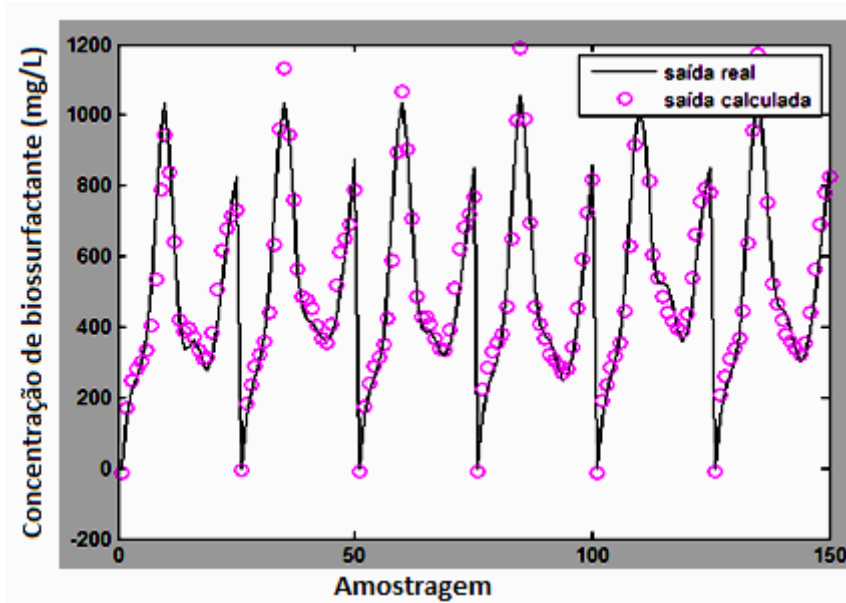


Figura 4.53: Comparação entre a saída real e a calculada pelo modelo com os dados de teste, Bloco IV.

Os dados calculados também tiveram uma boa concordância com os dados experimentais de teste, com $R^2=0,975$. Neste bloco a configuração mais apropriada para compor o *soft sensor* seria a com 14 neurônios na camada intermediária, além de R^2 satisfatório, os parâmetros de erro foram baixos e os coeficientes dentro da especificação. Seguiu-se para um novo Bloco na tentativa de melhoria da topologia pela mudança da função de ativação.

Bloco VI

O Bloco VI possui a configuração idêntica ao do Bloco V, mesma quantidade de neurônios na camada de entrada, mesma quantidade de neurônios na camada de saída (Tabela 4.21) e mesma estratégia para encontrar a quantidade de neurônios na camada intermediária, porém a função de ativação foi a *tansig*. A avaliação do desempenho também se deu através dos valores de R^2 , dos parâmetros de erros (SSE, MSE, RMSE) e os coeficientes linear e angular, usando os dados de teste.

Tabela 4.21: Variação na topologia da rede neural e os resultados para tomada de decisão, Bloco VI.

Neurônios camada intermediária	R^2	SSE	MSE	RMSE	Coefficiente linear	Coefficiente angular
6	0,995	0,310	7,29E-04	2,70E-02	-0,38	0,99
10	0,994	0,202	4,75E-04	2,18E-02	4,2	1,0
14	0,993	0,228	5,36E-04	2,31E-02	14,0	1,0
16	0,996	0,158	3,71E-04	1,92E-02	-1,6	1,0

As simulações do Bloco VI foram as melhores alcançadas. Observou-se que todos os valores R^2 das configurações ultrapassaram valores de 0,99. Os valores dos erros se mantiverem baixos para todos os casos e os coeficientes angulares foram 1, com ressalva do experimento com 6 neurônios na camada intermediária. Os coeficientes lineares reduziram bastante chegando bem próximo de zero, simulação com 6 e com 16 neurônios na camada intermediária. A mudança da função de ativação carregou mudanças expressivas para o modelo neural. Para verificar o desempenho, apresentaram-se os gráficos do erro, de dispersão com 6 neurônios na camada intermediária (uma das melhores situações), representados nas Figuras 4.54 até 4.56 para o treinamento e as Figuras 4.57 e 4.58 para os testes.

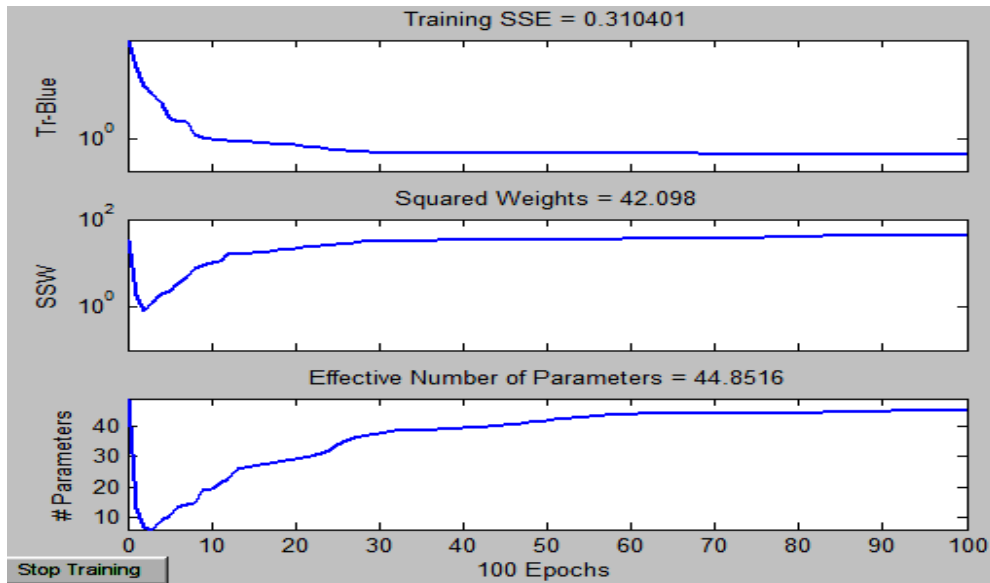


Figura 4.54: Desenvolvimento do erro com 6 neurônios na camada intermediária no treinamento, Bloco VI.

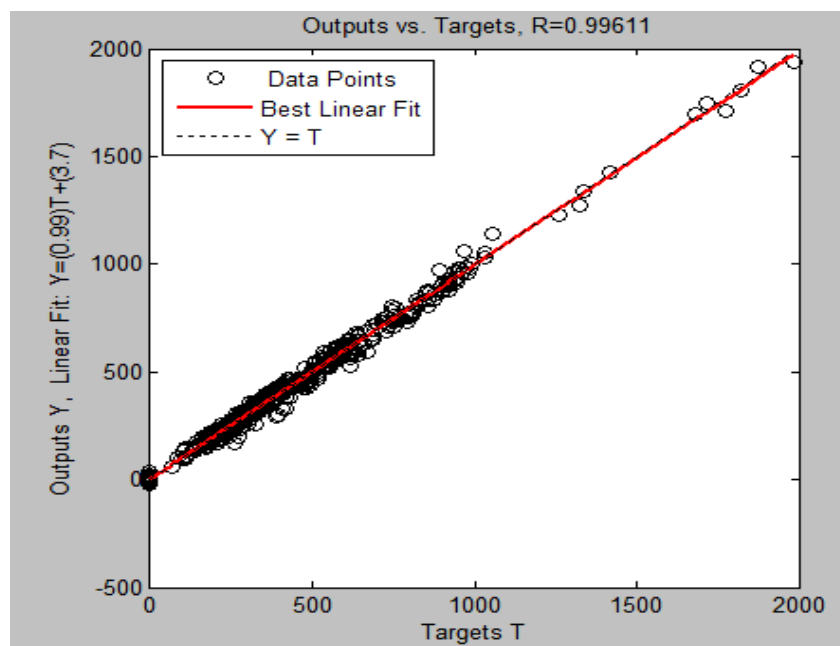


Figura 4.55: Dispersão entre a saída real e a calculada pelo modelo com 6 neurônios na camada intermediária no treinamento, Bloco VI.

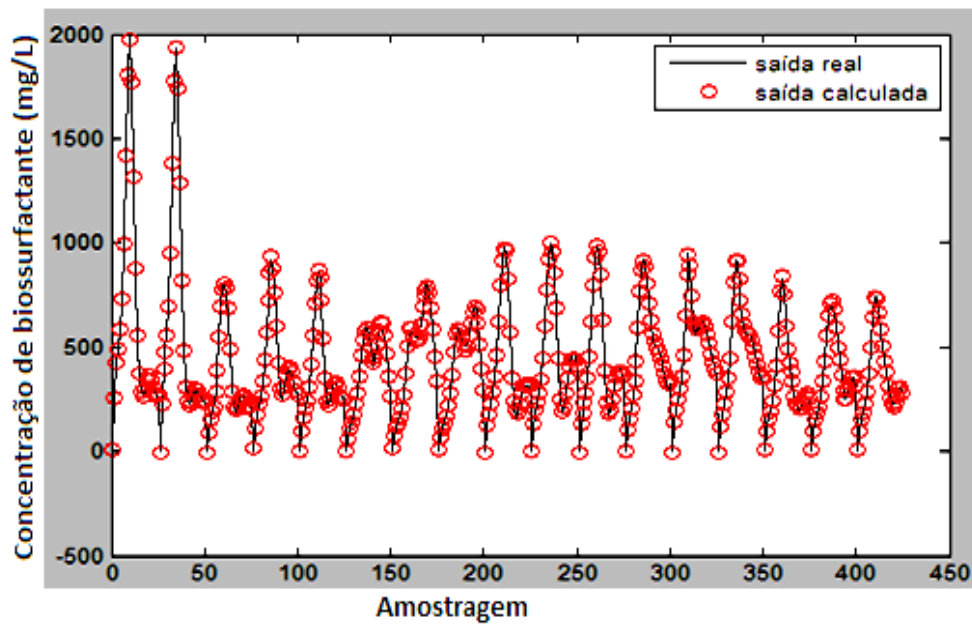


Figura 4.56: Comparação entre a saída real e a calculada pelo modelo com 6 neurônios na camada intermediária do treinamento, Bloco VI.

O gráfico de dispersão (Figura 4.55) entre a saída real e a calculada pelo modelo na simulação com 6 neurônios na camada intermediária também apresentou uma precisão muito boa com um coeficiente de determinação (R^2) do treinamento maior que no teste (0,996), como visto em simulações de treinamentos anteriores.

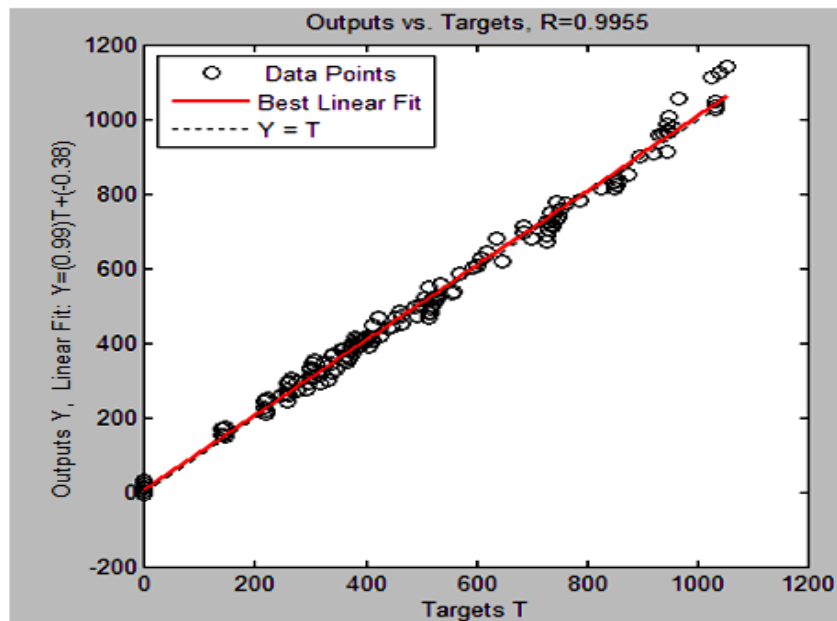


Figura 4.57: Dispersão entre a saída real e a calculada pelo modelo com os dados de teste, Bloco VI.

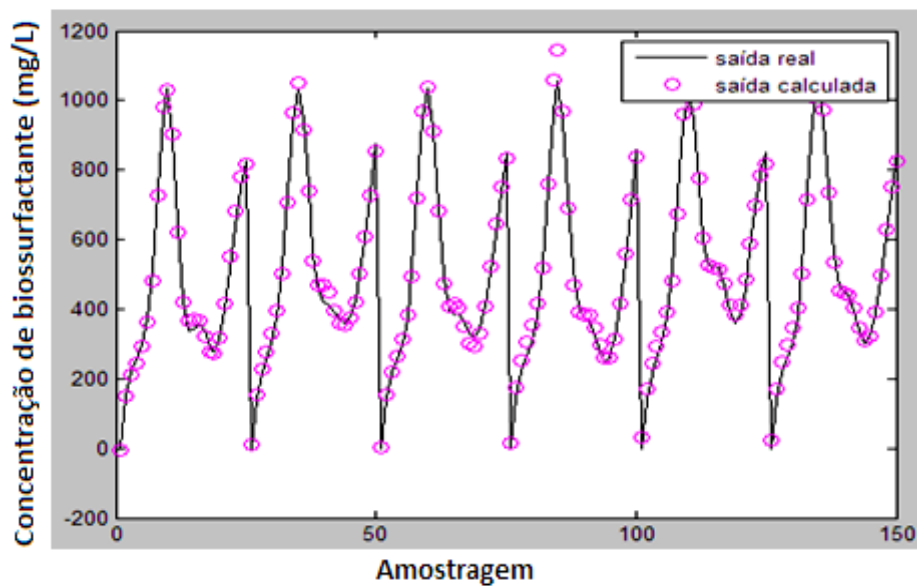


Figura 4.58: Comparação entre a saída real e a calculada pelo modelo com os dados de teste, Bloco IV.

Os dados calculados também tiveram uma boa concordância com os dados experimentais de teste, com $R^2=0,995$. O Bloco VI apresentou respostas mais adequadas em comparação com as simulações anteriores (Bloco I ao V), evidenciado pelos valores de R^2 e a melhora nos coeficientes lineares, principalmente para a situação com 6 e 16

neurônios na camada intermediária. Porém, pode-se selecionar a situação com 6 neurônios na camada intermediária por ser uma simulação mais simples e com menos parâmetros para inserir na planilha do Excel. Assim, esta situação foi usada.

Sivapathasekaran & Sem (2013) desenvolveram um modelo neural para produção de biossurfactante por *Bacillus circulans* em meio de glicose sintética. O estudo foi desenvolvido em um fermentador de bancada de 3,7 L, onde as variáveis monitoradas foram temperatura, agitação, aeração, pH (neurônios de entrada da rede) e concentração de biossurfactante (neurônio de saída). Foram implementadas 2 camadas intermediárias com 25 neurônios ativados pela função *logsig* e *purelin*, respectivamente. Em comparação com este estudo, os autores utilizaram uma quantidade de neurônios na camada intermediária muito maior para atingir valores satisfatórios de desempenho da RNA. Conseguiram um R^2 de 0,995, MSE de $7,6E^{-04}$ e coeficientes linear e angular de $-2,1E^{-03}$ e 0,99. Este desempenho foi bem parecido com o da RNA desenvolvida, embora a topologia deste estudo tenha sido diferente (bem mais simples e com uma quantidade de parâmetros envolvidos bem menor).

Trabalhar com redes neurais abre um leque de possibilidades de combinação de parâmetros. Neste estudo poder-se-ia ainda trabalhar com outras configurações para topologia, mudando, por exemplo, o algoritmo de treinamento e a função de ativação da camada de saída. Mas o objetivo foi atingido com as simulações anteriores, pois obteve-se uma topologia relativamente simples e robusta para construção do *soft sensor*. Na Figura 4.59 é ilustrado desenvolvimento deste estudo, para melhor entendimento.

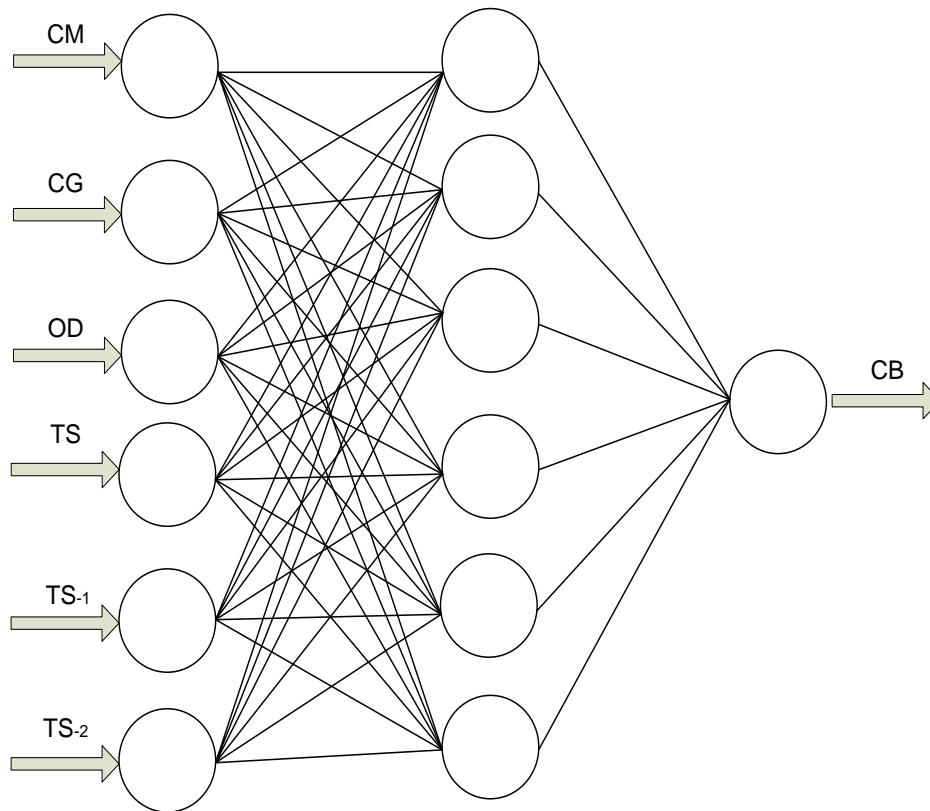


Figura 4.59: Modelo neural de melhor desempenho desenvolvido.

A matriz dos pesos ajustados para camada intermediária para o modelo está abaixo.

0,2058	-0,21	0,6452	-0,1158	1,0384	0,136
0,3169	0,53	-0,7399	-0,4305	1,0717	-0,5011
-0,0806	-0,60	1,0455	0,4906	-0,7077	0,4409
-0,2043	0,03	-1,2201	0,0212	-0,2833	-0,3117
-1,1458	-0,50	0,2763	0,3647	-0,9744	0,4385
1,7732	0,45	-0,5802	-0,5328	0,3838	-1,4105

A matriz dos pesos ajustados para camada final está abaixo.

0,8586	-1,617	-0,9464	2,5174	-1,0887	-0,4097
--------	--------	---------	--------	---------	---------

A matriz dos bias da camada intermediária ajustada está abaixo.

$$\begin{vmatrix} 0,5663 \\ -0,3813 \\ -0,0331 \\ -1,5208 \\ 0,4219 \\ -0,9171 \end{vmatrix}$$

A matriz dos bias da camada final ajustada está abaixo.

$$\begin{vmatrix} 0,8129 \end{vmatrix}$$

O modelo neural desenvolvido pode ser utilizado na predição da concentração do biossurfactante (CB) em uma faixa de operação de 0 a 1987,5 mg/L. As faixas de operação para as variáveis nos neurônios de entradas foram: crescimento microbiano (CM) de 0 a 1,64 Abs; concentração de glicose (CG) de 0 a 6,1 g/L; concentração de oxigênio dissolvido (OD) de 0,021 a 6,2 mg/L; tensão superficial (TS) de 28,32 a 55,06 mN/m; tensão superficial 10x diluída (TS^{-1}) de 28,74 a 70,09 mN/m; e tensão superficial 100x diluída (TS^{-2}) de 32,32 a 75,25 mN/m. O modelo é válido para temperatura de 37°C.

5.5.2 Validação *offline*

Para validar o modelo utilizou-se um conjunto de dados de um novo experimento na condição ótima do planejamento de experimentos (agitação de 200 rpm e aeração de 0,5 vvm) a 37° C no fermentador. Assim, uma situação adversa (Figura 4.60), mas com comportamento parecido com os já alcançados nas bateladas anteriores.

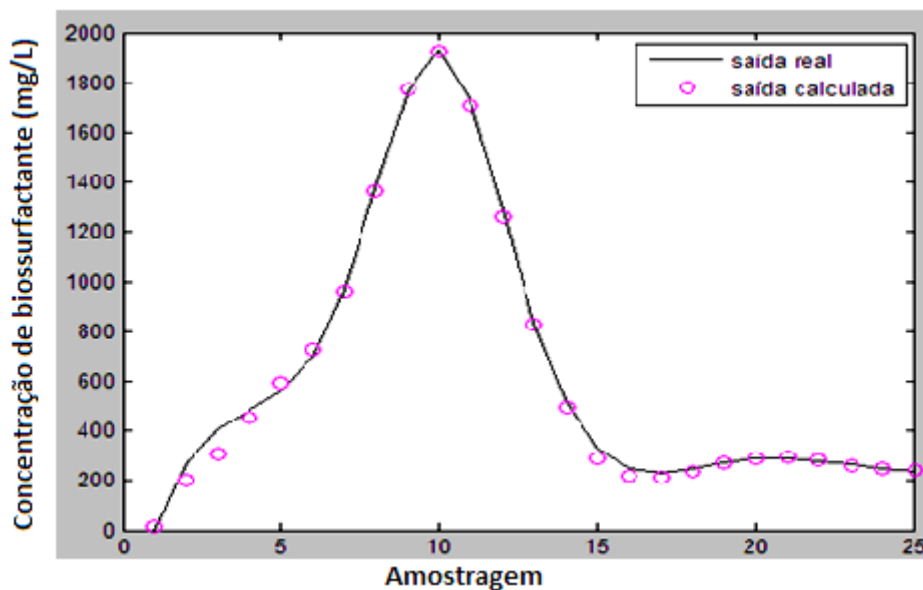


Figura 4.60: Comparação entre a saída real e a calculada pelo modelo na validação offline.

Com esta simulação percebeu-se que o modelo é apropriado para ser utilizado na construção do *soft sensor* para fazer aquisição de dados e conseqüentemente predição para acompanhar a concentração do biossurfactante. Isto representa um passo muito importante no processo, porque as informações que alimentam o modelo neural são mensuradas a cada amostragem e imediatamente pode-se predizer a concentração do biossurfactante.

4.5.3 Experimento com auxílio do *soft sensor*

Com o modelo desenvolvido, a estratégia de funcionamento do *soft sensor* foi montada em uma planilha do Excel. A vantagem de se utilizar este software é que o mesmo é de fácil acesso, apresenta fácil mudança de alguns parâmetros e pode ser utilizado em qualquer computador. Então, o operador precisa fazer a programação na planilha de acordo com o modelo neural desenvolvido, o que permite que a cada instante de atualização das informações na planilha, os cálculos sejam feitos automaticamente, como apresentado na Figura 4.61.

	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA
1												CAMADA INTERMEDIÁRIA		
2	Variáveis	Entrada	Máximo	Mínimo	Normal							Neurônio Soma	Soma+b	tansig
3	ABS	0,1452	1,648057	0	-0,82379						1	0,082134	0,648434	0,570615
4	OD	3,6	6,2	0,021763	0,158336						2	-0,05645	-0,43775	-0,41178
5	TS	37,37	55,06	28,32	-0,32311						3	-0,11397	-0,14707	-0,14602
6	CMD-1	58,49	70,09	28,74	0,438936						4	0,217758	-1,30304	-0,8625
7	CMD-2	62,88	75,25415	32,32	0,423575						5	0,857353	1,279253	0,856286
8	Glicose	5,41	6,133342	0	0,764128						6	-2,35143	-3,26853	-0,99711
9	BC		1987,5	0										
10												CAMADA FINAL		
11			PESOS 1					peso 1				Neurônio Soma	Soma+b	purelin
12	0,2058	-0,21	0,6452	-0,1158	1,0384	0,136		0,5663			1	-1,40103	-0,58813	-0,58813
13	0,3169	0,53	-0,7399	-0,4305	1,0717	-0,5011		-0,3813						
14	-0,0806	-0,60	1,0455	0,4906	-0,7077	0,4409		-0,0331						
15	-0,2043	0,03	-1,2201	0,0212	-0,2833	-0,3117		-1,5208				(Y)CB		
16	-1,1458	-0,50	0,2763	0,3647	-0,9744	0,4385		0,4219				409,2994		
17	1,7732	0,45	-0,5802	-0,5328	0,3838	-1,4105		-0,9171						
18														
19														
20			PESOS 2					Bias 2						
21	0,8586	-1,617	-0,9464	2,5174	-1,0887	-0,4097		0,8129						
22														

Figura 4.61: Funcionamento do *soft sensor*.

Na Figura 4.62 é mostrada a predição do modelo na planilha do Excel, utilizando o *soft sensor*. Observa-se que o modelo conseguiu prever satisfatoriamente os dados experimentais. Isso possibilita uma tomada de decisão mais rápida a cerca do processo ou o desenvolvimento de estratégias mais avançadas no sistema, como a implementação de um controlador que manipule as variáveis para manter a concentração de biossurfactante alta.

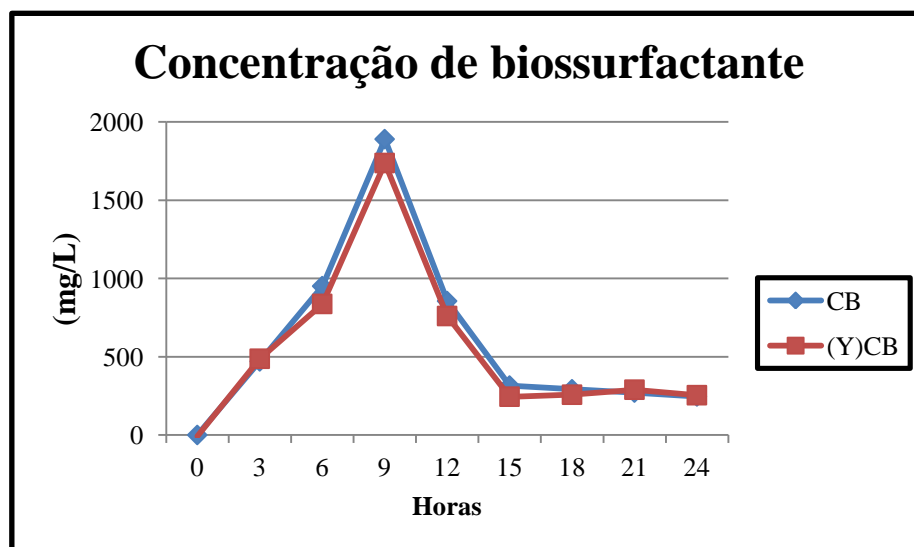


Figura 4.62: Comparação da saída real com a calculada na planilha.

Mesmo com uma boa predição do comportamento da concentração de biossurfactante, o *soft sensor* possui limitações. Isto acontece, porque quanto mais informações forem adicionadas ao modelo (inserção de mais variáveis relevantes ao processo, a exemplo do consumo de frutose ou o consumo de glicerina, ou comportamento em outras faixas) melhor é a robustez do modelo. Mas para estudos preliminares de um processo do qual a metodologia é nova e possui muitos desafios, pode-se classificar como pertinente o uso do *soft sensor*.

4.5.4 Testes de aplicação com biossurfactante produzido

O biossurfactante produzido no ponto ótimo foi testado quanto à formação de emulsão estável em 24h (E_{24}) com os solventes óleo diesel, gasolina, óleo de soja, heptano e hexano (Tabela 4.22 e Figura 4.63).

Tabela 4.22: Índice de Emulsificação (E_{24}) para solventes orgânicos.

Número da amostra	Solvente	E_{24} (%)
1	Óleo diesel	32,5±2,5
2	Gasolina	41,6±2,8
3	Óleo de soja	0,0
4	Heptano	56,4±1,4
5	Hexano	37,8±2,1

Para todas as condições foi testada também o com o meio de cultivo sem ter sido fermentado (chamado de branco), onde os mesmos obtiveram valor zero de emulsão formada (Figura 4.63). Quase todos os ensaios apresentaram emulsão no meio, com exceção do número 3, contendo óleo de soja. O demais apresentaram E_{24} superiores a 30 % e o ensaio número 4 apresentou o maior valor 56,4±1,4 %.

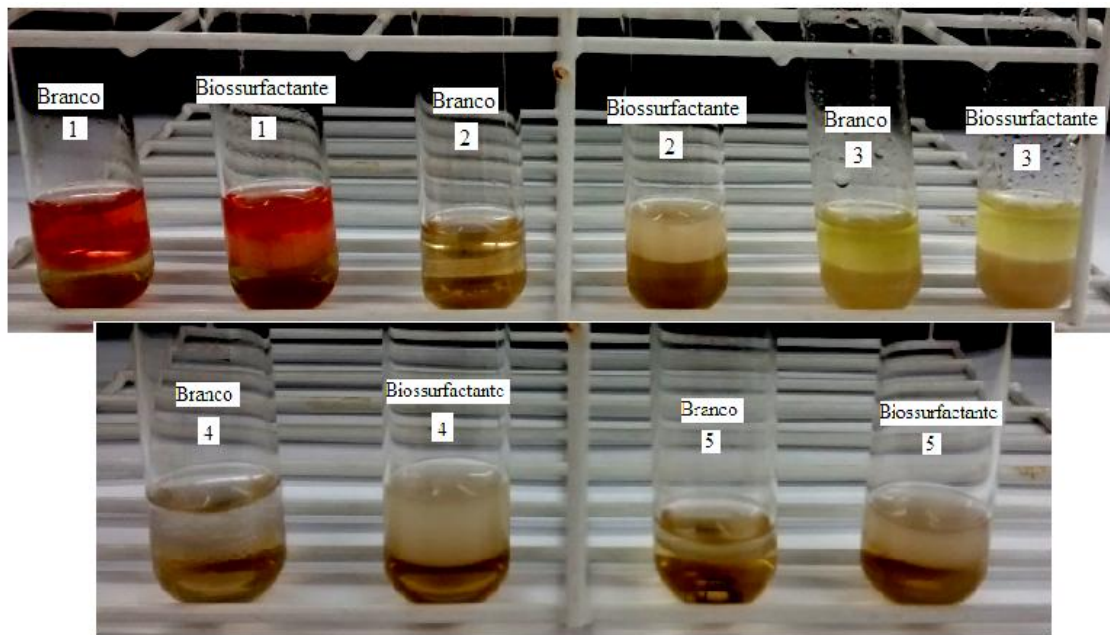


Figura 4.63 : Atividade de índice de emulsificação (E_{24}) com solventes orgânicos.

Para os experimentos de dispersão de petróleo, formou-se uma fina camada de do mesmo sobre a água nas placas de petri, para serem aplicados os meios de fermentação sem e com o biossurfactante (Figura 4.64).

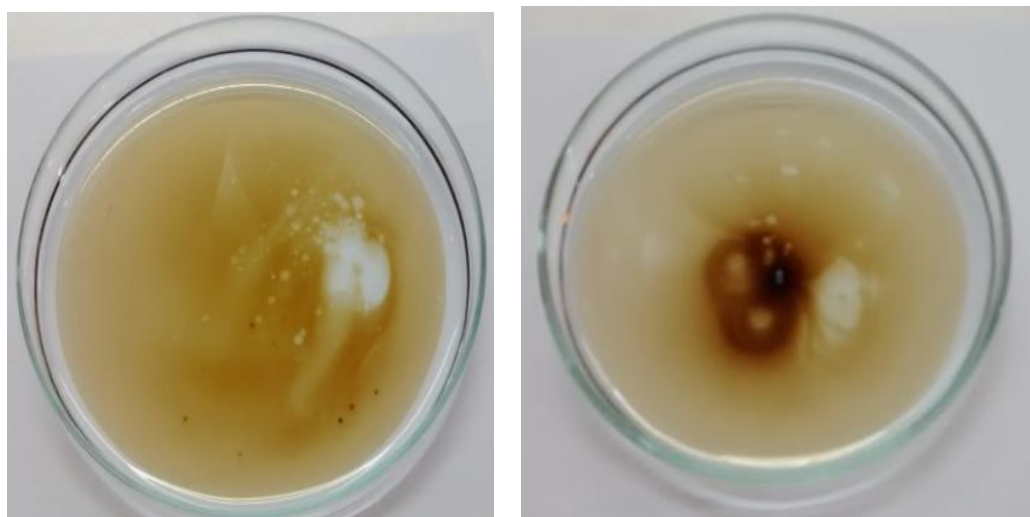


Figura 4.64: Filme de petróleo formado sobre água.

Posteriormente, gotejou-se 50 μ L das soluções contendo o meio sem fermentar (branco) e meio com biossurfactante. Verificou-se a dispersão do petróleo em água, com a formação do halo no óleo (Figura 4.65).

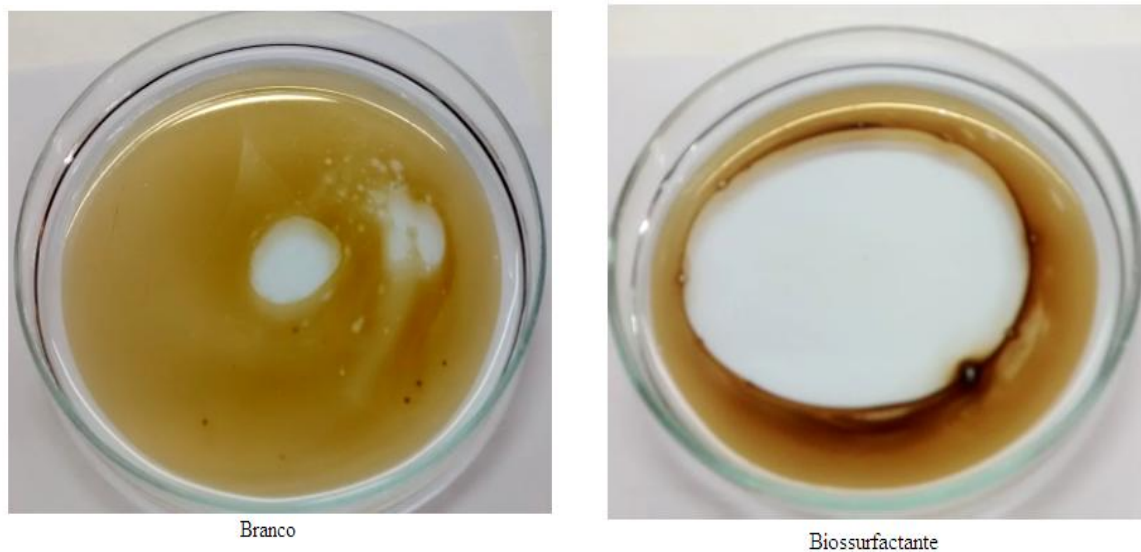


Figura 4.65: Formação do halo de dispersão de petróleo em água.

Acredita-se com esses experimentos que o biossurfactante formado pode ser aplicado em interações com os solventes orgânicos em que formou emulsão estável, como também pode ser indicado para o remediação em caso de vazamento de petróleo em mar.

Muitas aplicações ainda podem ser testadas com o biossurfactante produzido, agregando ainda mais valor ao produto advindo a partir de fermentação em resíduos.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo visou desenvolver uma estratégia para monitorar a concentração de biosurfactante em um meio alternativo de fermentação com a utilização de *Bacillus subtilis*. Conseguiu-se desenvolver uma metodologia que pudesse apresentar produção de biosurfactante com meio de fermentação à base de resíduos (glicerina residual, casca de beterraba) em frascos Erlenmeyers de 500 mL. O Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) identificou a produção de biosurfactante no meio proposto a partir das respostas de E_{24} (com uso de tolueno) com mais de 60 % e CB superior a 500 mg/L na matriz do planejamento. O modelo estatístico foi validado pela análise de variância (ANOVA) e identificou-se os pontos ótimos analisando o gráfico de superfície de resposta e curvas de contorno em 6% de glicerina e 7,5% de casca de beterraba (v/v). Conseguir tais resultados representa que os resíduos são apropriados ao estudo da fermentação e que tem um grande potencial na produção de biosurfactante

Foi proposto um aumento de escala para otimizar as condições de funcionamento em um fermentador de 7L em condições controladas, a partir dos resultados obtidos no planejamento em Erlenmeyers para direcionar composição do meio de fermentação. Assim, desenvolveu-se uma metodologia auxiliada por um DCCR, avaliando faixas de agitação e aeração no meio, tendo como resposta concentração de biosurfactante (CB) e a redução da tensão superficial (RT). Nas faixas estudadas, observou-se concentração de biosurfactante de mais de 1900mg/L e mais de 45% de redução da tensão superficial. Esses resultados foram alcançados pela mudança de concentração de oxigênio dissolvido no meio promovidos pela combinação de 200 rpm de agitação e 0,5 vvm de aeração, valores ótimos alcançados com a análise dos gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno.

Os perfis de crescimento microbiano (CM), concentração de glicose (CG), concentração de oxigênio dissolvido (OD), tensão superficial (TS), tensão superficial 10x diluída (TS^{-1}) e tensão superficial 100x diluída (TS^{-2}) foram avaliados durante as

bateladas nos ensaios dos planejamentos do fermentador e classificados com potencial para formação da biblioteca de dados para construção do modelo neural.

As modelagens desenvolvidas com redes neurais mostraram que foi necessário alimentar o máximo de informações na camada de entrada para obtenção de modelo satisfatório. Com as simulações, pôde-se chegar em um modelo capaz de prever o funcionamento da batelada em amostragem, onde o R^2 foi de 0,995, os valores de SSE, MSE e RMSE foram baixos e os coeficientes lineares e angulares foram próximo de 0 e 1 respectivamente. Isto possibilita monitorar as bateladas em tempo real da concentração de biossurfactante, possibilitando a tomada de decisão antecipada ao resultado da variável experimentalmente. O modelo neural transposto na planilha do Excel teve bons resultados de predição para um novo experimento dentro das condições estabelecidas do sistema, classificando a como um sensor virtual para monitoramento da fermentação em 24h.

Os resultados de aplicação evidenciou que o biossurfactante produzido tem propriedade emulsificante em óleo diesel, gasolina, heptano e hexano. E potencial de remediação de petróleo através da simulação de contaminação em água.

6. SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

O desenvolvimento deste trabalho possibilita muitas opções para desenvolvimento de outros estudos. O potencial de investigação permeia todas as etapas da tese desenvolvida. Como sugestões têm-se:

- Estudar no planejamento experimental para determinação do meio de cultivo em Erlenmeyers outras faixas, principalmente no deslocamento para maior quantidade de casca de beterraba (valores maiores que 7,5% v/v).
- Identificar a atividade enzimática envolvida no processo para, por exemplo, inversão da sacarose.
- No fermentador de 7 L, estudar outros planejamentos experimentais com relação as variáveis independentes, variando faixas de temperaturas e pH.
- Desenvolver estudo cinético a partir dos balanços de massa no fermentador para biomassa, substrato e produto. Calculando velocidades instantâneas, velocidade específica de reprodução do microrganismo, K_{La} e outras.
- Desenvolver modelo neural que possa ser aplicado à outros lotes a partir da inserção dos componentes estudados na caracterização como neurônios de entrada (Concentração de sacarose, cálcio, ferro e fósforo).
- Automatizar o fermentador a fim de que a predição da concentração de biossurfactante também seja automática.
- Estudar outras aplicações do biossurfactante produzido, como atividade antimicrobiana, antiviral, remediação por contaminação de metais pesados e outras.

7. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, C.D.C.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; FILETI, A.M.F. On-line Biomass Estimation in Biosurfactant Production Process by *Candida lipolytica* UCP 988. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 35, p.1425-1433, 2008.

ARIMA, K; KAKINUMA, A.; Surfactin, a Crystalline Peptide Lipid Surfactant Produced by *Bacillus subtilis*; Isolation, Characterization and its Inhibition of Fibrin Clot Formation. **Biochemical and Biophysical Research communication**.v.31, p. 488-494, 1968.

BARROS, F.F.C. Estudo das Variáveis de Processo e Ampliação da Escala na Produção de Biosurfactante por *Bacillus subtilis* em Manipueira. Dissertação de Mestrado-**Universidade Estadual de Campinas**, 2007.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; MARÓSTICA JR, M. R.; PASTORE, G. M. Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações. **Quím. Nova**. v.30, p.409-414, 2007.

BEGA, E.A.; DELMÉE, G. J.; COHN, P.E.; BULGARELLI, R.; KOCH, R.; FINKEL, V. S. Instrumentação Industrial. Ed. 2, Rio de Janeiro: **Interciência:IBP**, 2006.

BRAGA, A. P.; CARVALHO, A. P.L.F.; LUDEMIR, T. B.; Redes Neurais Artificiais. Ed. 2, Rio de Janeiro: LTC, 2007.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-Active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**. v.53, p. 224-229, 1987.

COSTA, G. A. N. Produção Biotecnológica de Surfactante de *Bacillus subtilis* em Resíduo Agroindustrial, Caracterização e Aplicações. Dissertação de Mestrado-**Universidade Estadual de Campinas**, 2005.

DESAI, I. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbial and Molecular Biology: Reviews**. v. 61, p. 47-64, 1997.

DÉZIEL, E.; LEPINE, F.; DENNIE, D.; BOISMENU, D.; MAMER, O.; VILLEMUR, R. Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Mixtures of Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Strain 57RP Grown on Mannitol or Naphthalene. **Biochimica et Biophysica Acta**. p. 244-252, 1999.

DHANARAJAN, G.; MANDAL, M.; SEN, R. A combined artificial neural network modeling-particle swarm optimization strategy for improve production of marine bacterial lipopeptide from food waste. **Biochemical Engineering Journal**. v. 84, p. 59-65, 2014.

DYE, C. W.; FRYDENBORG, R. B. Oil dispersants and the environmental consequences of their usages: a literature review. **Florida Department of Environmental Regulation Technical Series**. v.5, 1980.

FARIA, A. F. Produção, Purificação e Caracterização Química de Biossurfactantes Produzidos por *Bacillus subtilis* em Glicerina Residual. Tese de Doutorado- **Universidade Estadual de Campinas**, 2010.

FERREIRA, T. P.; BRAGA, C.M.P.; SEIXAS FILHO, C. Sensores Virtuais -Soft Sensores. **In tech** 123. 2010.

FONTES, G. C.; AMARAL, P. F. F.; COELHO, M. A. Z. Produção de biossurfactante por levedura. **Quim. Nova**. v. 31, p. 2091-2099, 2008.

FORTUNA, L.; GRAZIANI, S.; RIZZO, A., XIBILIA, M. Soft Sensors for Monitoring and Control of Industrial **Process**. **Advances in Industrial Control**. Springer. Ed 1^a, 2006.

GUADIÑA, E. J.; RODRIGUES, A. I.; DOMINGUES, M. R.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Bioconversion of agro-industrial by-products in Rhaminolipids toward application in enhanced oil recovery and bioremediation. **Bioresource Technology**. v. 117, p. 87-93, 2015.

HOLMBERG, K. Natural Surfactants. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**. v.6, p. 148-159, 2001.

HOMMEL, K.; STUWER, O.; STUBER, W.; HAFERBURG, D.; KLEBER, H. Production of water-soluble surface-active exolipids by *Torulopsis apicola*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.26, p. 199-205, 1987.

HONÓRIO, G. M. Estudos de Biossurfactantes Produzidos por Leveduras Isoladas de Solo. Dissertação de Mestrado- **Universidade Estadual de Campinas**, 2003.

JACOBUCCI, D.F.C. Estudo da Influência de Biossurfactantes na Biorremediação de Efluentes Oleosos. Dissertação de Mestrado- **Universidade Estadual de Campinas**, 2000.

JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; JHA, S.; YADAV, S.; NERURKAR, A.; DESAI, A. Biosurfactant Production Using Molasses and Whey under Thermophilic Conditions. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 195-199, 2007.

KARANTH, N. G. K.; DEO, P. G.; VEENANADIG, N. K. Microbial Production of Biosurfactant and Their Importance. **Current Science**. v.77, p.116-126, 1999.

KEELER, J.D., FERGUSON, R. B. Commercial Applications of Soft Sensors: The Virtual On-Line Analyzer and the Software CEM. **Pavilion Technologies, Inc. International Forum for Process Analytical Chemistry (IFPAC) Conference**, 1996.

KIM, K.; JUNG, S., LEE, D.; JUNG, J. K., PARK, J.; KIM, D.; LEE, C. H. Suppression of Inflammatory Responses by Surfactin, a Selective Inhibitor of Platelet Cytosolic Phospholipase A2. **Biochemical Pharmacology**. v.55, p.975-985, 1998.

KIM, S.; KIM, J.; KIM, S.; BAE, H. J.; YI, H.; YOON, S. Surfactin from *Bacillus subtilis* Displays Anti-proliferative Effect Via Apoptosis Induction, Cell Cycle arrest and Survival Signaling Suppression. **FEBS Letters**. p.865-871, 2007.

KIRAN, G.S.; ANTO-THOMAS, T.; SELVIN, J.; SABARATHNAM, B.; LIPTON, A.P. Optimization and Characterization of a New Lipopeptide Biosurfactant Produced by Marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in Solid State Culture. **Biosource Technology**. v.101, p.2389-2396, 2010.

KHANNA, R.C. Long-Term Environmental Impact of Oil Spills. **Spill Science and Technology Bulletin**. v.7, n 1-2, p. 53-61, 2002.

KRONEMBERGER, F.A. SANTA ANNA, L.M.M., FERNANDES, A.C.L.B.; MENEZES, R.R., BORGES, C.P., FREIRE, D.M.G. Oxygen-Controlled Biosurfactant Production in a Bench Scale **Bioreactor**. **Appl Biochem Biotechnol**. v.147, p.33-45, 2008.

MAIER, R. Biosurfactants: Evolution and Diversity in Bacteria. **Advances in Applied Microbiology**. v.52, p.101-116, 2003.

MANO, M. C. R. Estudo da recuperação concentração e purificação de biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis*. Dissertação de Mestrado- **Universidade Estadual de Campinas**, 2008.

MANCHOLA, A.; DUSSÁN, J. *Lysinibacillus sphaericus* and *Geobacillus sp* biodegradation of petroleum hydrocarbons and biosurfactant production. **Remediation Journal**. v. 25, p. 85-100, 2014.

MATSUURA, A. B. J. Produção e Caracterização de Biossurfactantes Visando a Aplicação Industrial e em Processos de Biorremediação. Tese de Doutorado-**Universidade Estadual de Campinas**, 2004.

MULLER, J. L.; PROTTI, K. L.; MACHADO, M. S.; LACERDA, L. L. V.; BRESOLIN, T. M. B.; PODLECH, P. S. Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo *airlift* e *shaker*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 27, p. 688-693, 2007.

MUTALIK, S. R.; VAIDYA, B. K.; JOSHI, R. M.; DESAI, K. M.; NENE, S. N. Use of response surface optimization for the production of biosurfactant from *Rhodococcus* spp. MTCC 2574. **Bioresource Technology.** v. 81, p. 127-132, 3013.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and Properties of a Surfactant Obtained from *Bacillus subtilis* Grown on Cassava Wastewater. **Bioresource Technology.** v.97, p.336-341, 2005.

PEREIRA, J. F. B.; GUDIÑA, E. J.; COSTA, R.; VITORINO, R.; TEIXEIRA, J. A.; COUTINHO, A. P.; RODRIGUES, L. R. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. **Fuel.** v. 111, p.259-268, 2013.

PREVIDELLO, B.A.F; CARVALHO, F.R.; TESSARO, A.L.; SOUZA, V.R.; HIOKA, N. The pKa of acid-base indicators and the influence of colloidal systems. **Quím. Nova.** v.29, p.600-606, 2006.

RAHMAN, K.S.M.; RAHMAN, T.; McCLEAN, S.; MARCHANT, R.;BANAT, I. Rhamnolipid Biosurfactant Production by Stains of *Pseudomonas aeruginosa* Using Low-Cost Raw Materials. **Biotechnol. Prog.** v. 18, p. 1277-1281, 2002.

RODRIGUES, L.R.; TEXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R. Low-Cost Fermentative Medium for Biosurfactant Production by Probiotic Bacteria. **Biochemical Engineering Journal.** v. 32, p.135-142, 2006.

RODRIGUES, M. V.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. -2ª Ed.- Campinas, SP. **Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor**, 2009.

RODRÍGUEZ, N.; SALGADO, J.M.; CORTÉS, S.; DOMÍNGUEZ, J. M. Alternatives for Biosurfactants and Bacteriocins Extraction from *Lactococcus lactis* Cultures Produced Under Different pH Conditions. **Applied Microbiology.** v.51, p.226-233, 2010.

SADOUK, Z.; HANCENE, H.; TAZEROUTI, A. Biosurfactants Production From Low Cost Substrate and Degradation of Diesel Oil by a *Rhodococcus* strain. **Oil e Gas Science and Technology**. v.63, n.6, p. 747-753, 2008.

SANTOS, B.F.; FERRAZ, C.; SOUZA, R.R. Produção de Biosurfactante Utilizando Resíduos Sem Valor Comercial. **Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ**, 2010.

SANTOS, B.F.; LEITE, M.S.; SILVA, F.V.; FILETI, A.M.F. Neural network model predictive control of a styrene polymerization plant: online testing using an electronic worksheet. **Chemical Papers**. v. 66, p.654-663, 2012.

SCHMIDELL, W.; BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**. Ed. Blucher, v. 2, São Paulo, 2001.

SEYDLOVÁ, G.; SVOBODOVÁ, J. Review of Surfactin Chemical Properties and the Potential Biomedical Applications. *Cent. Eur. J. Med.* v.3, p. 123-133, 2008.

SILVA, P.R., Transporte Marítimo de Petróleo e Derivados na Costa Brasileira; Estrutura e Implicações Ambientais. Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, 2004.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential Applications of Microbial Surfactants in Biomedical Sciences. **Trends in Biotechnology**. v.22, p.142-146, 2004.

SIVAPATHASEKARAN, C.; SEN, R. Performance evaluation of an ANN-GA aided experimental modeling and optimization procedure for enhanced synthesis of marine biosurfactant in a stirred tank reactor. **J Chem Technol Biotechnol (JCTB)**. v. 88, p.794-799, 2013.

VAR DER VEGT, W.; VAN DER MEI, H. P.; NOORDMANS, J.; BUSSCHER, H.J. Assessment of Bacterial Biosurfactant Production Through axisymmetric Drop Shape Analysis by Profile. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 35, p. 766-770, 1991.

VOSS, G. B. Produção de *Bacillus subtilis* em biorreatores *airlift* e sua aplicação no controle de nematoide de galhas de tomateiros. Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal de Santa Catarina**, 2013.

WEI, Y.; WANG, L.; CHANG, J.; KUNG, S. Identification of Induced Acidification in Iron-Enriched Cultures of *Bacillus subtilis* During Biosurfactant Fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.96, n 2, p. 174-178, 2003.

YOUSSEF, N.; SIMPSON, D. R.; MCLNERNEY, M. J.; DUNCAN, K. E. *In situ* lipopeptide biosurfactant production by *Bacillus* stains correlates with improved oil recovery in two oil wells approaching their economic limit of production. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 81, p. 127-132, 2013.

8. APÊNDICE

Script de programação para desenvolvimento do modelo neural no MATLAB.

Treino

```

clear all; clc; %limpa as variáveis do histórico e limpa o prompt%
M = load('treina22.dat'); %carrega o arquivo de dados%
M = M'; %calcula a matriz transposta%
entrada = M(1:3,:); %define os dados de entrada da rede%
saida = M(4,:); %define os dados de saída da rede%
[entradan,minentrada,maxentrada,saidan,minsaida,maxsaida]=premnmx(entrada,saida);
%define os parâmetros máximos e mínimos das matrizes de entrada e saída e faz
normalização%
net.numinputs = size(entrada(:,:),3); %n° variáveis de entrada%
net.numlayers = 2; %n° de camadas sem a camada de entrada%
net = newff(minmax(entradan(:,:)),[3,1],{'tansig','purelin'},'trainbr');
%cria a rede, definindo número de neurônios e função de ativação das camadas
intermediária e de saída%
net = init(net);
[net,tr] = train(net,entradan(:,:),saidan(:,:)); %realiza o treinamento da rede%
%pesos e bias da rede determinados e guardados em 'net'%
Y = sim(net,entradan(:,:)); %simula com os dados de entrada do
X = postmnmx(Y,minsaida,maxsaida); %desnormaliza dados de saída%
figure(1);
[m,b,r]=postreg(X(1,:),saida(1,:)); %gráfico da saída real versus calculada%
figure(2);
plot(saida(1,:),'-k') %grafica a saída real do arquivo de
%treinamento%
hold on
plot(X(1,:),'or'); %grafica a saída calculada pela rede%
xlabel('tempo (s)','FontSize',15); %rótulo eixo x, fonte tamanho
%20%
ylabel('Tk (°C)','FontSize',15); %rótulo eixo y, fonte tamanho 20%
legend('saída real','saída calculada',1); %legenda no canto superior direito%
hold off
save 'rna15' net; %salva a rede criada%

```

TESTE

```

load rna15; %carrega a rede gravada
M = load('treina22.dat'); %carrega arquivo de dados para
%treinamento, para pegar a mesma normalização no treinamento e no teste%
M = M'; %transposta%
intre = M(1:3,:); %dados de entrada da rede%
outtre = M(4,:); %dados de saída da rede%
[intren,minintre,maxintre,outtren,minouttre,maxouttre]=premnmx(intre,outtre);
%normaliza dados%
N = load('teste22.dat'); %carrega arquivo de dados para teste%
N = N';
in = N(1:3,:); %dados de entrada da rede%
out = N(4,:); %dados de saída da rede%
[inn] = tramnmx(in,minintre,maxintre); %normaliza dados%
Y = sim(net,inn(:,:)); %simula com os dados de entrada do arquivo
%de teste%
w = postmnmx(Y,minouttre,maxouttre); %desnormaliza dados de saída%
figure(3);
plot(out(1,:),'-k') %grafica a saída real do arquivo de teste%
hold on
plot(w(1,:),'om'); %grafica a saída calculada pela rede%
xlabel('tempo(s)', 'FontSize',15); %rótulo eixo x, fonte tamanho
%20%
ylabel('Tk (°C)', 'FontSize',15); %rótulo eixo y, fonte tamanho 20%
legend('saída real','saída calculada',1); %legenda no canto superior direito%
colordef white;
hold off
figure(4);
[m,b,r]=postreg(w(1,:),out(1,:)); %grafico da saída real versus calculada%
xlabel('Tempo', 'FontSize',20); %rótulo eixo x, fonte tamanho 20%
ylabel('A', 'FontSize',20); %rótulo eixo y, fonte tamanho 20%
whitebg([1 1 1]);
colordef white;
net.IW{1}
net.LW{2}
net.b{1}
net.b{2}

```