

ROGÉRIO ANTONIO STRAPASSON

**OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS DO BIOPROCESSO DE
FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO PARA PRODUÇÃO DE
ÁCIDO FUMÁRICO A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS,
UTILIZANDO REDES NEURAIS**

**Tese apresentada ao Departamento de Tecnologia Química do
Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor
em Processos Biotecnológicos.**

Orientador: Professor Dr. Carlos Itsuo Yamamoto.

Co-orientadores: Professor Dr. Carlos Ricardo Soccol

Professora Dra. Adenise Lorenci
Woiciechowski

CURITIBA

2003

ROGÉRIO ANTONIO STRAPASSON

OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS DO BIOPROCESSO DE FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO FUMÁRICO A PARTIR DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS, UTILIZANDO REDES NEURAIS.

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Doutorado em Processos Biotecnológicos do Departamento de Tecnologia Química da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada Pelos Professores:

Orientador:

Professor Dr. Carlos Itsuo Yamamoto

Co-orientadores:

Professora Dra Adenise Lorenci Woiciechowski

Professor Dr. Carlos Ricardo Soccol.

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar.

A meus pais Lauro (*in memoriam*) e Olívia.

Aos professores Gisela Maria Zanin, Júlio Cesar Nievola e Luiz Augusto da Cruz Meleiro, por terem aceitado julgar este trabalho.

Aos colegas do curso e aos professores Adenise, Carlos Soccol, Carlos Yamamoto e Luciana pela ajuda durante o trabalho.

À colega Mityio pelo apoio no laboratório. Às colegas Eliane Stroparo e Elvirina.

Aos colegas do laboratório de processos Biotecnológicos: Adriane, Ana, Andréia, Bruno, Cássima, Cléo, Juliana, Cristiane, Cristina, Denise, Fan, Fernando, Flávera, Giovana, Jayme, Júlio, Letícia, Luís Rômulo, Malu, Maria Rosa, Nádia, Raquel, Rodrigo, Rosália, Saul, Sandro, Thalita e Tiago.

À colega Débora pela ajuda decisiva na obtenção da cepa de *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582.

Ao Dr Kerry O'Donnell do Agricultural Research Service Culture Collection pela doação da cepa citada.

Aos meus irmãos Reinaldo e José Lauro pela ajuda e amizade.

Aos meus amigos Thiago e Lílian pela ajuda na utilização do programa de redes neurais.

À minha amiga Simone pelo apoio e dedicação total e incondicional durante todo o tempo.

Aos professores Carlos Cunha, Fábio, Orlinei, Stella e Sueli pela utilização do laboratório de química inorgânica para realização de parte dos trabalhos práticos.

RESUMO

A fermentação no estado sólido é conhecida há séculos, havendo referências que os egípcios já a utilizavam na produção de pão. O bagaço de mandioca é um resíduo lignocelulósico rico em amido, possuindo ainda 60-70% de amido residual, que não é extraído no processamento industrial das raízes da mandioca. Toneladas deste resíduo são depositadas diariamente no meio ambiente. O resíduo sólido pode ser utilizado como única fonte de carbono para produção de ácido fumárico por Fermentação no Estado Sólido (FES). Esta produção foi amplamente estudada com organismos da ordem *Mucorales*, principalmente do gênero *Rhizopus*. Ao bagaço de mandioca moído, foram adicionados fonte de nitrogênio e outros sais, para complemento nutricional. As variáveis, temperatura, taxa de inoculação, pH, umidade e tempo de fermentação, foram otimizadas. O propósito deste trabalho foi otimizar e avaliar a produção de ácido fumárico com auxílio das redes neurais, bem como a verificação da viabilidade de utilização de redes neurais para simular o processo.

Uma rede *feedforward* com três neurônios e outra com quatro na camada oculta foram as que melhor reproduziram os dados obtidos em laboratório. Foram feitos dois ensaios variando-se apenas o tempo de fermentação, denominados ensaios 4 e 5, com as melhores condições determinadas pelas redes neurais e seus resultados foram comparados com as precisões das redes neurais artificiais, com boa concordância de valores.

Durante as fermentações ocorreu consumo de água e foi necessário fazer uma fermentação com 11,4% de água livre para minimizar o problema. Quando o problema de consumo de água durante a fermentação foi compensado, a produção de ácido fumárico foi elevada para mais de 100 g/kg de bagaço seco.

ABSTRACT

The solid state fermentation is known by centuries, there were references that the Egyptians already utilized it to make bread. Cassava bagasse is a lignocellulosic waste rich on starch, still possessing 60-70% of residual starch, which not is extracted on the Processing of the cassava roots. Tons of this residue is disposed daily at the environment. This solid residue can be used as the sole source of carbon to produce fumaric acid by solid state fermentation (SSF). This production is largely studied to the organisms of the order Mucorales, mainly to the genus Rhizopus. Cassava waste was milled, added nitrogen source and others salts for nutritional complement. The variables, temperature, rate of inoculation, pH, humidity, and time of fermentation were optimized. The proposal of this work was to optimize and to evaluate the production of fumaric acid, using neural networks, as well the verification of the use viability of the neural networks to process simulation.

A feedforward network with three and other with four neurons in the hidden layer was the best reproducers of the data obtained in laboratory. It was made two experiments varying only the time of fermentation, named experiments 4 and 5, with the best conditions determined by neural networks and its results are compared with the networks precision, with good agreement of values.

During the fermentations of the best conditions occurred a consumption of water and it was necessary to do one fermentation with 11.4% of free water to minimize that problem. When the problem of consumption of water was solved the production of fumaric acid was elevated to more then 100 g/kg of dry cassava bagasse.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO	3
2.1.1 <i>Natureza do substrato</i>	5
2.1.2 <i>Umidade, atividade de água (aw) e temperatura</i>	6
2.1.3 <i>pH</i>	10
2.1.4 <i>Aplicações da fermentação no estado sólido</i>	10
2.1.5 <i>Desenvolvimento micelial</i>	12
2.2 MANDIOCA	13
2.2.1 <i>Industrialização da mandioca</i>	15
2.2.2 <i>Industrialização da mandioca no Brasil</i>	18
2.3 MICRORGANISMOS	20
2.4 FUNGOS	20
2.4.1 <i>Rhizopus</i>	21
2.5 ÁCIDO FUMÁRICO	23
2.5.1 <i>Processos de Obtenção</i>	25
2.5.2 <i>Aplicações e usos industriais</i>	29
3 REDES NEURAIS	31
3.1 HISTÓRICO DAS REDES NEURAIS E INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL	31
3.2 TEORIA DAS REDES NEURAIS	36
3.3 EQUAÇÕES	40
3.3.1 <i>Funções de ativação</i>	40
3.3.2 <i>Ajuste dos pesos sinápticos através da retro-propagação do erro</i>	45
3.4 CONJUNTO DE DADOS	47
3.4.1 <i>Treinamento e testes</i>	48
3.5 APLICAÇÕES DAS REDES NEURAIS EM BIOTECNOLOGIA	49
4 MATERIAIS E MÉTODOS	54
4.1 ESCOLHA DA CEPA MAIOR PRODUTORA DE ÁCIDO FUMÁRICO	54
4.1.1 <i>Conservação das cepas</i>	55
4.1.2 <i>Preparo do inóculo</i>	56
4.1.3 <i>Substrato</i>	56
4.1.4 <i>Condições de cultivo</i>	57
4.2 OTIMIZAÇÃO COM REDES NEURAIS	57
4.2.1 <i>Meio empregado para otimização do processo utilizando redes neurais</i>	57
4.2.2 <i>Otimização das condições de cultivo com as redes neurais</i>	58
4.2.3 <i>Estudos variando o tempo de fermentação (ensaios 4 e 5)</i>	59
4.2.4 <i>Metodologia utilizada nas otimizações</i>	59
4.3 ANÁLISE DOS FERMENTADOS	62
4.3.1 <i>Análise de açúcares</i>	62
4.3.2 <i>Análise de ácido fumárico</i>	63
4.3.3 <i>Análise do crescimento micelial</i>	65
4.4 FERMENTAÇÃO EM COLUNAS	66
4.4.1 <i>Respirometria</i>	67
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1 SELEÇÃO DA MELHOR CEPA PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO FUMÁRICO	70
5.2 REDES ESCOLHIDAS	71
5.3 RESULTADOS DA OTIMIZAÇÃO COM AS REDES NEURAIS DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO	79
5.3.1 <i>Outras redes testadas</i>	84
5.4 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS	85
5.4.1 <i>Produção de ácido fumárico</i>	85
5.4.2 <i>Precisão dos resultados obtidos pelas redes neurais</i>	86
5.4.3 <i>Comparação das condições de cultura na fermentação do bagaço de mandioca por fermentação no estado sólido</i>	86
5.5 FERMENTAÇÃO EM COLUNAS DE RAIMBAULT E TESTES RESPIRO-MÉTRICOS DE FERMENTAÇÃO	92
6 CONCLUSÃO	98

LISTA DE FIGURAS





FIGURA 2.1 UMIDADE EM FUNÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA	8
FIGURA 2.2 CELULOSE, AMIDO E GLICOGÊNIO	14
FIGURA 2.3 PROTEÍNA ENRIQUECIDA DE MANDIOCA	15
FIGURA 2.4 OPERAÇÕES UNITÁRIAS BÁSICAS	17
FIGURA 2.5 ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO FUMÁRICO	23
FIGURA 2.6 REAÇÕES QUÍMICAS (HIDROGENAÇÃO)	24
FIGURA 2.7 DESIDROGENAÇÃO DO ÁCIDO SUCCÍNICO	24
FIGURA 3.1 REDE NEURAL <i>FEEDFORWARD</i> DE DUAS CAMADAS	36
FIGURA 3.2 REDE NEURAL RECORRENTE	37
FIGURA 3.3 MODELO DE UM NEURÔNIO ARTIFICIAL	38
FIGURA 3.4 FUNÇÃO DEGRAU	40
FIGURA 3.5 FUNÇÃO DEGRAU SIMÉTRICA	40
FIGURA 3.6 FUNÇÃO PARCIALMENTE LINEAR	42
FIGURA 3.7 FUNÇÃO SIGMOIDAL	42
FIGURA 3.8 FUNÇÃO TANGENTE HIPERBÓLICA	43
FIGURA 3.9 FLUXO DE SINAIS DENTRO DO NEURÔNIO	47
FIGURA 4.1 BAGAÇO DE MANDIOCA BRUTO E PROCESSAO	56
FIGURA 4.2 CROMATÓGRAFO <i>SHIMADZU</i> MODELO CTA – 10A	64
FIGURA 4.3 CLAE DAS AMOSTRAS DO EXPERIMENTO 5	65
FIGURA 4.4 EQUIPAMENTO UTILIZADO EM RESPIROMETRIA	68
FIGURA 5.1 PRODUÇÃO MÉDIA DE ÁCIDO FUMÁRICO	70
FIGURA 5.2 DIAGRAMA DA REDE 1	73
FIGURA 5.3 ERROS QUADRÁTICOS DE TREINO E TESTE DA REDE	74
FIGURA 5.4 VALORES EXPERIMENTAIS X CALCULADOS (REDE 1)	75
FIGURA 5.6 ERROS QUADRÁTICOS DE TREINO E TESTE DA REDE2	77
FIGURA 5.5 VALORES EXPERIMENTAIS X CALCULADOS (REDE 2)	78
FIGURA 5.7 RESULTADOS DO ENSAIO 4 X REDE 1	80

FIGURA 5.8 RESULTADOS DO ENSAIO 5 X REDE 2	83
FIGURA 5.9 OUTRAS REDES TESTADAS	85
FIGURA 5.10 PRODUÇÃO DE BIOMASSA (PROTEÍNAS) DURANTE O ENSAIO 5	91
FIGURA 5.11 VARIAÇÃO NA PRODUTIVIDADE X TAXA DE AERAÇÃO DA COLUN	92
FIGURAS 5.12 a 5.15 RESULTADOS DA RESPIROMETRIA FEITA EM COLUNAS	84

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 COMPOSIÇÃO DO BAGAÇO DE MANDIOCA	18
TABELA 4.1 COMPOSIÇÃO DO MEIO PARA O ÁGAR MANDIOCA	55
TABELA 4.2 COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO SALINA UTILIZADA	57
TABELA 4.3 SOLUÇÃO SALINA PARA O MEIO	58
TABELA 4.4 VARIÁVEIS TESTADAS NOS EXPERIMENTOS 4 E 5	59
TABELA 4.5 MODELO DO PROGRAMA DE BUSCA EXAUSTIVA OTIMREDE	61
TABELA 4.6 CONDIÇÕES INICIAS DA FERMENTAÇÃO EM COLUNAS	67
TABELA 5.1 CONFIGURAÇÕES DAS REDES 1 E 2.	72
TABELA 5.2 BUSCA EXAUSTIVA PARA A REDE1	80
TABELA 5.3 UMIDADES FINAIS DO EXPERIMENTO 4	82
TABELA 5.4 BUSCA EXAUSTIVA PARA A REDE2	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

φ	Função de ativação, normalmente entre 0 e 1 ou -1 e 1
η	Fator de aprendizagem
θ_k	<i>Bias</i> ou incremento adicionado aleatoriamente
	Função degrau $\varphi(v) = 1$ se $v \geq 0$; 0 se $v < 0$
	Função degrau simétrica $\varphi(v) = 1$ se $v \geq 0$; -1 se $v < 0$
	Função linear $\varphi(v) = \alpha v$
	Função logarítmica sigmoidal
a	Constante que limita os valores de φ entre 0 e 1 ou -1 e 1
a_w	Atividade de água
ADN	Ácido desoxirribonucléico
C	Conjunto que inclui todos os neurônios da camada de saída da rede
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
$d_j(n)$	Valor real da saída do neurônio j
$E(n)$	Erro quadrático médio
FES	Fermentação no Estado Sólido
FSm	Fermentação Submersa
I	Incremento
i, j	Camada do neurônio
J	Estímulo de entrada num neurônio
k	Número de identificação do neurônio
MCP	Modelo de McCulloch e Pitts
mL^N/min	Vazão em mL/min a 25° C e 760 mmHg
n	Valor instantâneo de v
N	Número total de exemplos contidos no conjunto de treinamento
Ne	Número de entradas
nm	Nanômetro
No	Número de neurônios
NRRL	<i>Northern Regional Research Laboratory</i>
Ns	Número de saídas
P. R.	Proteína Real
q.s.p.	Quantidade Suficiente para
U_0	Umidade inicial

U_f	Umidade final
u_k	Somatório dos sinais de entrada no neurônio k
URE	Umidade relativa de equilíbrio
v	Campo induzido do neurônio, (v_k)
$v_j(n)$	Nível de atividade interna da rede
w	Peso atribuído à entrada
$W(i,j)$	Pesos nas camadas de neurônios i e j
W_{kj}	Pesos que multiplicam o neurônio k da camada j
x	Valor instantâneo da função de ativação de determinado neurônio
x_0	Biomassa inicial
X1 e X2	Variáveis de entrada de um neurônio
x^f	Biomassa máxima
X_j	Sinal na entrada da sinapse j
y	Saída de determinado neurônio (y_k)
Y1 e Y2	Variáveis de saída de um neurônio
$y_j(n)$	Estimativa de $d_j(n)$ na iteração n

1 Introdução

A mandioca é um tubérculo muito utilizado na alimentação em países da África, América Latina e Ásia. A produção mundial de derivados de mandioca é de 75 milhões de toneladas. O primeiro produtor mundial é a Nigéria com 30 milhões de toneladas por ano, seguida pelo Brasil com 24 milhões de toneladas por ano. Conseqüentemente o Brasil também é o segundo maior produtor de resíduos (proveniente da extração do amido da mandioca). Nesta extração, sobra o bagaço de mandioca que é descartado no meio ambiente. Desse bagaço mais de 60% é composto de amido não extraído no processamento. Uma maneira de se recuperar o resíduo do processamento da mandioca é o uso do amido residual presente no bagaço e a sua conversão em um produto com maior valor agregado, no caso o ácido fumárico.

O ácido fumárico é um importante intermediário na síntese de fármacos e aditivo de rações e acidulante de alimentos.

Existem duas formas típicas de consumo do ácido fumárico proveniente da recuperação do bagaço de mandioca:

- Sem extração, servindo-se o fermentado diretamente como ração animal;
- Com a extração do ácido fumárico em água, que é posteriormente recristalizado e aproveitado como acidulante de alimentos, e intermediário na síntese de fármacos.

O ácido fumárico produzido sinteticamente não é recomendado para o consumo ou para a utilização na indústria farmacêutica, pois na sua síntese é utilizado o benzeno, produto cancerígeno que inviabiliza a sua utilização.

Uma vez desaconselhado o uso do ácido fumárico produzido por via sintética, e considerando que a fermentação submersa é inviável para a utilização de bagaço de mandioca, pois gera um aumento do volume total, a fermentação no estado sólido tornou-se um importante alvo de estudos.

A fermentação no estado sólido (F.E.S.) é uma técnica em que o processo fermentativo ocorre na ausência de água livre. Essa linha de pesquisa visa a produção de vários metabólitos, e tem alto potencial de crescimento.

Neste trabalho, foi realizada a aplicação das redes neurais na otimização das condições de fermentação no estado sólido do bagaço de mandioca para produção de ácido fumárico. Foram feitas várias fermentações, o que possibilitou mudar as variáveis de operação e as constantes de otimização em função de resultados intermediários obtidos. As variáveis estudadas foram temperatura de fermentação, taxa de inoculação, pH, umidade e tempo de fermentação. Com a aplicação das condições ótimas de fermentação houve um aumento sensível na produção e os resultados foram reproduzidos pelas redes neurais com um erro médio abaixo de 2%, o que torna esta técnica muito importante para o estudo da fermentação no estado sólido, na produção de ácido fumárico e no reuso de resíduos industriais.

Foi feita uma ampliação de escala de fermentação e os resultados foram satisfatórios pois o processo estava amplamente fundamentado pela teoria, pela prática e pelos resultados das redes neurais, de modo que o trabalho foi facilitado pela técnica empregada e servirá de referência para trabalhos futuros.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Fermentação no Estado Sólido

O termo Fermentação no Estado Sólido (FES), tradução do inglês *Solid State Fermentation*, é objeto de numerosas definições. RAIMBAULT (1980), MAHEVA (1984) e LONSANE *et al.* (1985), descrevem a FES como a fermentação em substratos sólidos ocorrendo na ausência de líquido na forma livre. A água livre, indispensável ao crescimento dos microrganismos, é adsorvida num suporte sólido ou complexada no interior de uma matriz sólida. A fermentação no estado sólido é considerada mais natural do que outros tipos de fermentações como, por exemplo, a fermentação submersa (FSm), porque seus processos assemelham-se às condições sob as quais a maioria dos microrganismos cresce na natureza.

Os materiais sólidos utilizados na FES, devem possuir partículas de porosidade e tamanho adequado, com grande área superficial por unidade de volume (entre 10^3 e 10^6 m²/L), para facilitar a acessibilidade e a penetração do microrganismo no substrato, proporcionando um crescimento microbiano na interface sólido/gás e levando a altas taxas de processos bioquímicos. Além disso, a matriz sólida não deve ser contaminada por inibidores da atividade microbiana e deve conter ou ser capaz de absorver as fontes nutricionais dos microrganismos como carboidratos (celulose, amido, açúcares), nitrogênio (amônia, uréia, peptídeos) e sais minerais (PANDEY, 1992; RAIMBAULT *et al.*, 1997).

A utilização da fermentação no estado sólido não é recente. Numerosas fermentações para a obtenção de produtos alimentares e agrícolas baseadas neste princípio têm sido praticadas há séculos em todo mundo. Essa fermentação, ainda pouco estudada no Brasil, é muito desenvolvida nos países orientais, particularmente Japão, China e Coréia.

A partir da década de 1980, pesquisadores ocidentais começaram a se interessar por fermentação no estado sólido, dando origem a novos processos, bem como a muitas publicações científicas demonstrando as vantagens desse método de fermentação. Tanto substâncias sintéticas como naturais podem ser utilizadas nos processos de FES. Na natureza a maioria dos materiais orgânicos disponíveis são de estrutura polimérica, tais como polissacarídeos, proteínas e ligninas, conferindo determinadas propriedades de sólido ao substrato. Em geral, todos podem ser utilizados pelos microrganismos como fonte de nutrientes, bem como ser utilizados como suporte inerte no qual carbono e fontes de energia (açúcares, lipídeos, ácidos orgânicos) são adsorvidos. Diversos resíduos agrícolas ou agro-industriais, celulósicos ou amiláceos têm sido utilizados em fermentação no estado sólido, tais como bagaço de cana-de-açúcar, de mandioca e de maçã, refugo de batata, palha de arroz (SOCCOL, 1994; TONIAL, 1997; BRAMORSKI, 1997).

Na maioria dos casos estes resíduos, utilizados como substrato, são formados por estruturas complexas que geralmente são pouco acessíveis ao ataque microbiano. Assim, a preparação e o pré-tratamento são etapas necessárias para converter um resíduo em uma forma passível de uso. Tais etapas incluem:

- Redução de tamanho por moagem ou seleção.
- Hidrólise físico-química ou enzimática das grandes cadeias de açúcares para torná-los acessíveis aos microrganismos.
- Suplementação com nutrientes (fósforo, nitrogênio, sais) e adequação do pH e umidade pela solução mineral.

- Cozimento ou tratamento a vapor para pré-degradação da estrutura macro-molecular e eliminação de contaminantes ou inibidores de crescimento e metabolismo do microrganismo.

Na escolha do pré-tratamento, o problema mais significativo é a grande heterogeneidade do substrato quanto à não uniformidade da estrutura e variabilidade entre bateladas, tornando difícil considerar-se apenas uma categoria de processo hidrolítico e levando a dificuldades de modelagem (DOELLE, 1985; PANDEY, 1992; RAIMBAULT *et al.*, 1997).

Um outro fator importante é a taxa de inoculação, sua importância reside na necessidade de uma grande quantidade de células do inóculo para evitar-se o possível crescimento de microrganismos indesejáveis (contaminação).

2.1.1 Natureza do substrato

A fonte de carbono pode ser a própria fase sólida na forma polimérica. A degradação dessas macromoléculas requer a síntese de determinadas enzimas (amilases, celulasas e pectinases, entre outras).

Segundo SOCCOL (1994), a fermentação no estado sólido pode ser também classificada de acordo com a natureza da fase sólida, ou seja:

1) O meio de cultura funciona como substrato e suporte:

Suporte e meio nutritivo são uma coisa só, o microrganismo utiliza o próprio suporte como fonte de carbono. Exemplo: Amido de mandioca, bagaço de cana.

2) O meio de cultura é adsorvido sobre um substrato sólido:

Neste método de fermentação a fase sólida é inerte, ou seja, não contém nutrientes e o meio de cultura é adsorvido neste suporte (como exemplo podem ser citados as fibras de celulose e o poliuretano).

2.1.2 Umidade, atividade de água (a_w) e temperatura

Na fermentação líquida o substrato está dissolvido ou em suspensão numa fase aquosa, portanto, a água não é fator limitante do crescimento de microrganismos nem de produção de metabólitos.

A quantidade máxima de água presente no meio sólido depende da capacidade de retenção do substrato. Existe um fator limitante que é a redução da porosidade e a diminuição da capacidade de aeração (SOCCOL, 1994).

Estudando a umidade do amido de mandioca pode-se distinguir três diferentes zonas:

-Zona de monocamada, onde a água está fortemente ligada à superfície do sólido, (água de constituição);

-Zona de multicamada onde a água é menos ligada, (água de solvatação);

-Zona de água livre.

O controle da umidade na fermentação no estado sólido é importante no processo. SILMAN (1980), estudou a variação da umidade, inclusive a adição de água ao sistema durante a fermentação. Mudando a temperatura, conseguiu manter a umidade constante dentro do fermentador.

A fermentação no estado sólido pode ser comparada a um sistema trifásico. Pois dentro de um sistema de fermentação no estado sólido a água se encontra em três formas

distintas: água ligada ao sólido (água de constituição), água fracamente ligada ao sólido (água de solvatação), água adsorvida (água livre).

O teor de água livre é expresso como atividade da água, a_w , que é a relação entre a pressão de vapor de água em equilíbrio sobre o sistema e a pressão de vapor da água pura, à mesma temperatura:

$$a_w = P / P_0 \quad (2.1)$$

Onde:

P é a pressão de vapor da água em equilíbrio sobre o sistema.

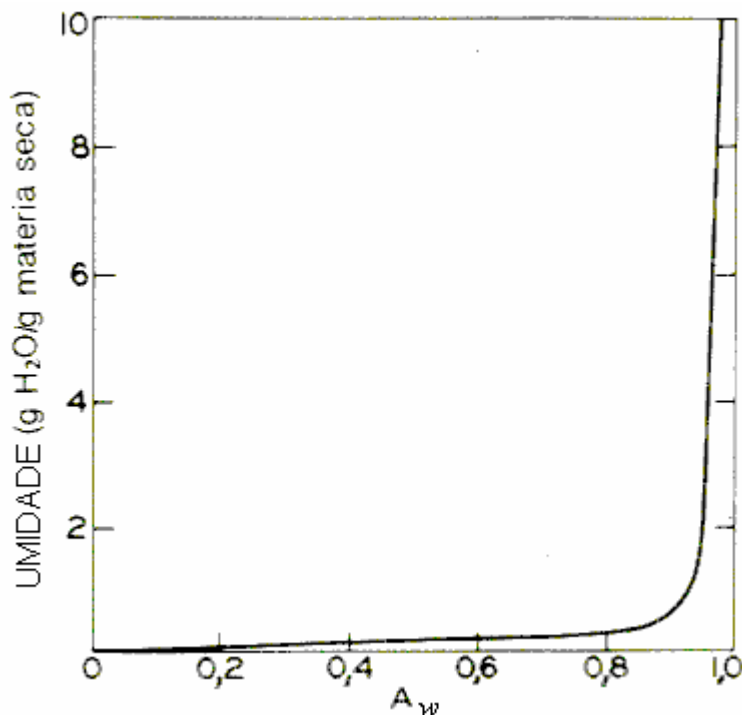
P_0 é a pressão de vapor da água pura.

Sendo que essa atividade de água é proporcional à umidade relativa de equilíbrio (URE) do sistema.

$$a_w \propto U.R.E. \quad (2.2)$$

O gráfico da figura 2.1, mostra a variação de a_w em função da umidade.

FIGURA 2.1 UMIDADE EM FUNÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA



FONTE: BOBBIO & BOBBIO (1992a).

Da teoria da FES tira-se os valores de a_w de três zonas distintas de disponibilidade de água para os microrganismos, assim:

1) Moléculas de água da primeira camada de solvatação.

A disponibilidade de água é quase nula (a_w está entre 0,0 e 0,2).

2) Uma zona dentro de disponibilidade de água intermediária (a_w entre 0,2 e 0,6).

3) Uma zona onde a proporção de água livre é abundante (a_w está entre 0,6 e 1,0)

(BOBBIO & BOBBIO, 1992a).

Com estes três conceitos pode-se determinar o desenvolvimento dos microrganismos em função de a_w .

Em geral, as exigências de água livre das bactérias (a_w entre 0,85 e 0,99) são bem superiores às das células de leveduras (a_w entre 0,75 e 0,90). RAIMBAULT *et al.* (1980) observaram que a fermentação em estado sólido, devido a pouca umidade, assume um comportamento de meio seletivo que favorece, principalmente, o desenvolvimento dos fungos filamentosos.

A fermentação no estado sólido normalmente utiliza umidade dentro de uma faixa de 60% a 70%, que corresponde a uma atividade de água variando entre 0,90 a 0,95 (figura 2.1). O valor máximo de atividade de água é um, para a água pura. Nos alimentos ricos em água com valores de a_w acima de 0,9, poderá ocorrer crescimento de microrganismos. Quando a atividade de água baixar para 0,4-0,8 ocorre pequeno ou nenhum crescimento de microrganismos. Em regiões de atividade de água inferior a 0,3 atinge-se a zona de adsorção primária, onde as moléculas de água poderão estar ligadas a pontos de adsorção primários (por exemplo grupos carboxila, -COOH) e por sua vez se ligar a outras moléculas de água por pontes de hidrogênio. Essa água está fortemente ligada ao alimento, formando a zona de monocamada.

Num fermentador para FES a atividade de água varia pouco em função da temperatura mas, mesmo pequena, essa variação permite o cálculo do calor de adsorção ou desorção (Q_s), que corresponde ao calor envolvido na formação e estabilização da camada primária (BOBBIO & BOBBIO, 1992b).

Da atividade de água se obtém um outro fator de importância para o crescimento dos microrganismos, o pH, descrito a seguir.

2.1.3 pH

Nas alterações de pH, sempre se fala em pH médio determinado em amostras que são dissolvidas em água (ADOLFO LUTZ, 1985). Em pH extremo pode ocorrer a inativação das enzimas. Em geral, as enzimas apresentam uma atividade máxima a um valor característico de pH, denominado pH ótimo. A maior parte das enzimas apresentam atividade máxima em pH numa faixa compreendida entre 4,5 e 8,0 (BOBBIO & BOBBIO, 1992a). Contudo, existem enzimas com pH ótimo extremo, como a pepsina, cujo pH ótimo é 1,8, ou a arginase, cujo pH ótimo é 10,0. Dependendo da enzima de que se trate, as curvas de atividade em função do pH podem ser sigmoidais ou ter a forma de sino. Em pH extremos, a atividade enzimática somente cai quando ocorrem processos de desnaturação protéica. O pH ótimo de uma enzima pode ser consequência do efeito reversível do pH sobre a velocidade máxima de reação, do efeito do pH sobre a afinidade do substrato pela enzima, e do efeito do pH sobre a afinidade da enzima.

2.1.4 Aplicações da fermentação no estado sólido

A fermentação no estado sólido vem sendo utilizada na produção de vários metabólitos primários e secundários de interesse industrial, como por exemplo as enzimas utilizadas em diversos processos. Destacam-se as amilases, fosforilases, amiloglucosidases e celulasas.

As várias enzimas que agem em amidos são classificadas como amilases. Sub-classes importantes de amilases são (WISTLER *et al.*, 1953):

Amilases liqüificantes (dextrogênicas) ou α -amilases.

-amilases de cereais e *Aspergillus*.

-amilase pancreática, salivar, e de *B. mesentericus*.

-amilase de *A. macerans*.

Amilases sacarificantes ou β -amilases.

O processo mais conhecido de produção de amilases é o processo de *Koji* que é bem descrito em SOCCOL (1994), onde foi demonstrado que certas cepas de *Aspergillus oryzae* são capazes de degradar o amido de mandioca no estado natural por fermentação no estado sólido. A concentração de glucoamilase em meio sólido atinge valores de até 32 vezes os obtidos pela fermentação submersa.

A ação das enzimas no amido é de grande importância industrial e biológica. Industrialmente, sua aplicação é significativa na produção de bebidas de cereais fermentados, tais como cerveja e uísque, na confecção do pão e na modificação do amido para utilização como cola, adesivo e muitas outras aplicações (WISTLER *et al.*, 1953).

Segundo WISTLER *et al.* (1953) a separação por coluna de carvão ativado foi utilizada na separação de manase, inulase, celulase, liquenase e celubiase a partir das enzimas brutas de *Aspergillus oryzae*. O fato importante do método é que, o processo fermentativo em que *Aspergillus oryzae* produz uma maior quantidade de enzima bruta é a fermentação no estado sólido (SOCCOL, 1994).

Segundo SOCCOL (1994) é possível a produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido. O autor cita várias referências em que a fermentação no estado sólido foi utilizada para a produção de ácido cítrico.

O ácido α -hidroxipropiônico ou ácido láctico é largamente distribuído pela natureza. É produzido por quase todos os organismos superiores e unicelulares.

Casos de acidose láctica foram abordados a partir de observação em animais. Esta abordagem é encontrada em DUNLOP *et al.* (1965). O seu isômero, o ácido R(-)-láctico,

foi estudado por DUNLOP *et al.* (1965) em ruminantes subalimentados em cereais. A acidose é devida a uma produção elevada de ácido láctico por bactérias do rumem; os dois isômeros são formados em grande quantidade, mas o ácido R-(-)-láctico acumula no organismo do animal provocando um aumento na acidez do sangue. SOCCOL (1994) mostrou que a produção de ácido S-(+)-láctico é maior em fermentação no estado sólido do que por fermentação submersa.

As giberelinas são hormônios de crescimento de plantas. Elas levam esse nome porque podem ser produzidas pelo fungo *Giberella fujikuroi* e também pelo *Fusarium moniliforme*. SOCCOL (1994) estudou a produção de giberelinas em fermentação no estado sólido. Uma boa revisão sobre a produção de ácido giberélico por fermentação no estado sólido em biorresíduos da indústria do café pode ser encontrada em MACHADO (2000).

O ácido fumárico é um importante aditivo de alimentos, intermediário na produção de fármacos, e aditivo de ração que pode ser produzido por fermentação no estado sólido, uma vez que no Brasil existe legislação que proíbe sua produção por via química para uso na indústria farmacêutica e para uso alimentar.

2.1.5 Desenvolvimento micelial

A fermentação no estado sólido é boa para fungos filamentosos. Já a fermentação submersa funciona bem para fungos que não formam micélios. A grande vantagem da fermentação no estado sólido é que a geometria do substrato tende a orientar o desenvolvimento das hifas dos fungos filamentosos, pois o substrato se assemelha muito aos meios naturais de crescimento do fungo, que são sólidos (SOCCOL, 1994).

2.2 Mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta Crantz*) é um tubérculo que possui a reputação de ser tolerante à aridez. Contudo, quando desprovida de água ela pode ter o desenvolvimento de suas raízes tão afetado, que por fim pode alterar a síntese de amido expresso pela variação na qualidade do mesmo (SRIOTH *et al.*, 2001). A glucose estocada numa planta pode estar sob a forma amilácea. O amido ocorre em duas formas: alfa-amilose, em que a glucose está ligada em cadeias lineares alifáticas, e amilopectina, em que as cadeias de glucose são altamente ramificadas. Exceto para os pontos ramificados da amilopectina, o monômero de glucose no amido é ligado via ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$, que no trato digestivo de mamíferos, são hidrolisadas por amilases. Nos pontos de ramificação os monômeros estão ligados por ligação glicosídica $\alpha(1\rightarrow6)$ (BOBBIO & BOBBIO, 1992b).

A amilose é um polissacarídeo composto de unidades de D-glucopirranose unidas por ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ em números que podem variar de 10^2 a 10^4 , formando uma cadeia helicoidal denominada dupla hélice. A amilopectina é a fração ramificada do amido, formada por unidades de D-glucopirranose unidas por ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$ em intervalos de 20 ou mais unidades de glucose, formando uma ligação glicosídica $\alpha(1\rightarrow6)$ produzindo uma ramificação, originando uma estrutura espacial esférica altamente ramificada e volumosa (BOBBIO & BOBBIO, 1992b).

A celulose é o maior constituinte das paredes celulares e mais da metade do carbono orgânico da terra é encontrado na forma de celulose. A celulose é composta de cadeias lineares de moléculas de D-glucose, ligadas uma a outra por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, as quais o estômago de nenhum vertebrado tem capacidade de produzir enzimas para digerir. Herbívoros subsistem comendo vegetais ricos em celulose porque, em seu trato digestivo, eles têm microrganismos que produzem celulase para digerir a celulose.

A digestão microbiológica ocorre via hidrólise enzimática e quebra da ligação glicosídica $\beta(1\rightarrow4)$ (COFFEY *et al.*, 1995).

Ao todo, 70 espécies de bactérias, fungos e actinomicetos são capazes de despolimerizar a celulose.

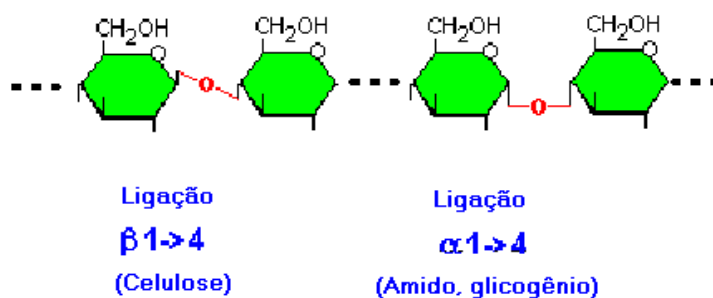
A celulose é decomposta tanto por bactérias aeróbias, como anaeróbias. Existe uma relação simbiótica entre essas bactérias e as azotobactérias.

A maioria dos fungos é capaz de crescer em celulose pura.

Todos os actinomicetos conhecidos são capazes de utilizar-se da celulose para crescimento (WISTLER *et al.*, 1953).

O glicogênio é quimicamente semelhante ao amido, mas tem mais ramificações. É o terceiro polímero majoritário da glucose e, é a maior fonte de carboidratos em animais. Como o amido, as moléculas de glucose são ligadas por ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$. A figura 2.2 mostra detalhes das ligações glicosídicas.

FIGURA 2.2 LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS DA CELULOSE, AMIDO E GLICOGÊNIO.



FONTE: BOWEN (1995)

2.2.1 Industrialização da mandioca

A utilização de raiz de mandioca como alimento para animais (monogástricos especialmente) é limitada pelo seu baixo valor nutritivo. Ela tem menos de 2% de proteínas. O teor bruto de proteínas pode ser aumentado em fermentação (no estado sólido) por *Aspergillus niger* de 2% a 42%.

Os produtos obtidos são denominados proteína enriquecida de mandioca ou *Cassapro*, a qual é uma marca registrada que ficou muito conhecida na Indonésia na década de 90 (KOMPIANG *et al.*, 1994). A figura 2.3 mostra a mandioca fermentada pelo fungo *A. niger* produzindo a *Cassapro*.

FIGURA 2.3 PROTEÍNA ENRIQUECIDA DE MANDIOCA OU *CASSAPRO*



FONTE: ASSESSMENT STATION FOR AGRICULTURAL TECHNOLOGY OF LAMPUNG PROVINCE (1994)

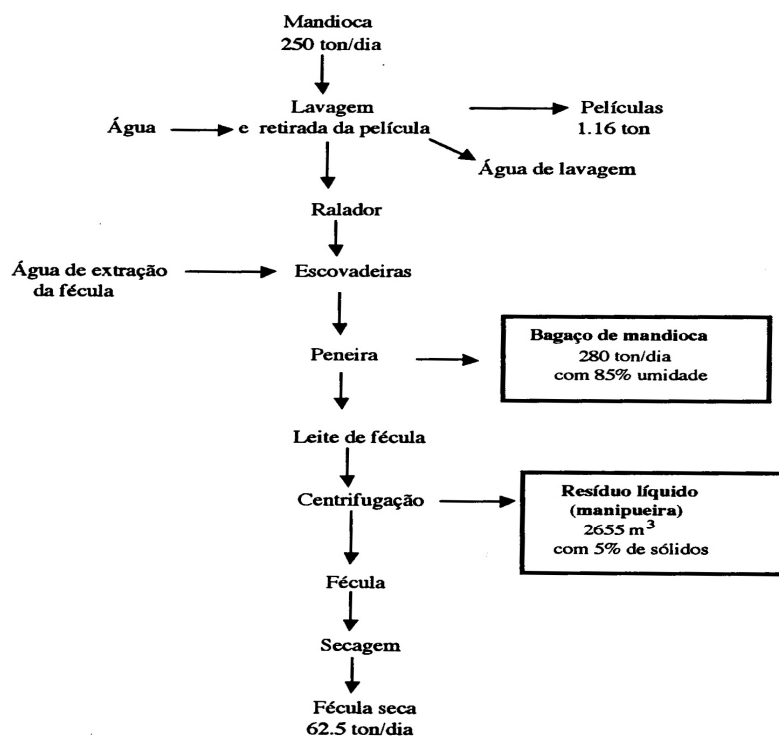
Os resíduos da industrialização da mandioca podem ser convertidos em subprodutos de valor econômico agregado, destinar-se às rações para a pecuária em geral, ricas em amido e fibras. O efluente líquido proveniente do processamento da raiz (manipueira), pode destinar-se, no campo, à irrigação e fertilização, ao controle de ervas daninhas e, na indústria, à produção de biogás, preservando-se o meio ambiente (TONIAL, 1997). A manipueira pode conter o radical venenoso cianeto.

Os resíduos de mandioca pode ser utilizados como ração animal, podem ter emprego biotecnológico sendo utilizados como substrato na produção de biomassa microbiana, além de outros metabólitos do processo fermentativo.

Alguns dos resíduos da mandioca são: a casca marrom, entrecasca, crueira (grossos), fibras, bagaço e varredura. Os resíduos líquidos são constituídos pela manipueira e pela água de lavagem. A figura 2.4 mostra o fluxograma de processamento das raízes da mandioca.

LIMA *et al.* (2001) cita a legislação brasileira que ora chama a fração amilácea de fécula, quando extraída de raízes, tubérculos e rizomas, e ora a chama de amido quando a referida legislação abrange a fração extraída das partes aéreas da planta. Neste trabalho amido será a substância química $(C_6H_{12}O_6)_n$ e fécula será o extrato da mandioca contendo 18% de amilose e 82% de amilopectina, expressos sobre o total de amido. As operações unitárias básicas utilizadas no beneficiamento da mandioca estão mostrados na figura 2.4.

FIGURA 2.4 OPERAÇÕES UNITÁRIAS UTILIZADAS NO BENEFICIAMENTO DA MANDIOCA COM BASE EM 250 TON/DIA DE MATÉRIA PRIMA.



FONTE:

SOCCOL (1994)

O bagaço é o resíduo sólido composto pelo material fibroso da raiz, contendo parte da fécula que não foi possível extrair no processamento. Observe que, no processo descrito acima, são dispostas 280 toneladas por dia de bagaço de mandioca no meio ambiente. O bagaço de mandioca é gerado na separação da fécula e a sua composição está apresentada na tabela 2.1.

TABELA 2.1 COMPOSIÇÃO DO BAGAÇO DE MANDIOCA

COMP. STERTZ	SOCCOL		CEREDA
g/100g	(1994)	(1994)	(1997)
Umidade	5,02	9,52	10,7
Proteínas	1,57	0,32	1,6
Lipídeos	1,06	0,83	0,5
Fibras	50,55	14,88	22,2
Cinzas	1,10	0,66	1,5
Açúcares/ Carb.	40,50	63,85	63,4

FONTE: CARTA¹ (1999)

2.2.2 Industrialização da mandioca no Brasil

No Brasil, o mercado de fécula de mandioca cresceu 175% na década de 90, saltando de 200 mil toneladas em 1991 para 550 mil toneladas em 2001, o que representou um faturamento de US\$ 200 milhões. Por isso, uma dezena de empresas começou a atuar no setor, somando investimentos superiores a US\$ 12,5 milhões, segundo a Associação Brasileira de Produtores de Amido de Mandioca (Abam) (NEOGERA, 2001).

O amido de mandioca, da mesma forma que os amidos de milho e de batata, pode ser utilizado na indústria de biscoitos, carnes embutidas, papel, papelão ondulado, têxteis, construção civil, perfurações petrolíferas e extração de gás. O processamento do amido de mandioca apresenta a vantagem de ser mais barato do que o de amidos de outros vegetais, como milho, batata e arroz. A Cargill Agrícola, um dos maiores fabricantes brasileiros de amidos de milho, está ampliando a produção de derivados de mandioca para oferecer novas alternativas de matéria-prima a indústrias de alimentos e de papéis.

¹ Não constavam informações sobre os métodos utilizados para determinação de fibras e carboidratos. Exceto em SOCCOL (1994) onde foi informada a utilização do método Somogyi-Nelson para carboidratos.

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil produziu 24,3 milhões de toneladas de mandioca em 2001, 4,1% a mais que no ano 2000. dependendo das modificações introduzidas nos derivados de mandioca, eles podem produzir desde colas até elementos adensadores de sopas. A fécula modificada da mandioca, por exemplo, entra na fabricação de alimentos como salsichas, maioneses, temperos e sorvetes. Já as dextrinas têm uso maior na indústria de sacos multifoliados para embalagens de cimento e outros produtos. Sua função básica é fazer a colagem das folhas de papel. A Cargill começou a vislumbrar novos negócios na mandioca no ano de 2000, quando comprou do grupo Maggi uma fecularia em São Miguel do Iguaçu (PR). A fábrica paranaense foi reformada e tem capacidade de produção de 2,5 mil toneladas mensais de fécula. A mandioca é fornecida por cerca de 2 mil famílias de pequenos agricultores da região (NEOGERA, 2001).

Em 2002, dois grupos italianos investiram US\$ 25 milhões na construção de quatro fecularias no Paraná, que respondem por 75% da fécula (amido da mandioca destinado ao uso industrial) produzida no País. O principal interesse das empresas é a exportação do produto. O negócio é o primeiro investimento na área alimentar da Ausi, empresa especializada em automação industrial, em parceria com o agente financeiro privado European Investment Services Corporation (EISC), também italiano. Parte do dinheiro (34%) será investido por empresários de Maringá. Cada fecularia, das que serão construídas em Umuarama, São Jorge do Ivaí, Itaguajé e Nova Londrina, terá capacidade para processar 400 toneladas de mandioca por dia, que resultarão em 100 toneladas diárias de amido nativo modificado. Obtido com a adição de produtos químicos, o amido modificado amplia seu leque de aplicações para as indústrias química e farmacêutica, enquanto a matéria-prima tradicional é empregada na produção de alimentos, bebidas e papel. A expectativa é que o volume de exportações brasileiras possa atingir 500 mil

toneladas em oito anos. Cerca de 60% desse volume será vendido para Estados Unidos e Europa (NEOGERA, 2001).

2.3 Microrganismos

Os microrganismos utilizados na FES, podem ser qualificados, segundo PANDEY (1992), em dois grande grupos: os que fermentam naturalmente ou selvagens, e os de cultura pura (individuais ou consorciados). A compostagem e a ensilagem são processos que utilizam a microflora natural. As culturas puras, conhecidas desde a Antigüidade, são utilizadas nos processos industriais para propiciar o controle da utilização do substrato e a formação do produto final. Bactérias, fungos e leveduras podem crescer em substratos sólidos e são aplicados em processos de FES. Os fungos filamentosos são os utilizados na maioria dos casos, devido às suas propriedades fisiológicas, enzimológicas e bioquímicas (SOCCOL, 1994).

2.4 Fungos

Fungos são microrganismos multicelulares, filamentosos, de aspecto algodonofo, e se apresentam em várias cores (branco, verde claro, rosa, cinza escuro, etc.); as células são eucarióticas e a reprodução pode ser por meio de esporos. A maioria das espécies são potencialmente capazes de crescimento. Possuem filamentos ramificados, chamados hifas, sendo que um conjunto de hifas é chamado de micélio. Existem dois tipos de hifas principais, as vegetativas, que penetram no solo (ou meio para daí retirar o alimento), e as aéreas, onde se formam as estruturas reprodutoras. Os fungos pertencem à divisão do reino vegetal chamada *Thallophita*, não possuem clorofila, nem apresentam suas estruturas diferenciadas em folhas, caules ou raízes. Estão amplamente distribuídos na natureza.

O modo de crescimento dos fungos, sua boa tolerância a baixas e altas pressões osmóticas os fazem eficientes e competitivos com a microflora natural para bioconversão de substratos sólidos. O crescimento por hifas dá aos fungos uma maior vantagem sobre os microrganismos unicelulares na colonização do substrato sólido e utilização dos nutrientes disponíveis. Seu modo básico de crescimento é uma combinação de extensão apical e geração de novas hifas durante a ramificação. Um ponto importante é que, apesar da extensão, o crescimento ocorre apenas nas pontas das hifas numa taxa constante e linear e a frequência da ramificação faz com que o crescimento da biomassa total possua um padrão cinético exponencial, principalmente nas primeiras etapas do estágio vegetativo.

O crescimento por hifas dá, também, ao fungo filamentosos, o poder de penetrar no substrato sólido. A ligação da parede celular aos filamentos e o micélio proporcionam uma estrutura firme e sólida. As enzimas hidrolíticas são excretadas nas hifas sem grande diluição como ocorre na fermentação submersa, o que faz com que sua ação local seja muito mais eficiente, permitindo a penetração no substrato e aumentando a acessibilidade de todos os nutrientes disponíveis nas partículas. (RAIMBAULLT, 1997)

2.4.1 Rhizopus:

O prefixo “rhizo” é pertinente às raízes, o sufixo “pus” deve-se aos rizóides da base dos esporangiósporos ou das hifas que são característicos de algumas espécies desse gênero.

Rhizopus estão espalhados intensamente pelo solo, especialmente em terrenos turfosos ou úmidos, no estrume, na poeira do ar, em alimentos e nos utensílios em condições higiênicas insuficientes. (CARTA, 1999).

Segundo WOICIECHOWSKI (1997) alguns autores têm demonstrado que estes fungos podem melhorar o grau de digestibilidade de alguns alimentos através da degradação de fibras e aumentar o valor protéico dos alimentos através do crescimento micelial. A autora também relatou o estudo de sua capacidade de impedir a formação de produtos tóxicos como a aflatoxina B₁, produzir substâncias anticarcinogênicas, controlar o crescimento de bactérias GRAM positivas através da síntese de substâncias que impedem o seu desenvolvimento e detoxificar os compostos cianogênicos da mandioca.

Contudo os *Rhizopus spp*² também podem ser fungos infecciosos oportunistas que podem infectar em conjunto com *Aspergillus fumigatos*. Um estudo de infecções, em pacientes renais transplantados, contaminados por *Aspergillus fumigatos*, *Rhizopus spp* e outros fungos apresentou alto índice de mortalidade (75%) (ALTIPARMAK *et al.*, 2002).

Sua proliferação, dentro das condições que lhe são propícias, ocorre amplamente pela facilidade de produzir esporos (CARTA, 1999).

A reprodução efetua-se por germinação de esporos. Os esporos maduros são liberados dos aparelhos esporíferos e disseminados. Um esporo germina e libera um filamento ou hifa que cresce, para dar um novo micélio (CARTA, 1999). Seus esporos são de natureza assexuada.

Muitos metabólitos dos fungos, primários ou secundários, assim como enzimas ou outros produtos de biotransformação produzidos por fungos atuam estrategicamente na produção e armazenamento de energia para o mesmo (FEDERICI *et al.*, 1997).

² Esta notação engloba todas as espécies de *Rhizopus*.

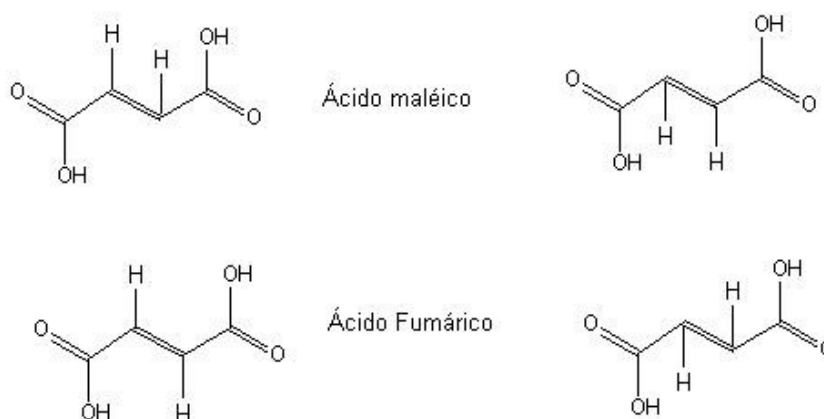
Rhizopus são produtores naturais de ácido fumárico para as plantas, cujo desenvolvimento pode ser aumentado pela adição de nitrogênio orgânico ao solo (KARMAKAR & TABATABAI, 1991).

Rhizopus arrhizus NRRL 2582 e *Rhizopus arrhizus* NRRL 1526 já foram utilizados para produzir ácido fumárico em meio sólido, bagaço de cana (SOCCOL, 1994) e alginato de cálcio (PETRUCCIOLI & ANGIANI, 1997) .

2.5 Ácido fumárico

O ácido fumárico tem a fórmula molecular $C_4H_4O_4$ e sua estrutura química está mostrada na figura 2.5, O isômero do ácido fumárico é o ácido maléico, ou o ácido cis-butenodióico, também mostrado na figura 2.5.

FIGURA 2.5 ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO FUMÁRICO

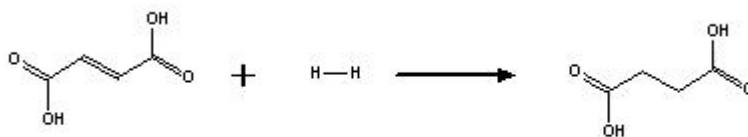


FONTE: THE MERCK INDEX (1989), NIST (2001)

Outros Nomes para o ácido fumárico encontrados na literatura são: ácido 2-(E)-butenodióico; ácido trans-butenodióico; ácido trans-1,2-etilenodicarboxílico; ácido alomaléico; ácido bolético; ácido licêmico; ácido fumárico; (E)-2-ácido butenodióico; (E)-HO₂CCH=CHCO₂H; ácido butenodióico, (E); NSC-2752; U-1149; USAF ek-p-583; ácido 1,2 etileno dicarboxílico (E); ácido 1,2 etileno dicarboxílico; ácido licêmico (THE MERCK INDEX 1989, NIST 2001). Se os dois grupos maiores estiverem do mesmo lado da dupla ligação (cis) esta notação seria (Z) do alemão *zusammen* que significa junto. Mas como eles estão de lados opostos (trans) a notação é (E) do alemão *entgegen* que significa oposto (MARCH, 1992).

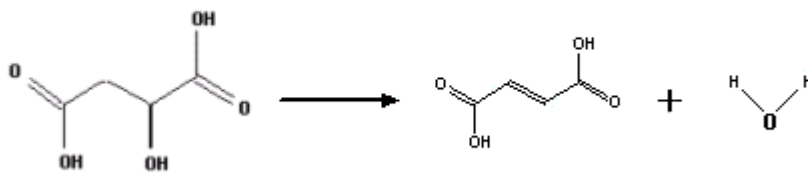
Devido à sua dupla ligação pode haver hidrogenação da mesma formando o ácido butanodióico. Na figura 2.6 mostra-se a reação de hidrogenação do ácido fumárico.

FIGURA 2.6 REAÇÕES QUÍMICAS QUE PODEM OCORRER COM O ÁCIDO FUMÁRICO (HIDROGENAÇÃO).



Esta é praticamente a reação inversa da que ocorre no ciclo de Krebs onde o ácido succínico é desidrogenado a ácido fumárico, como mostrado na figura 2.7.

FIGURA 2.7 DESIDROGENAÇÃO DO ÁCIDO SUCCÍNICO



2.5.1 Processos de Obtenção

Segundo KIRK & OTHMER (1952), grande parte do ácido fumárico é produzida pela rota do benzeno a partir da oxidação catalítica (praticamente 83% da produção). Esta oxidação gera o ácido maléico, o qual é então isomerizado a ácido fumárico pelo aquecimento. Como o benzeno é uma substância cancerígena surgiu a necessidade de outra rota para a produção de ácido fumárico para a indústria de alimentos e para a indústria farmacêutica. É importante salientar que a produção de ácido fumárico por via química é ecologicamente incorreta pois enquanto que com a FES ou fermentação submersa está consumindo resíduo, na produção via química está produzindo resíduos, há uma legislação que proíbe a utilização de ácido fumárico e ácido acético produzidos via síntese química para consumo humano, animal e farmacêutico.

Através de síntese biológica o ácido fumárico é produzido por várias linhagens de *Aspergillus* e de *Rhizopus*. Sob condições controladas algumas cepas produzem inicialmente o ácido fumárico, depois o etanol, e alguns outros ácidos. De maneira geral, altos rendimentos em ácido fumárico têm sido encontrados na ordem de 40-50% do açúcar fermentado.

RHODES *et al.* (1959) obtiveram condições ideais para a produção de ácido fumárico para duas cepas de *Rhizopus arrhizus*, em frascos num agitador-incubador (*shaker*). O meio de cultura continha de 10 a 16% de glucose, sacarose ou melão. Em condições adequadas, 60 a 70% do açúcar consumido foi convertido a ácido fumárico, variando o tempo de fermentação entre 3 a 8 dias, dependendo da quantidade de açúcar utilizada. Convertendo-se os cálculos de Rhodes para a base de cálculo utilizada neste trabalho ele produziu de 60 a 112 g de ácido fumárico por kg de meio.

Dos ácidos produzidos, 75 a 80% foi ácido fumárico. A quantidade e o tipo de nitrogênio empregado influenciaram o rendimento em ácido fumárico. As melhores fontes de nitrogênio foram a uréia e o sulfato de amônio.

Quanto à composição do meio RHODES *et al.* (1959) afirmaram que variáveis de processo, tais como, fontes de carbono, potássio, ferro, magnésio, zinco, cobre, podem influenciar muito o rendimento. Estudos indicaram que a presença de metanol no meio também pode influenciar o rendimento, deslocando o equilíbrio da bioconversão de ácido fumárico a metanol para a esquerda. O ácido fumárico também aumenta a tolerância do fungo a certos sais. Em temperaturas inferiores a 30° C, pouco açúcar foi consumido e em temperaturas acima de 35° C foram produzidas pequenas quantidades de ácido. Uma característica desta fermentação é que no início a taxa de ácido fumárico produzido é baixa, mas aumenta quando o crescimento do microrganismo cessa, e a produção de ácido domina a atividade fermentativa.

O mecanismo de fixação de nitrogênio no solo pode ser devido à atividade de fungos. Em estudos com *Rhizopus nigricans* a presença de carbonato indicou que o dióxido de carbono foi consumido.

RHODES *et al.* (1959) explicou que o ponto crítico na produção de ácido fumárico é a adição de uma quantidade limite de nitrogênio, somente o necessário para que as células sobrevivam, produzindo assim ácido fumárico ao passo que grandes quantidades de nitrogênio só aumentam o crescimento. A adição de carbonato de cálcio neutraliza o ácido fumárico, formando fumarato de cálcio e gerando gás carbônico para suprir os intermediários do ciclo de Krebs pela carboxilação do piruvato a oxaloacetato.

RHODES (1959) cita ainda que a presença de surfactantes ou óleos vegetais aumentam a taxa de ácido fumárico produzido. GOLDBERG *et al.* (1985) utilizaram a cepa *Rhizopus arrhizus* 1526 e os meios descritos por RHODES *et al.* (1959) numa fermentação submersa por dois a quatro dias a 220 rpm. A concentração de glucose foi de 100 g/L e os autores testaram diversas proporções de Tween 80 e 40, óleo de milho, soja, e algodão e concluíram que a adição dos óleos acima citados na concentração de 0,5 a 1,0 mg/L com excesso de carbonato de cálcio aumenta, significativamente, a produção de ácido fumárico. KENEALY *et al.* (1986) utilizaram como fonte de nitrogênio o sulfato de amônio na proporção de 0,4% (m/v) em substituição à uréia. PETRUCCIOLI (1997) testou a produção de enzimas para a cepa *Rhizopus arrhizus* 1526. A glucose foi consumida durante quatro dias e a cepa produziu 97,7 g/L de fumarato com o consumo de 119,4 g/L de glucose.

KAUTOLA *et al.* (1990), obtiveram ácido fumárico a partir de um meio contendo xilose na concentração de 10% com uma relação C/N de 160. Em reator batelada com células imobilizadas (*Rhizopus arrhizus*) teve uma máxima produtividade de 16,4 g/L com tempo de residência de 10,25 dias. A conversão máxima em relação a xilose foi de

23,7% com produção de 15,3 g/L com tempo de residência de 9 dias e relação C/N de 188,3. A imobilização das células (com espuma de poliuretano) pode aumentar a concentração de ácido fumárico a um valor três vezes maior que o valor obtido com células livres. MORRIN *et al.* (1990) estudaram a suplementação de um meio de glucose e peptona utilizando carboximetilcelulose e carbopol (resina aniônica), e fermentando-se com *Rhizopus arrhizus*. A função da carboximetilcelulose e da carbopol é dispersar o micélio e aumentar a produção de ácido fumárico, modificando a morfologia do meio. A conversão de glucose em ácido fumárico foi aumentada com a carboximetilcelulose. Utilizando-se carbopol foram obtidas baixas taxas de produção de ácido fumárico. A morfologia pode influenciar a taxa de crescimento e a formação do produto. Obtiveram 5,36 g/L de ácido fumárico, com crescimento disperso, o que significa hifas longas, formando uma suspensão homogênea. GANGL *et al.* (1990), fizeram uma comparação econômica utilizando carbonatos de sódio e cálcio como agentes de neutralização para a produção de ácido fumárico com fungos *Rhizopus arrhizus*. Devido à solubilidade do carbonato de sódio, o processo se torna mais simples, requer menos equipamento, não requer calor além de permitir a reutilização das células. Porém, o custo na rota fermentativa continua sendo maior do que na rota do benzeno. O processo com carbonato de sódio custa 20% a mais do que com o carbonato de cálcio, e não foram obtidas concentrações de ácido fumárico tão altas quanto com CaCO_3 , utilizou-se a cepa *Rhizopus arrhizus* 2582, com 102 g/L de glucose, obteve-se 73,3 g/L de ácido fumárico.

A biotina em concentração de 10^{-5} g/L, por ser um cofator da enzima piruvato carboxilase, permite que o fungo fixe o dióxido de carbono no ciclo do ácido cítrico. O xarope de milho também contém biotina, além de outros ingredientes. Porém, o uso da biotina pura melhora todos os parâmetros de fermentação.

MORESI (1991), estudou a produção de ácido fumárico com *Rhizopus arrhizus* 1526, a partir de hidrolisados de amido de milho comercial. Esta produção foi estudada

em diferentes concentrações iniciais de glucose e diferentes relações C/N de 150 a 210. A condição ótima de operação foi a concentração de substrato entre 100 a 130 g/L e C/N de 105. A fermentação foi testada com glucose, hidrolisados (ácido e enzimático) de mandioca, milho e de farinha de batata. O rendimento variou de 60 a 75%, e a produtividade de 6 a 8,4 g/L ao dia, quando a concentração de substrato foi de 25-50 g/L e o tempo de fermentação de 44 a 100 horas, respectivamente.

2.5.2 Aplicações e usos industriais:

O ácido fumárico é um intermediário básico no metabolismo de diferentes fungos filamentosos, mais especificamente os do gênero *Mucor* e *Rhizopus* (SOCCOL, 1994). O ácido fumárico possui em sua molécula uma dupla ligação e dois grupos carboxílicos que o tornam um excelente intermediário para a síntese química nas reações de esterificação. Ele pode ser polimerizado com monômeros de estireno para a obtenção de resinas de poliéster e com acetato de polivinila para a fabricação de adesivos. O ácido fumárico é também utilizado como acidulante na indústria de alimentos, bebidas e no preparo farmacêutico de alguns medicamentos por suas qualidades não tóxicas e não higroscópicas. (SOCCOL, 1994) apresentou diferentes estudos visando a produção de ácido fumárico em meio sólido com a imobilização de células de *Rhizopus* em suporte lignocelulósico (bagaço de cana-de-açúcar). Inicialmente, procurou efetuar uma varredura em cultura líquida de diferentes espécies de *Rhizopus*, para avaliar quais eram as mais produtivas em ácido fumárico.

Após haver selecionado a cepa de maior produção, ainda em cultura líquida, efetuou os cálculos para avaliar o efeito de diferentes parâmetros (concentração de glucose, agitação, temperatura, concentração de biotina, relação C/N e concentração de fosfato monobásico de sódio) na produção do ácido fumárico.

Para os estudos da produção de ácido fumárico em meio sólido foram utilizados os mesmos meios de cultura otimizados na fermentação submersa.

As condições de cultura em meio sólido foram otimizadas pelos estudos do efeito da taxa de inoculação, aeração e concentração de glucose.

O ácido fumárico é utilizado como acidulante nas seguintes proporções (FUGMANN, 1973):

- 1) Balas e produtos similares – 0,25%
- 2) Geléias artificiais e pós para geléias artificiais– 1,00%
- 3) Pudins – 0,20%
- 4) Refrescos e sorvetes – 0,20%

3 Redes Neurais

Durante muitos anos, os temas de inteligência artificial (IA), redes neurais e lógica difusa foram desenvolvidos por comunidades intelectuais separadas. Isto foi devido mais a barreiras sociais e institucionais para comunicação do que a diferentes metas e resultados. Uma manifestação destas barreiras chegou em forma de reivindicações, especialmente a partir da comunidade acadêmica, de que outras aproximações não atendiam a solução de certos problemas, a despeito do progresso dos demais (CARPENTER *et al.*, 1993).

Redes neurais são uma família de modelos auto-organizáveis de arquitetura lógica que podem rapidamente aprender para reconhecer, testar hipóteses, e prever consequências em padrões binários ocorrendo em séries não estacionárias (CHEN, 1996).

Segundo HAYKIN (2001) um evento numa pastilha de silício num microprocessador dura cerca de um nanosegundo e numa célula nervosa da ordem de milisegundos. Apesar da vantagem na velocidade, a enorme quantidade de células e conexões ligadas de forma maciçamente paralela torna a estrutura cerebral muitas vezes mais eficiente.

3.1 Histórico das redes neurais e inteligência artificial

A Inteligência Artificial (IA) não é recente. Sua história inicia na década de 40, onde havia alguma pesquisa em torno de seqüências de estratégia e análise do funcionamento do cérebro com objetivos de formalização de seu comportamento. Os ramos de pesquisa redes neurais e inteligência artificial eram dissociados entre si, sem nenhuma preocupação com a construção de uma Inteligência Artificial. Buscava-se apenas novas alternativas de utilização do computador, ainda em projeto.

Mas, com o passar dos anos, foram sendo distinguidas duas linhas de pesquisa: uma biológica, calcada em torno do funcionamento do cérebro e dos neurônios; e outra, fruto do estudo da cognição, do raciocínio.

McCULLOCH & PITTS (1943) descreveram um modelo simplificado, porém poderoso, do neurônio real, o qual ainda se encontra em uso atualmente na maioria dos modelos de Redes Neurais Artificiais (RNAs). O modelo de McCULLOCH & PITTS (ou modelo MCP) é baseado na plausibilidade neurofisiológica de um neurônio desempenhando uma função de soma e limite, onde os pesos nas conexões entre os nodos correspondem às sinapses inibidoras e ativadoras de um neurônio real. Embora não esteja explícito no trabalho original de MCCULLOCH & PITTS, os nodos MCP são capazes de se adaptar pelo ajuste dos pesos de cada conexão. Esse processo de adaptação - ou aprendizado - permite o desenvolvimento de procedimentos para o ajuste gradual dos pesos, de forma que a rede desempenhe a função desejada. A primeira teoria neurofisiológica para modificação de sinapses em neurônios reais foi proposta por HEBB (1949).

A década de 50 foi de grande sucesso com a implementação do primeiro simulador de redes neurais artificiais e do primeiro neurocomputador. A partir do modelo matemático de McCULLOC & PITTS (1943) e da teoria de aprendizado de HEBB (1949), foi possível a união desses conhecimentos no modelo de rede neural artificial chamado *Perceptron*.

A descrição do Perceptron de uma única camada por ROSENBLATT (1958) introduziu o conceito de aprendizado em redes neurais artificiais. Defendia a idéia de que o cérebro humano trabalha como um associador de padrões adaptável, e não como um circuito lógico determinístico como pensava MINSKY (1956). Seu modelo de rede,

baseado no nodo MCP, era capaz de classificar os padrões aprendidos do ambiente através do ajuste gradual dos pesos entre nodos.

Na década de 60, diversas limitações dos Perceptrons tornaram-se claras. Em um importante trabalho, MINSKY & PAPERT (1969) exibiram de maneira rigorosa as diversas limitações computacionais dos modelos até ali existentes. Uma delas consistia no fato de que algumas funções muito simples, como a função *booleana* ou-exclusivo, não podiam ser aprendidas por um perceptron. Esta é uma severa limitação, pois em geral apenas funções muito simples são linearmente separáveis. Não é o caso da já citada função *booleana* ou-exclusivo (XOR), que aparece em MINSKY & PAPERT (1969).

Pode-se pensar em uma solução para este problema com a superposição de camadas de perceptrons, compondo funções mais simples para chegar a uma mais complexa. BRAZ (1998) mostra um exemplo de implementação de uma rede com mais de uma camada que calcula a função ou-exclusivo. Contudo, sistemas neurais sem peso (ALEKSANDER, 1966) também tiveram um papel importante na década de 60, já que proporcionaram modelos de rápida aprendizagem e fácil implementação. A visão não convencional das Redes Neurais Sem Peso (RNSP) consiste em armazenar a função do nodo em uma memória RAM, ao invés de ajustar pesos entre os nodos. Essa abordagem facilita o desenvolvimento de algoritmos de aprendizado mais simples do que os baseados no modelo MCP, uma vez que existe uma independência entre os nodos durante o processo de aprendizagem.

Em 1972, KOHONEN da Universidade de Helsinky definiu um novo modelo de rede neural, conhecido como: Mapa Auto-organizável de Características (KOHONEN, 1972). Ao contrário do perceptron, ele não era limitado a valores binários, mas os valores das entradas, dos pesos e das saídas poderiam ser contínuos. Além disso, ao invés da saída da rede ser representada pela atuação de um simples neurônio *vencedor* (ativado), Kohonen

estabeleceu um grande número de neurônios para representar o padrão de entrada, sendo que este número é alcançado pela influência do neurônio *vencedor* aos seus vizinhos. Em outras palavras, não há apenas um neurônio responsável pela representação do padrão de entrada, mas sim um conjunto de neurônios que interagem entre si. Todavia, a grande importância do trabalho de Kohonen foi ter introduzido um novo paradigma no estudo das redes neurais: o aprendizado não-supervisionado, segundo o qual a rede não precisa ficar sendo comparada constantemente a um valor de saída durante a fase de aprendizado.

Até o início da década de 80, as arquiteturas de redes neurais implementadas poderiam ser classificadas em dois tipos: 1) recorrente, onde a rede, partindo de um estado inicial, chega ao estado final de aprendizado pelas iterações, na qual as saídas são canalizadas para as entradas, e 2) *feedforward*, a qual transforma um conjunto de sinais de entrada em sinais de saída (HAYKIN, 2001).

Em 1986, RUMELHART *et al.* (1986a) validaram as pesquisas em torno das redes neurais, possibilitando a volta da pesquisa nesta linha. Uma das formas de recuperação do prestígio das redes neurais foi a proposta de um algoritmo de treinamento, chamado *Back-propagation*, que ampliava o potencial do perceptron de modo a permitir a superação das limitações do modelo primitivo a partir das redes neurais multicamadas.

Na década de 90, as redes neurais tiveram uma explosão exponencial de aplicações e desenvolvimento de modelos. São centenas de propostas de novos ou aperfeiçoamento de modelos a cada ano, tal o interesse pela área. A partir daí, consolidam-se as redes neurais como parte integrante do estudo da Inteligência Artificial propriamente dita.

Dois métodos desenvolvidos para resolver problemas com redes neurais que necessitem de estruturas compactas surgiram na década de 90. Estes métodos funcionam

minimizando o tamanho da rede enquanto mantém uma boa performance. Uma rede neural com um tamanho mínimo é menos susceptível a aprender ruídos ou erros experimentais nos experimentos de treino, e pode assim generalizar melhor os novos dados. Os métodos citados acima são:

Método Construtivo: Começa-se com uma única camada com um único neurônio, que realizará as tarefas mais simples, e somente se adicionará um novo neurônio ou uma nova camada oculta de neurônios quando a rede for incapaz de desenvolver o trabalho especificado (HAYKIN, 2001). Um Modelo auto-ajustável construtivo deve ser estável, gerando o mesmo resultado independente do momento em que uma *query* é executada e plástico, permitindo novas inserções de neurônios e mantendo a estabilidade do mapa.

Existem diversos algoritmos de Modelos auto-ajustáveis construtivos, divididos em não-hierárquicos e hierárquicos.

Método de Poda: como o próprio nome já diz, este método funciona de forma inversa ao método construtivo, ele começa com uma grande quantidade de neurônios e uma performance adequada para resolver o problema específico e depois vai podando as conexões ou os nodos pela eliminação ou enfraquecimento de certos pesos sinápticos em uma ordem seletiva, partindo dos menores pesos sinápticos para os maiores.

As principais razões para se escolher redes menores que funcionam tão bem que as redes maiores são as seguintes:

Generalização: a capacidade de generalização diminui quando uma rede cresce, devido à presença de mais parâmetros para serem estimados tornando a rede mais propensa a aprender erros experimentais (ruídos).

Eficiência computacional: é mais fácil treinar redes menores pois menos parâmetros têm que ser estimados.

Dedução do conhecimento: uma rede menor deve ser mais fácil de ser interpretada, isto é, converter conexões em regras (BULSARI, 1995).

3.2 Teoria das Redes Neurais

As redes neurais artificiais (RNA's) ou simplesmente Redes Neurais (RN's), surgiram de uma idéia inspirada no funcionamento do cérebro humano. Hoje podem ser definidas como uma metodologia capaz de resolver com sucesso vários problemas relevantes da engenharia e de outras áreas. As redes neurais devem ser capazes de realizar três tarefas, comuns também aos sistemas baseados em inteligência artificial (IA) (HAYKIN, 2001):

- (a) Armazenar conhecimento;
- b) Aplicar o conhecimento armazenado para resolver problemas;
- c) Adquirir novos conhecimentos pela experiência.

Computacionalmente, possuem a capacidade natural de efetuar processamento paralelo, o que aumenta sua potencialidade numérica.

Uma rede neural é formada por diversas unidades de processamento chamadas de neurônios artificiais. Em um modelo de neurônio, podem ser identificados três elementos básicos:

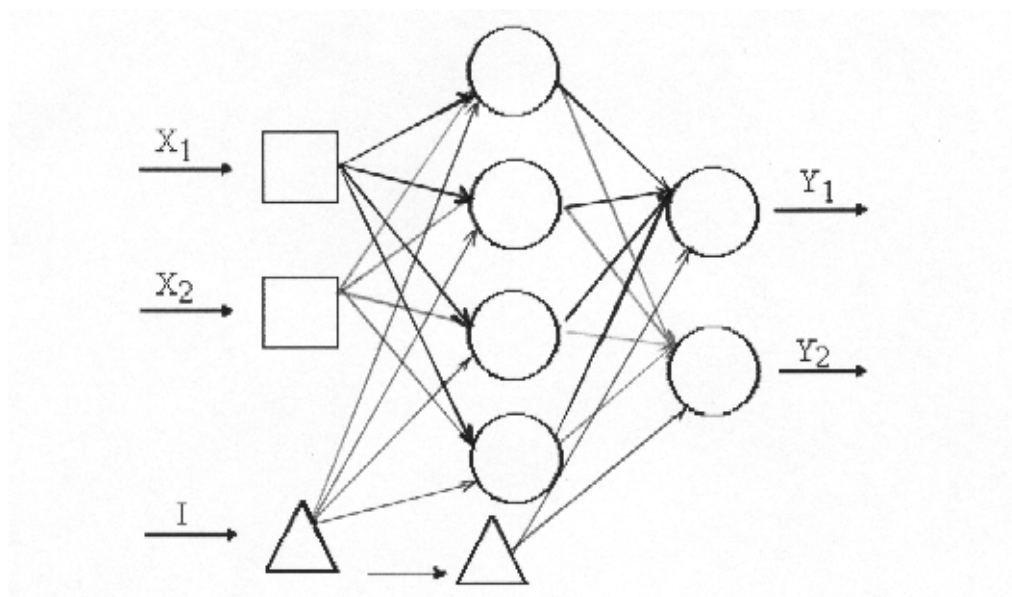
- 1) Um conjunto de ligações chamadas de sinapses, cada uma caracterizada por um peso sináptico W_{kj} , onde o índice k corresponde ao número do neurônio e j ao estímulo de entrada. Quanto maior o peso W , maior será o estímulo da entrada j .

2) Um somatório de sinais de entrada já ponderados por seus respectivos pesos (combinação linear), resultando no valor v .

3) Função de ativação ϕ , também chamada de *squashing function*, que visa limitar os sinais de entrada a um determinado intervalo, normalmente entre 0 e 1 ou -1 e 1. A função de ativação é capaz de assumir diversas formas, podendo ser em degrau, linear ou sigmoideal. A escolha do tipo de função ativação a ser utilizado na rede neural dependerá do tipo de modelo a ser construído.

Como as estruturas neurais são complexas existem classes de redes, das quais duas são comumente empregadas em biotecnologia: *Feedforward* e recorrentes. Essas redes estão apresentadas nas figuras 3.1 e 3.2.

FIGURA 3.1 REDE NEURAL *FEEDFORWARD* DE DUAS CAMADAS



FONTE: YAMAMOTO (1998)

Onde:

X_1 e X_2 são variáveis de entrada

Y_1 e Y_2 são variáveis de saída

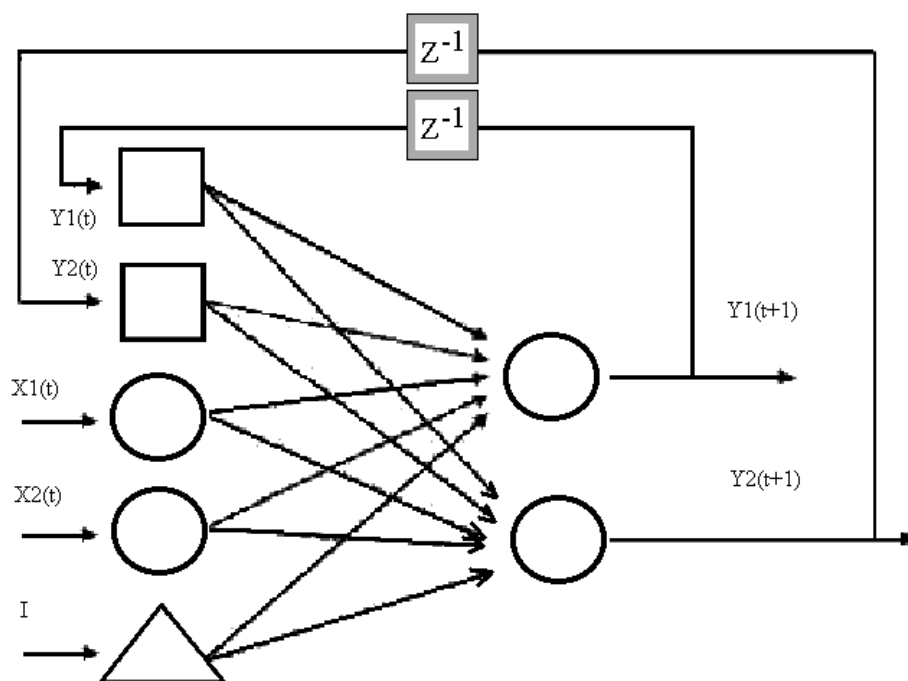
Os quadrados são os neurônios da camada de entrada.

Os círculos são os neurônios das camadas subjacentes.

Os triângulos são os neurônios encarregados de fornecer um valor de referência (*bias*).

Como pode ser visto na figura acima, as redes neurais são estruturas que apresentam a vantagem do processamento paralelo. O valor de referência *bias* é que garante a aleatoriedade ao sistema e no caso de as entradas serem todas 0 ou 1 impedem que as saídas sejam iguais.

FIGURA 3.2 REDE NEURAL RECORRENTE



FONTE: YAMAMOTO (1998)

Onde:

$X_{1(t)}$ e $X_{2(t)}$ são as entradas

$Y_{1(t+1)}$ e $Y_{2(t+1)}$ são as saídas

$Y_{1(t)}$ e $Y_{2(t)}$ são as entradas da camada recorrente (saídas realimentadas)

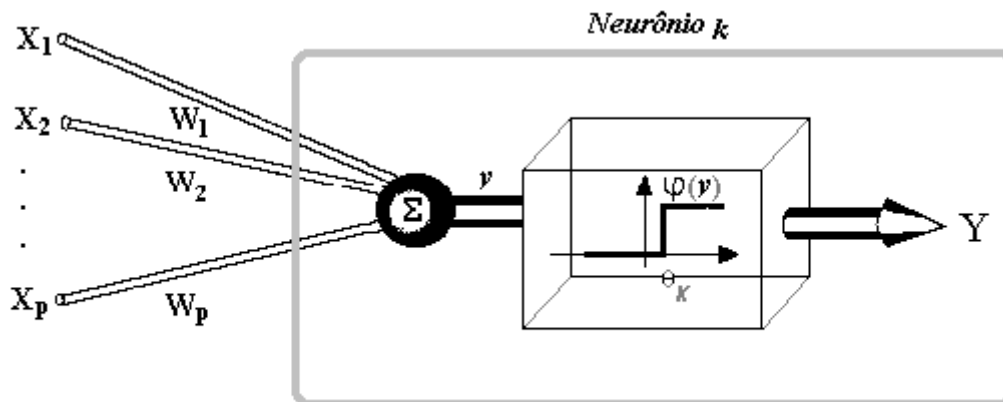
Z^{-1} são os operadores de atraso

I é o incremento (*bias*)

As redes recorrentes apresentam uma vantagem de processamento paralelo. Se for observado na camada recorrente o equivalente a mais duas entradas que estão representadas por quadrados.

Na figura 3.3, pode-se observar um valor de limiar *bias*, θ_k , que possui um efeito de diminuir ou aumentar o valor da soma ponderada das entradas (v) na função de ativação.

FIGURA 3.3 MODELO DE UM NEURÔNIO ARTIFICIAL



Onde:

X_j é um sinal na entrada da sinapse j conectada ao neurônio k .

W_j são os pesos que multiplicam o neurônio k .

Y é a saída

θ_k é um incremento aleatório (*bias*)

$\varphi(v)$ é a função de ativação, delimita os valores de v em um intervalo específico.

Em geral a adição de *bias* é benéfico para aumentar a eficiência do treinamento. Isto é especialmente verdadeiro quando uma faixa entre -1 e 1 é utilizada. Considerando uma situação onde todas as entradas são zero, se não forem utilizadas *bias* todas as saídas serão zero, o que resultaria em não haver aprendizado (QUEEN *et al.*, 1995).

3.3 Equações

3.3.1 Funções de ativação

A função de ativação é encarregada de converter todos os valores de entrada em um intervalo entre (-1,1), as diferentes funções se adaptam aos modelos matemáticos de quase todos os problemas normalmente encontrados na natureza.

A função de ativação φ pode ser expressa por:



a) Função "degrau" expressa por *threshold* (positivo):

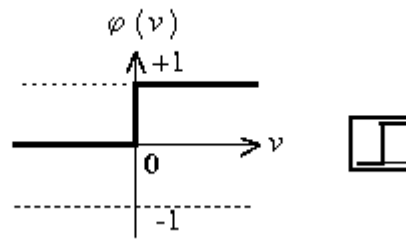
$$\varphi(v) = 1, \text{ se } v \geq 0 \quad (3.1)$$

$$\varphi(v) = 0, \text{ se } v < 0 \quad (3.2)$$


Onde v é o campo induzido do neurônio.

Segundo HAYKIN (2001) este neurônio é referido na literatura como o modelo de *McCulloch-Pitts*. A saída de um neurônio assume o valor 1 se o campo local induzido daquele neurônio não for negativo, caso contrário será zero (McCULLOCH & PITTS, 1943). A figura 3.4 mostra a função tipo degrau.

FIGURA 3.4 FUNÇÃO DEGRAU



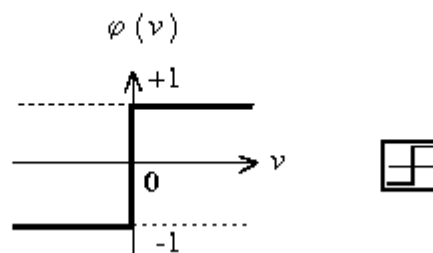
$$\varphi(v) = 1 \text{ se } v \geq 0 \quad (3.3)$$


b) Função degrau simétrica  :

$$\varphi(v) = -1 \text{ se } v < 0 \quad (3.4)$$

A figura 3.5 mostra a equação degrau simétrica:

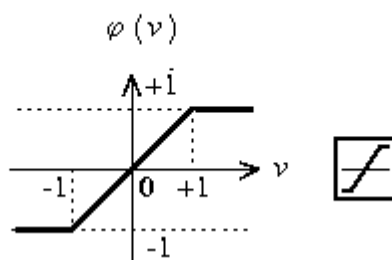
FIGURA 3.5 FUNÇÃO DEGRAU SIMÉTRICA




c) Função linear :

$$\varphi(v) = av \quad (3.5)$$

FIGURA 3.6 FUNÇÃO PARCIALMENTE LINEAR

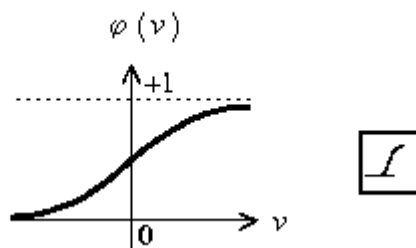


d) Função logística: :

$$\varphi(v) = \frac{1}{1 + e^{-av}} \quad (3.6)$$

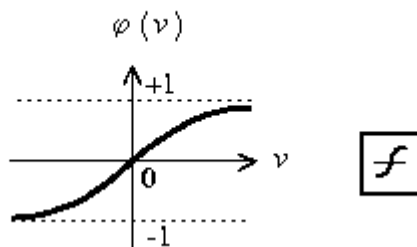
d.1) Função sigmoideal

FIGURA 3.7 FUNÇÃO SIGMOIDAL



d.2) Função tangente hiperbólica:

FIGURA 3.8 FUNÇÃO TANGENTE HIPERBÓLICA



$$\varphi(v) = \tanh(av) = \frac{e^{av} - e^{-av}}{e^{av} + e^{-av}} \quad (3.7)$$

A função logística é comumente utilizada como função de transferência em redes com aprendizado *backpropagation*. Sua principal vantagem é o fato de que ela é diferenciável e que sua derivada pode ser expressa em termos da própria função:

$$\varphi'(v) = \varphi(v) \cdot (1 - \varphi(v)) \quad (3.8)$$

O fato de cada unidade ter como entrada valores de ativação apenas de unidades anteriores a ela é uma restrição importante, pois permite o cálculo exato das derivadas da função do erro quadrático para um conjunto de treinamento em apenas um passo através da rede (BRAZ, 1998).

Baseando-se em vetores $D(t)$ contendo a saída desejada para o elemento t de um conjunto de treinamento com T elementos e chamando a saída real para este mesmo elemento de $S(t)$, pode-se calcular as derivadas do erro quadrático total E para todo o

conjunto em relação a cada peso. Se for utilizada a notação d_A como a derivada do erro em relação à variável A , pode-se escrever:

$$E = \sum_t \sum_{i=1}^n \frac{(D(t)_i - S(t)_i)^2}{2} \quad (3.9)$$

$$d_S(t)_i = S(t)_i - D(t)_i \quad (3.10)$$

$$d_x(t)_i = d_S(t)_i - N + \sum_{j=i+1}^{N+m} w_{ji} \cdot d_x(t)_j \quad (3.11)$$

derivando esta equação, tem-se:

Onde $d_S(t)_i - N$ é definido como 0 caso $i \leq N$, ou seja, para as unidades que não são de saída. Note que se a unidade for de saída, há o erro proveniente da resposta desejada para aquela unidade e o erro proveniente das outras unidades de saída de índice maior do que o dela, para as quais seu valor de ativação contribui como entrada. Note também como o índice varia dos valores maiores para os menores, o erro é propagado na rede no sentido contrário ao cálculo de saídas, daí o nome *backpropagation* (BRAZ, 1998).

$$d_v(t)_i = \varphi'(v_i) \cdot d_x(t)_i \quad i = N + n, \dots, m + 1 \quad (3.12)$$

Continuando, pela regra da cadeia:

para, finalmente,

$$d_{-}w_{ij} = \sum_{t=1}^T d_{-}v(t) \cdot x(t) \cdot j \quad i = m+1, \dots, N+n; j = 1, \dots, i-1 \quad (3.13)$$

De posse de $d_{-}w_{ij}$, pode-se calcular um novo valor para w_{ij} da seguinte forma:

$$w_{ij\text{FINAL}} = w_{ij\text{INICIAL}} - \eta \cdot w_{ij\text{INICIAL}} \quad (3.14)$$

A taxa de aprendizado η é geralmente um valor pequeno, para que o processo se torne praticamente contínuo mas, se ela for pequena demais, naturalmente o processo será muito lento. Por isso, seu valor será o maior possível sem que a rede deixe de adaptar seus pesos corretamente. Esta é uma escolha geralmente empírica, que depende de cada caso.

3.3.2 Ajuste dos pesos sinápticos através da retro-propagação do erro

O ajuste dos pesos sinápticos é feito através do algoritmo *back-propagation* e pode ser resumida nas etapas seguintes:

- Apresentação do conjunto de treinamento à rede.
- Processamento dos dados pela rede através da multiplicação pelos pesos sinápticos, posterior somatório e aplicação da função de ativação, obtêm-se as saídas em relação às entradas relacionadas.

- Comparação das saídas fornecidas pela rede com os valores reais obtidos dos experimentos e subsequente cálculo do erro.
- Ajuste para os pesos da última camada. O erro é retropropagado na rede, corrigindo os pesos sinápticos das camadas escondidas.

Tecnicamente, este processo é realizado simplesmente alterando o peso de cada conexão na direção que torna o erro menor para o conjunto de exemplos fornecido. Isto é feito calculando-se a derivada do erro para cada peso e alterando-o na direção oposta à derivada. Com isto, há um movimento no espaço dos pesos para a rede em questão sempre em direção a um erro menor, até que se atinja um mínimo local (BRAZ, 1998).

O valor do erro (e_j) de um neurônio k de uma saída y_j , em uma determinada iteração n é calculado por:

$$e_j(n) = d_j(n) - y_j(n) \quad (3.15)$$

Onde $d_j(n)$ representa o valor real desejado da saída y_j do neurônio k e $y_j(n)$ sua estimativa na iteração n .

Determinando-se o valor instantâneo do erro quadrático para a saída y_j como

$$E(n) = \frac{1}{2} \sum_{j \in C} e_j^2(n) \quad (3.16)$$

$/2e_j^2(n)$, então o somatório dos erros quadráticos instantâneos na rede será (DYMINSKI, 2000):

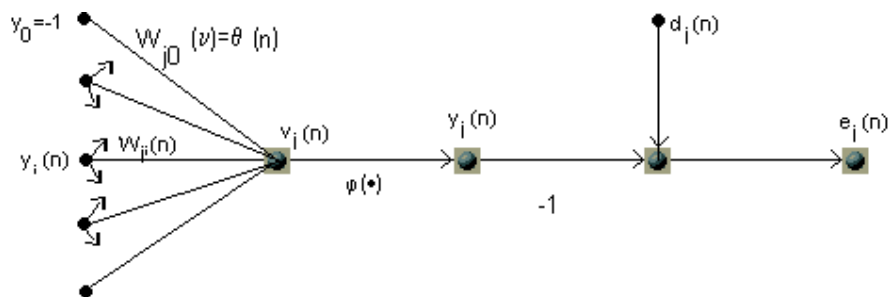
Onde o conjunto C inclui todos os neurônios da camada de saída da rede.

Se N for o número total de exemplos contidos no conjunto de treinamento, então o erro médio quadrático pode ser obtido somando-se os valores de $E(n)$ e dividindo-se por N :

$$E_{av} = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N E(n) \quad (3.17)$$

Onde $E(n)$ e $E(av)$ são funções de todos os parâmetros livres, ou seja, pesos sinápticos e *thresholds*, da rede neural. A figura 3.9 mostra um conjunto de neurônios da linha j alimentada por saídas produzidas por uma camada de neurônios à sua esquerda.

FIGURA 3.9 FLUXO DE SINAIS DENTRO DO NEURÔNIO DA SAÍDA y_j .



3.4

Conjunto de dados

Analogamente a outros métodos, a escolha do conjunto de dados que servirá para alimentar o modelo neural é muito importante. Este conjunto de dados deverá cobrir todo o domínio de interesse do problema a ser estudado. Na construção de um modelo neural, deve-se inicialmente analisar o problema a ser modelado, quais suas características mais importantes, os fatores relevantes que podem influenciá-lo e as respostas que se deseja obter como saídas da rede neural.

Os dados a serem fornecidos à rede, tanto na fase de aprendizado quanto durante a utilização do modelo, devem estar compreendidos entre intervalos limitados (quando normalizados, de preferência entre 0 e 1 ou -1 e 1), dependendo da função de ativação escolhida, que deve ser compatível com estes intervalos. Isso acaba por tornar mais eficiente a etapa de treinamento da rede. Para adaptar o conjunto de dados a estes intervalos limitados, deve-se normalizá-los. Esta normalização pode ser linear ou não linear (DYMINSKI, 2000), dependendo do tipo de problema a ser analisado e do efeito que a normalização pode ter sobre os dados (a normalização não linear pode introduzir uma estrutura para os dados completamente diferente da original). Depois de se normalizar os dados, introduzi-los à rede e serem obtidas as saídas, as mesmas estarão também em sua forma normalizada. Para poderem ser analisadas e interpretadas, as saídas deverão ser transformadas novamente para seu domínio original. As variáveis de interesse, como foram selecionadas e procedimento de otimização encontram-se em Materiais e Métodos. Os dados dos planejamentos experimentais, encontram-se no anexoA.

3.4.1 Treinamento e testes

A obtenção dos dados experimentais é feita normalmente através de estudos estatísticos, para se obter dados suficientes e de qualidade, eles têm que cobrir todo o universo amostral do problema, para só daí passar para a ferramenta redes neurais. Os dados experimentais utilizados neste trabalho encontram-se no anexo A e o procedimento para obtê-los em materiais e métodos.

Segundo YAMAMOTO (1998) divide-se o conjunto de dados em conjunto de treinamento e conjunto de teste. O conjunto de treinamento é composto de exemplos (condições operacionais) a serem utilizados na fase de treinamento da rede neural (determinação dos parâmetros da rede). Já o conjunto de teste será composto de

exemplos que serão utilizados na tarefa de validar a precisão de uma rede neural. Os conjuntos de treinamento e de teste são constituídos por dados distintos entre si.

O treinamento é a determinação da configuração e parâmetros da rede. A rede processará os parâmetros de entrada relativos a estes exemplos pela multiplicação dos mesmos pelos pesos sinápticos e posterior aplicação destes valores às funções de ativação dos neurônios, fornecendo então as respostas (saídas da rede) a este estímulo. Estas saídas da rede neural devem ser comparadas com os valores reais dos parâmetros de saída correspondentes aos exemplos do conjunto de treinamento, e desta comparação será obtido um valor de erro da fase de treinamento. O programa procura então ajustar os valores dos pesos sinápticos, visando a diminuição do erro do treinamento. Paralelamente à fase de treinamento são apresentados à rede os exemplos de teste, obtendo-se assim o chamado erro de teste, pela comparação das saídas da rede com as respostas desejadas correspondentes aos exemplos de teste. Durante a fase de treinamento é feito o ajuste dos valores sinápticos da rede, de tal forma que as saídas fornecidas pela rede neural estejam bem próximas dos valores reais dos exemplos apresentados.

3.5 Aplicações das redes neurais em biotecnologia

Existe uma vasta utilização das redes neurais em biotecnologia, estendendo-se desde a modelagem de biorreatores até à identificação de microrganismos isolados (BAUGHMAN & LIU, 1995). É possível resolver associações sem conhecer o mecanismo subjacente. As aplicações das redes neurais artificiais em biotecnologia podem ser divididas em classificação, desenvolvimento de modelos dinâmicos e associação entre variáveis multiparamétricas. A seguir são apresentados alguns exemplos de aplicação.

1 - Identificação rápida de isolados de *Mycobacterium tuberculosis* com base na sua composição lipídica. Inferência do perfil de resistência a antibióticos (ALMEIDA, 1998).

A assinatura lipídica dos isolados foi definida por 36 compostos encontrados exclusivamente em micobactérias. A possibilidade de, com base no conteúdo lipídico, usar redes neurais artificiais para detectar *Mycobacterium tuberculosis*, inferir o seu perfil de resistência a antibióticos assim como a patogenicidade de outras espécies do mesmo gênero, foi avaliada para 67 cepas, 15 das quais eram de *Mycobacterium tuberculosis*. A análise fatorial e análise cluster não permitem discriminar com exatidão as diferentes espécies. A inferência da resistência a antibióticos afigurava-se ainda mais problemática visto que os métodos de estatística multivariada não reconhecem nenhuma relação entre esse comportamento e a composição lipídica. As redes neurais foram então utilizadas. Verificou-se que este método permitiu reconhecer *M. tuberculosis* corretamente em todos os casos, assim como a presença de resistência a isoniazida, e ainda, com um erro de 1/15, a resistência à estreptomicina. Uma vez que a obtenção da assinatura lipídica não requer isolamento ou cultura, este método oferece a possibilidade de diagnóstico rápido da infecção por micobactérias, incluindo não só a sua detecção como também o seu perfil de resistência a antibióticos.

2 - Determinação das equações de estado correspondentes ao consumo de substratos múltiplos por uma cultura mista.

Uma vazão de gás contaminado com 6 diferentes hidrocarbonetos é passada por um filtro biológico para promover a sua remoção. A existência de um cromatógrafo gasoso em linha com a corrente de entrada e de saída do filtro permitiu a monitoração detalhada das eficiências de remoção dos diferentes contaminantes. No entanto, a interação entre o consumo dos diferentes compostos e ainda entre estes e os parâmetros operacionais, pH, temperatura, consumo de O₂, produção de CO₂, umidade e pressão revelou-se demasiado complexa para o desenvolvimento de modelos matemáticos. Foram então utilizadas redes neurais para desenvolver um modelo baseado exclusivamente no registro de dados experimentais, tendo sido testadas duas topologias, uma feedforward, e outra recursiva.

A aplicação de redes neurais artificiais em biorreação tem-se revelado particularmente prolífera, como é documentado em (BAUGHMAN & LIU,1995).

3 - O efeito *antifouling* de um material refere-se à capacidade de evitar o crescimento de filmes biológicos na sua superfície. Esta característica é particularmente desejada em materiais imersos em ambientes marinhos, visto que freqüentemente 10 a 20% dos gastos de combustível de um navio são conseqüência do arraste desse filme. Devido à plasticidade característica das comunidades biológicas, não existem modelos de adesão que permitam a associação entre as características físico-químicas e propriedades *antifouling*. Conseqüentemente, a realização de ensaios de campo, que podem durar até 5 anos, é incontornável. Paralelamente, ensaios em laboratório com suspensões celulares permitem uma avaliação preliminar em 2 semanas. No entanto, verifica-se que a utilização dos diferentes índices de *fouling* assim determinados tem uma validade muito variável. A associação por redes neurais artificiais entre os índices obtidos nas duas circunstâncias permitiu verificar a consistência do conjunto de índices previstos, diminuindo consideravelmente o erro preditivo (ALMEIDA, 1998).

4 – Controle automático aplicado a uma produção de etanol em larga escala.

Devido às dificuldades envolvidas na medida ou ao excessivo número de variáveis encontradas nos processos industriais, é altamente recomendável o desenvolvimento de sensores automáticos que podem ser baseados fundamentalmente em redes neurais artificiais. Estes métodos são extremamente úteis para a identificação de modelos que variam não linearmente no tempo (MELEIRO *et al.*, 2000).

5 – Modelos clássicos de processos biotecnológicos em tanques com agitação usualmente representam velocidades de reação específicas em função da concentração das espécies. Uma alternativa interessante é utilizar um modelo não linear caixa-preta (como redes neurais artificiais) para determinar as velocidades de reação. Portanto foi

feito um modelo de redes neurais que analisava o balanço de massa envolvido nas reações em processo (CHEN *et al.*, 2000).

6 – Aspectos relativos ao uso de biosensores para controle de processo: Experimental e investigações de simulação.

FERREIRA *et al.* (2003) estavam fazendo o controle de pH, temperatura, oxigênio dissolvido, concentração inicial de CO₂ e tempo decorrido de uma fermentação com enzimas para produzir lactose, e comparando os resultados com os determinados pelas redes neurais. As medições foram feitas em quatro temperaturas diferentes: 20,0° C; 24,8° C; 27,8° C e 30,4° C. Utilizando um injetor automático de amostra, e conseguiram 96 conjuntos de dados experimentais,

Uma rede do tipo *feedforward backpropagation* com oito neurônios na camada oculta e funções de ativação linear tanto para camada de entrada quanto para camada de saída foi selecionada para o processo. Este processo tinha ao todo cinco variáveis de entrada e duas de saída que eram: Concentração de lactose, e concentração final de CO₂. Estas variáveis foram medidas automaticamente por um biosensor denominado *flow injection analysis* (FIA). Obtiveram como conclusão que apesar dos problemas e do grande erro obtido, a utilização do biosensor é muito promissora (FERREIRA *et al.*, 2003).

7 - Neuroidentificação de um processo biotecnológico: Discussão e aplicação

Fermentações são altamente não-lineares em relação ao tempo e processos de modelagem não são muito precisos.

TSAPTSINOS (1994), estudaram a geração de um modelo de rede neural de um processo industrial secundário de fermentação metabólica apresentando a metodologia de construção e os vários assuntos que surgem durante o projeto, treinamento e fases de prova também são discutidos.

Os estudos incluem também o tratamento de dinâmica e a determinação do número de neurônios da camada oculta. A utilidade do modelo de rede neural com respeito à estimativa *on-line* de medidas fundamentais ficou demonstrada e sua participação em sistemas de controle foi realçada (TSAPTSINOS, 1994).

4 Materiais e Métodos

A parte experimental foi dividida em quatro etapas:

4.1 Escolha da cepa maior produtora de ácido fumárico.

4.2 Otimização do processo com redes neurais, onde foram testados, temperatura, taxa de inoculação, pH, umidade do meio e tempo de fermentação. Os dados experimentais encontram-se no anexo A.

4.3 Análise dos fermentados.

4.4 Fermentação em colunas.

4.1 Escolha da cepa maior produtora de ácido fumárico

Na primeira fase do trabalho para escolha da cepa maior produtora de ácido fumárico, foram utilizadas as seguintes cepas, do banco de cepas do laboratório de processos biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná.

Rhizopus arrhizus NRRL 2582

Rhizopus formosa MUCL 28422

Rhizopus oryzae MUCL 28627

Rhizopus delemar ATCC 34612

Rhizopus delemar 28168

Rhizopus sp NRRL 25975

Foi utilizada também a cepa *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 proveniente do *Agricultural Research Service Culture Collection*.

4.1.1 Conservação das cepas

As cepas foram conservadas em tubos inclinados com o meio de crescimento especificado na tabela 4.1:

TABELA 4.1 COMPOSIÇÃO DO MEIO PARA O ÁGAR MANDIOCA

INGREDIENTES	QUANTIDADE g
Água destilada	500
Farinha de mandioca	15
Ágar bacteriológico	7,5
Sulfato de amônio	1,5
Uréia	0,36
Fosfato monobásico de potássio	0,75

O preparo do meio envolveu três etapas básicas:

- Na primeira etapa foi adicionada água à farinha de mandioca, aquecida à 100° C, por uma hora, em autoclave aberta de modo a passar um fluxo contínuo de vapor d'água.
- Na segunda etapa, após filtragem para remoção do material sólido, foram adicionados os demais elementos e o meio foi esterilizado a 121° C por 20 minutos.
- Na terceira etapa, o meio (ágar mandioca) foi colocado nas placas de Petri e nos tubos de ensaio, sendo estes solidificados na posição inclinada.

4.1.2 Preparo do inóculo

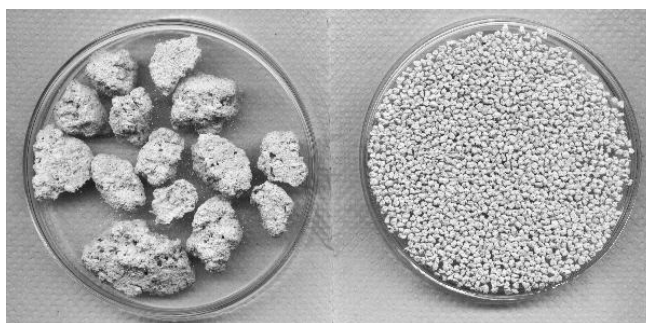
O inóculo consistiu de uma suspensão contendo entre 10^6 e 10^9 esporos por mL, (preparado em meio estéril contendo 80 mL de água), 0,1 mL de Tween 80 para diminuir a tensão superficial e algumas pérolas de vidro de diâmetro de aproximadamente 2,5 mm para fazer a ação mecânica na quebra de micélios e homogeneização. O micélio com dez dias cultivado nas placas de Petri foi retirado com alça de platina e transferido ao erlenmeyer para produzir o inóculo.

4.1.3 Substrato

No trabalho foi utilizado bagaço de mandioca proveniente da Agroindustrial Paranaense de Polvilho Ltda, Paranaíba. O material recebido da indústria foi seco em estufa, moído em moinho rotativo e classificado em peneiras de acordo com a granulometria. A fração com granulometria entre 0,84 a 2 mm foi utilizada como única fonte de carbono para o microrganismo.

A figura 4.1 mostra o resíduo bruto e processado para uso nos testes fermentativos.

FIGURA 4.1 BAGAÇO DE MANDIOCA BRUTO E PROCESSADO



Na seleção das cepas maiores produtoras de ácido fumárico foi utilizado o bagaço de mandioca na granulometria descrita no início deste item, adicionado de solução salina

composta conforme tabela 4.2:

TABELA 4.2 COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO SALINA USADA NOS PROCESSOS DE SELEÇÃO DAS CEPAS MAIORES PRODUTORAS

COMPONENTE	QUANTIDADE
KH_2PO_4	46,15 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	90,35 g
Uréia	22,35 g
Na_2CO_3	q.s.p. pH 5,1 (final)
Água	q.s.p. 500 mL

Em cada teste fermentativo do bagaço de mandioca foi adicionado um volume de inóculo com esporos de cada cepa testada para garantir a taxa de inoculação, e um volume de solução salina para fornecer a quantidade de sais e água suficientes para proporcionar uma umidade final de 70 a 71%.

4.1.4 Condições de cultivo

O substrato inoculado foi mantido em uma temperatura inicial de 32° C, em estufas, por dias e após este prazo o ácido fumárico foi extraído conforme item 4.3.2.

4.2 Otimização com redes neurais

4.2.1 Meio empregado para otimização do processo utilizando redes neurais

5 g de mandioca seca com granulometria entre 0,84 e 2 mm

0,3 g de carbonato de cálcio

0,23 g de nitrato de potássio

1,5 mL da solução salina da tabela 4.3

2,0 mL de HCl 1 Mol/L para pH de 5,36.

0,5 mL de NaOH 1 Mol/L para pH de 9,50.

Volume de inóculo para a taxa de inoculação testada.

Água q.s.p. umidade desejada.

TABELA 4.3 SOLUÇÃO SALINA PARA O MEIO TESTADO

COMPONENTE	QUANTIDADE
Solução de biotina 0,0002%	1,25 mL
Sulfato de zinco heptahidratado	0,1 g
Sulfato de magnésio	0,625 g
Fosfato monobásico de potássio	0,375g
Água	q.s.p. 250mL

4.2.2 Otimização das condições de cultivo com as redes neurais

Nesta fase dos trabalhos, foram feitas otimizações das condições de fermentação. Foi feito um planejamento experimental 2^{4-1} para definir os pontos a serem testados resultando nos ensaios iniciais. Nos primeiros ensaios foram utilizadas temperaturas de 25° C, 28° C, 32° C e 35° C, taxas de inoculação de $2,5 \times 10^8$ esporos/g, $7,4 \times 10^7$ esporos/g, $7,4 \times 10^6$ esporos/g, $7,4 \times 10^5$ esporos/g, pH de 7,2; 5,9; 5,4; e 2,3 e umidade de 75%, 70%, 60%, e 56%.

Na segunda otimização foram feitos mais experimentos com as mesmas escalas de temperatura, taxa de inoculação de 1×10^8 esporos/g, pHs variando de 7,2; 8,6; 9,5; e 11,6. Umidades de 65%, 70%, 75% e 80%. Os tempos de fermentação foram de seis dias para o primeiro experimento e variaram de seis a treze dias para o segundo experimento.

Desta forma 40 experimentos foram utilizados na primeira rede denominada rede 1 e 36 experimentos na segunda rede denominada rede 2.

Foram feitas algumas correções experimentais das umidades com precisão de duas casas, e adicionados mais dados experimentais feitos com pH e temperaturas determinados por um terceiro experimento com valores que completam o todo o domínio de interesse do problema a ser solucionado. Todos os dados acima se encontram nas tabelas do anexo A.

4.2.3 Estudos variando o tempo de fermentação (ensaios 4 e 5).

Foram adicionados mais dados de experimentos em função apenas do tempo de fermentação, denominados de ensaios 4 e 5, feitos a 30° C e a 32° C, taxa de inoculação de 3×10^7 e 6×10^6 esporos/g, pH de 7,2; umidades de 70% e 81,4%.

Nestes testes utilizou-se o meio descrito no item 4.2.1 com as condições descritas na tabela 4.4:

TABELA 4.4 VARIÁVEIS TESTADAS NOS ENSAIOS 4 e 5:

Variável	Valor testado
Temperatura	32° C e 30° C
Taxa de inoculação	3×10^7 e 6×10^6
pH	7,2
Umidade inicial	70,0%, e 81,4%.
Tempo	De 1 a 10 dias para ensaio 4. De 1 a 12 dias no ensaio 5.

4.2.4 Metodologia utilizada nas otimizações

Foram alimentadas cinco variáveis de entrada (temperatura de fermentação em graus Celsius, taxa de inoculação em esporos por g de bagaço de mandioca seco, pH do meio, Umidade inicial ou final, e tempo de fermentação em dias) para uma única variável de saída (produção de ácido fumárico em gramas por kg de bagaço de mandioca seco), e foi

utilizada uma rede de topografia *feedforward* com algoritmo de processamento *backpropagation*.

Foram testadas as seguintes combinações de funções de ativação de entrada e saída:

Sigmoidal- sigmoidal

Sigmoidal- tangente-hiperbólica

Sigmoidal- linear

Tangente-hiperbólica- Sigmoidal

Tangente-hiperbólica-tangente-hiperbólica

Tangente-hiperbólica- linear

Linear- sigmoidal

Linear- tangente-hiperbólica

Linear-linear

Cada varredura analisou todo o conjunto de funções acima para uma rede de 2 a 4 neurônios (rede 1) e de 2 a 3 neurônios para a rede 2. Os critérios de parada foram três:

- Se o experimento atingisse o número máximo de 20000 iterações para a rede 1 e 30000 para a rede 2. Normalmente 20000 iterações já é suficiente para ter-se uma boa precisão dos resultados. As análises só foram mantidas até 30000 iterações para a rede 2, pois o erro quadrático médio de treino foi decaindo lentamente até 28565 iterações como pode ser visto na figura 5.9 do capítulo específico de discussão dos resultados.
- Se o experimento atingisse o erro quadrático mínimo de 10^{-10} .
- Se o erro quadrático de teste começasse a aumentar.

Existe um limite mínimo e máximo de neurônios para se fazer a varredura, se o número de neurônios for muito grande a rede começa a aprender ruídos, erros

experimentais. Se este número for muito pequeno, por exemplo um neurônio, a rede torna-se incapaz de abranger a complexidade do problema em questão, estes limites estão exemplificados com mais detalhes no capítulo de discussão dos resultados (Resultados e discussão) no item 5.3.1 (Outras redes testadas).

O intervalo de normalização foi de 0,2 a 0,8, esta normalização é feita logo no início dos cálculos conforme está em revisão bibliográfica.

O fator de aprendizado η variou de 0,1 a 0,9.

Para a otimização com as redes neurais foi utilizado o pacote de redes neurais do aplicativo *Matlab 5.3*, os dados foram divididos em conjunto de treinamento e de teste, sendo que as relações foram as seguintes: na primeira otimização foram 29 experimentos de treinamento e 11 experimentos de teste, onde foi escolhida uma rede com quatro neurônios na camada oculta com funções de ativação tangente-hiperbólica (rede 1). Na rede 2 foram substituídas as umidades iniciais do processo pelas umidades finais, pois estava havendo consumo de água durante a fermentação e diminuindo a produção final, foram 23 experimentos no conjunto de treinamento e 12 experimentos no de teste. Foi escolhida uma rede com 3 neurônios na camada oculta e funções de ativação tangente-hiperbólica para entrada e linear para a camada de saída (rede 2) e comparada com o experimento 5 feito com 11,4% de água livre.

Depois de escolhida a rede, utilizou-se o programa de varredura *otimrede*, para procurar a melhor condição dentre cerca de 10000 condições. O *otimrede* é um programa em Matlab que utiliza a arquitetura de rede neural descrita na tabela 4.5.

TABELA 4.5 MODELO DO PROGRAMA DE BUSCA EXAUSTIVA OTIMREDE

Variáveis	Intervalos	Incremento	Melhor(es) resultado(s) com
Variável 1	Intervalo 1	Incremento 1	Condição 1
Variável 2	Intervalo 2	Incremento 2	Condição 2
Variável 3	Intervalo 3	Incremento 3	Condição 3
...

Variável n	Intervalo n	Incremento n	Condição n
------------	-------------	--------------	------------

É fornecido ao programa intervalos de entrada (mínimos, máximos e incrementos) correspondente a cada variável estudada. Com os intervalos definidos monta-se uma matriz com dados iniciais de entrada. Estes dados são simulados na rede de arquitetura fixa, e realiza-se os cálculos matemáticos fornecendo-se um valor se saída correspondentes aos dados de entrada.

Nova matriz é montada e seus dados são utilizados pela rede neural para previsão de um novo valor. Desta forma ocorre uma busca exaustiva do maior ou menor valor dentro dos intervalos especificados.

4.3 Análise dos fermentados

4.3.1 Análise de açúcares

O teor de açúcares redutores do meio (não fermentado) e dos meios fermentados foram determinados pelo método de determinação de açúcares redutores *Somogyi-Nelson* (NELSON, 1944; SOMOGYI, 1945), e a seguir feita a leitura das amostras fermentadas em espectrofotômetro (MILTON ROY 20D). O princípio básico deste método é a reação colorimétrica dos açúcares da amostra com o reativo cupro-alcalino, que na presença de reativo arseno-molíbico, forma um composto de coloração azul estável. A curva de calibração dos açúcares redutores foi feita tomando-se volumes das soluções de trabalho que continham de 10 a 100 μL /mL. A absorbância (em 535 nm) lida no espectrofotômetro foi convertida em concentração pela seguinte curva de calibração:

$$y = 213,15 A + 9,8254 \quad (4.1)$$

$$c = y \frac{F_{\text{diluição}}}{1000} \quad (4.2)$$

Onde:

A é a absorvância (adimensional)

c é a concentração molar mol/dm³

$F_{\text{diluição}}$ é o fator da diluição utilizada

-Análise de açúcares totais.

A determinação de açúcares totais foi feita pela hidrólise ácida dos açúcares não redutores e posterior análise pelo método de *Somogyi-Nelson*.

4.3.2 Análise de ácido fumárico

-Extração do ácido fumárico das amostras sólidas filtradas

As amostras de material fermentado foram dissolvidas em 20 mL de água para cada dois gramas de amostra, deixadas em contato por 24 h para solubilizar o ácido fumárico, centrifugadas e filtradas em filtros de 0,45 µm e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência.

-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

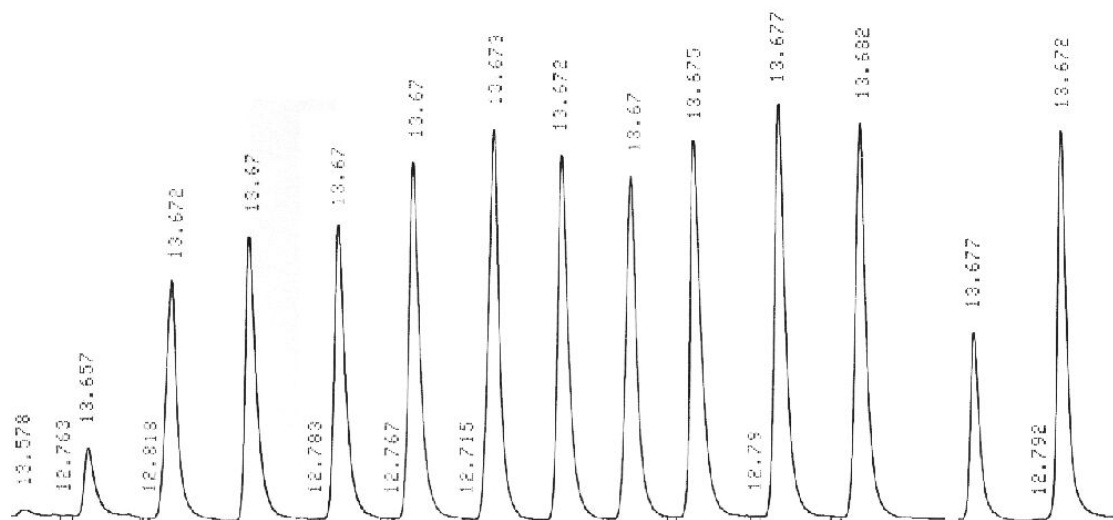
A análise do ácido fumárico por cromatográfica foi feita em coluna BIO-RAD Aminex HPX 87H (300 x 7,8 mm). Essa coluna separa os solutos com base nas diferentes afinidades das substâncias pelo copolímero sulfonado de estireno e divinil benzeno que é depositado sobre uma base de sílica gel, dando a ela um caráter hidrofóbico (de baixa polaridade). A vazão da bomba de fase móvel (*Shimadzu* DGU-2A) foi de 0,6 mL por minuto. A temperatura do forno da coluna (*Shimadzu* CTO – 10A) foi de 60° C. O meio eluente é uma solução de ácido sulfúrico 0,005 mol/L em água filtrada em membrana de porosidade de 0,45 µm. A pressão utilizada variou entre 5 e 6 MPa. O volume padrão injetado foi de 20 µL. Os tempos de retenção para a glucose e para o ácido fumárico foram 9,08 e 13,98 minutos respectivamente. As concentrações das amostras foram feitas contra padrão externo de 1 e 2 g/L, de ácido fumárico e glucose. A leitura das concentrações das frações é feita por um detector de índice de refração (*Shimadzu* RID-10A). Integrador *Shimadzu* modelo CR – 6A. Na figura 4.2 o aparelho *Shimadzu* de cromatografia líquida de alta eficiência utilizado.

FIGURA 4.2 CROMATÓGRAFO *SHIMADZU* MODELO CTA – 10A



A figura 4.3 mostra os picos de CLAE das amostras dos fermentados e dos padrões 1g/L e 2g/L.

FIGURA 4.3 CLAE DAS AMOSTRAS DO ENSAIO 5:



Onde : Os dois últimos picos são os padrões de 1g/L e 2g/L e os doze primeiros são das amostras e indicam a produção de ácido fumárico medida a 13,7 minutos de eluição.

-Umidade

A análise da umidade foi feita pelo método termogravimétrico. Logo após o término das fermentações, foram retiradas alíquotas das amostras para a determinação de umidade em estufa a 100° C.

4.3.3 Análise do crescimento micelial

O crescimento micelial foi determinado indiretamente pela variação da taxa de proteínas que, por sua vez, foi limitado pela quantidade de nitrato de potássio adicionado ao meio.

-Análise de proteínas

O teor de proteínas foi determinado pelo método Stutzer (VERVACK, 1973). A proteína real (P.R) foi precipitada a quente por hidróxido de cobre (sulfato de cobre em meio alcalino), e filtrada sobre Büchner. O filtrado foi lavado com água, depois com álcool etílico a 3,3% de éter. Em seguida o nitrogênio protéico foi determinado pelo método de Kjeldhal (ADOLFO LUTZ, 1967).

4.4 Fermentação em colunas

Um dos aspectos mais críticos da fermentação no estado sólido é estimação da biomassa. É muito difícil determinar a variação de biomassa a partir de pesagem pois esta fica de certa forma impregnada no meio de cultura e não dá para se distinguir o que é biomassa e o que é substrato. Então a avaliação do crescimento é feita por medidas indiretas da produção de biomassa como o método Stutzer-Kjeldhal. Outro método para determinação de produção de biomassa (crescimento) é a medida de consumo de O₂, e produção de CO₂ pelo microrganismo. Neste trabalho foi realizado um estudo respirométrico do processo e os resultados estão apresentados nas figuras 5.12 e 5.15 do capítulo específico de discussão dos resultados.

Na fermentação em colunas foi empregado o meio sólido, conforme descrito na tabela 4.6

TABELA 4.6 CONDIÇÕES INICIAIS DA FERMENTAÇÃO EM COLUNAS

Material	Massa
Mandioca	200 g
CaCO ₃	9 g
KNO ₃	6,8 g
Sol Salina	45 g
água	400 g
esporos ³	80 g
Massa seca	29,1%
Umidade	70,9%

A umidade da amostra é limitada ao teor de água adsorvida no meio sólido, pois a água em excesso escorre do suporte e causa contaminação da parte inferior da coluna.

Para as colunas a relação C/N foi de 29,30.

A fermentação foi feita a 30° C durante 8 dias e as vazões de aeração foram as seguintes:

40; 100; 140 e 180 mL^N/min⁴ em duplicata. Os teores de ácido fumárico produzido foram analisados em aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) conforme descrito no item 4.3.2.

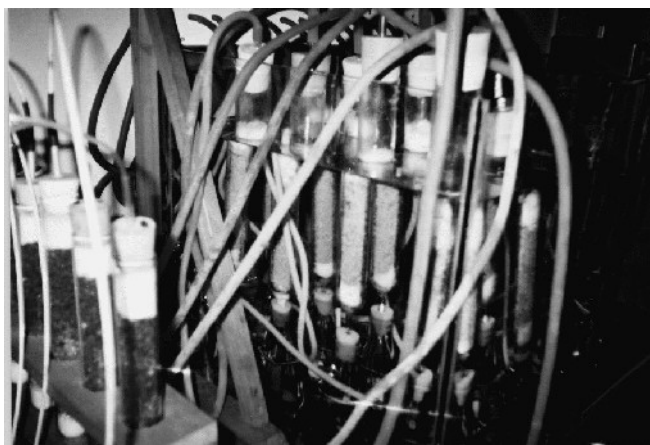
4.4.1 Respirometria

Foi feito também um acompanhamento do crescimento do microrganismo analisando-se os gases efluentes da coluna de fermentação por cromatografia gasosa utilizando-se as colunas conforme mostra a figura 4.4.

³ A taxa de esporos foi de 10⁷.

⁴ mL^N/min À 25° C 760 mmHg.

FIGURA 4.4 EQUIPAMENTO UTILIZADO EM RESPIROMETRIA



A análise dos efluentes gasosos permite estudar a respiração dos fungos cultivados em fermentação no estado sólido. Estas análises de produção de CO_2 e consumo de O_2 permitem distinguir as diferentes fases do processo da fermentação, numa análise contínua e não destrutiva (VANDENBERGHE, 2000).

O cromatógrafo gasoso utilizado na análise da concentração de gases efluentes na coluna é um *Shimadzu* GC-8A equipado de um rotâmetro e um detector (celas de condutividade térmica) e de um forno que permite ajustar a temperatura de modo isotérmico. Este dispositivo é usado em modo contínuo graças a um injetor automático de amostras. A coluna utilizada para separar os componentes do gás efluente das colunas de fermentação foi uma coluna concêntrica de tipo Alltech CTRJ. As características do cromatógrafo a gás eram as seguintes:

Detector: condutividade térmica

Temperatura: 60o C isotérmica

Fase móvel: Hélio

Vazão do eluente: 30 mLN/min.

Pressão do eluente: 1 bar

Volume injetado: 0,3 ml

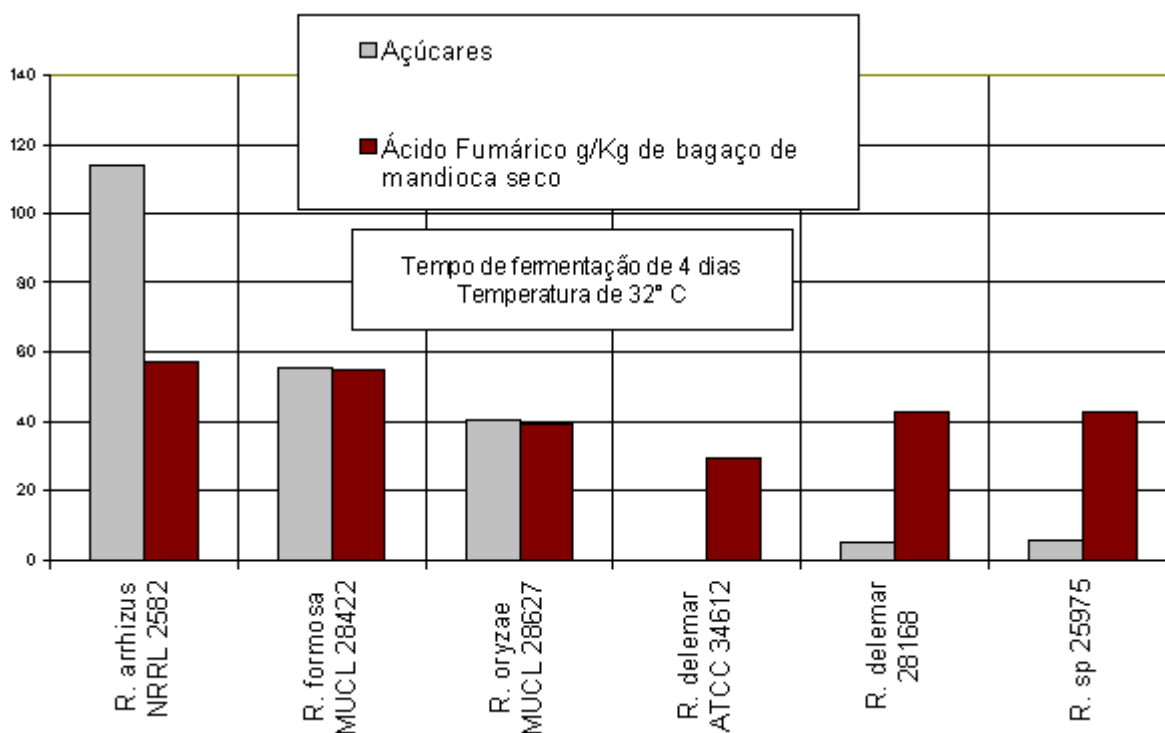
A válvula automática colhia amostras de 15 em 15 minutos, como haviam 8 colunas diferentes, a cada 15 minutos gases efluentes de uma coluna diferente eram analisados. Como o objetivo do experimento era estabelecer a cinética do crescimento do microrganismo, após 120 minutos o processo era reiniciado automaticamente. Os gases analisados foram CO₂ e O₂.

5 Resultados e Discussão

5.1 Seleção da melhor cepa para produção de ácido fumárico

Os resultados das fermentações com as cepas testadas estão apresentados nos gráficos da figura 5.1

FIGURA 5.1 CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO FUMÁRICO E AÇÚCAR REDUTOR NA FERMENTAÇÃO PARA SELEÇÃO DA CEPA MAIOR PRODUTORA DE ÁCIDO FUMÁRICO



Com base nos dados mostrados na figura 5.1, foi escolhida a cepa *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 para fazer os estudos de otimização das condições de cultivo para a produção de ácido fumárico. Esta cepa foi escolhida por ter a maior produção de ácido fumárico, verificada também em estudos fermentativos mostrados no anexo C. No

gráfico da figura 5.1 aparecem os valores de açúcares redutores, determinados pelo método de Somogyi-Nelson descritos nos item 4.3.1.

A importância da determinação da concentração de açúcares está ligada à capacidade de metabolismo do substrato pelo fungo. Embora no gráfico (figura 5.1) não houvesse um aumento significativo de ácido fumárico produzido, a produção de açúcares a partir do amido demonstra o potencial que a cepa tem para hidrolisar o amido, produzindo açúcar fermentescível.

No anexo C está a maior produção de ácido fumárico que cada cepa apresentou a uma mesma condição específica (32° C, taxa de inoculação 10^8 esporos por grama de bagaço de mandioca seco, pH de 7,2, umidade inicial de 78% e tempo de 8 dias). Esses resultados ajudaram na escolha da cepa *R. arrhizus* NRRL 2582 como a maior produtora de ácido fumárico com uma produção de 71,1 g de ácido fumárico por kg de bagaço de mandioca seco.

5.2 Redes escolhidas

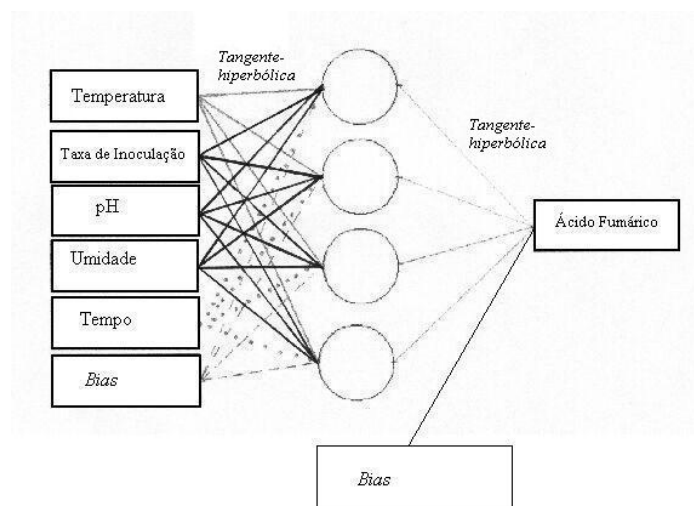
Para fazer a otimização das melhores condições de cultivo e para simular o comportamento da fermentação foram utilizadas as redes neurais. A tabela 5.1 mostra a configuração das melhores redes obtidas, (rede 1 e rede 2).

TABELA 5.1 CONFIGURAÇÕES DAS REDES 1 E 2.

	Rede 1	Rede 2
Função de ativação na camada de entrada	Tangente-hiperbólica	Tangente-hiperbólica
Função de ativação na camada de saída	Tangente-hiperbólica	Linear
Erro quadrático de treino	0,00053	0,00228
Erro quadrático de teste	0,0043	0,00232
Número de iterações	20000 de 20000	28565 de 30000
Intervalo de normalização	0,2-0,8	0,2-0,8
Fator de aprendizagem η	Variável	Variável
Nº neurônios camada oculta	4	3
Nº neurônios analisados	2 a 4	2 a 3
Nº de neurônios entrada	5	5
Nº de neurônios saída.	1	1
Nº de exper. (treino e teste)	29 e 11	23 e 12

A primeira rede escolhida foi a rede 1, e seus dados estão na tabela 5.1. Foi feito um diagrama representativo mostrado na figura 5.2.

FIGURA 5.2 DIAGRAMA DA REDE 1



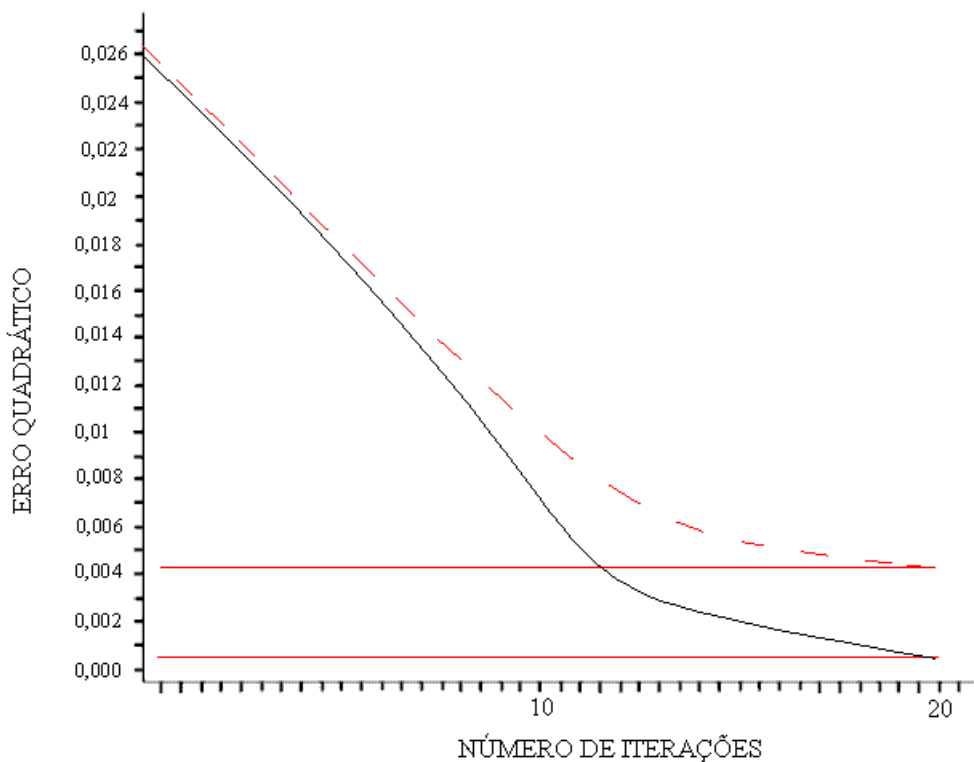
Os retângulos representam os neurônios das camadas de entrada e de saída, os círculos representam os quatro neurônios da camada oculta. As variáveis testadas para a otimização foram temperatura, taxa de inoculação, pH, umidade, e tempo de fermentação.

Existe uma limitação também para número máximo de neurônios em função do número de experimentos: cada linha da figura 5.2 representa um parâmetro da rede, por isso é preciso ter pelo menos 29 experimentos de treino, senão a rede seria superparametrizada. Foi feito um ensaio com uma rede de dez neurônios superparametrizada e o resultado foi que a rede passou a aprender ruídos (erros experimentais), e é esse o motivo pelo qual a rede tem que ter pelo menos o número de experimentos de treino igual ao número de linhas (parâmetros) do diagrama. Esta rede está apresentada no item 5.3.1 Outras redes testadas.

Foram feitas varreduras também de 1 a 4 neurônios na camada oculta (para a rede 1) e de 1 a 3 para a rede 2. Porém, como os erros das redes são acumulativos e uma rede de

um neurônio apenas não é capaz de abranger a complexidade do experimento em questão, decidiu-se mudar este intervalo para 2 a 3 e 2 a 4 respectivamente. A figura 5.3 mostra a evolução dos erros ao longo do experimento.

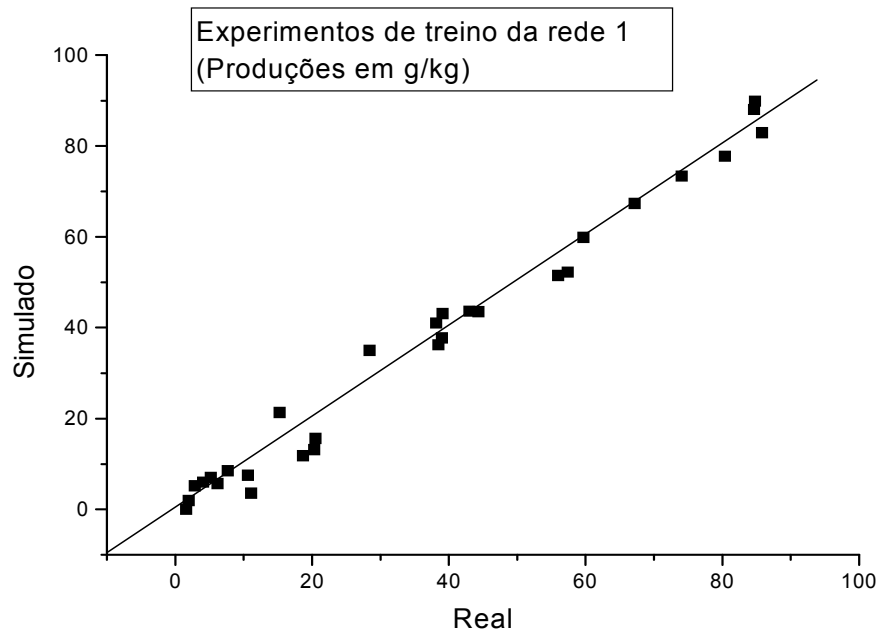
FIGURA 5.3 EVOLUÇÃO DOS ERROS QUADRÁTICOS DE TREINO E TESTE DA REDE 1



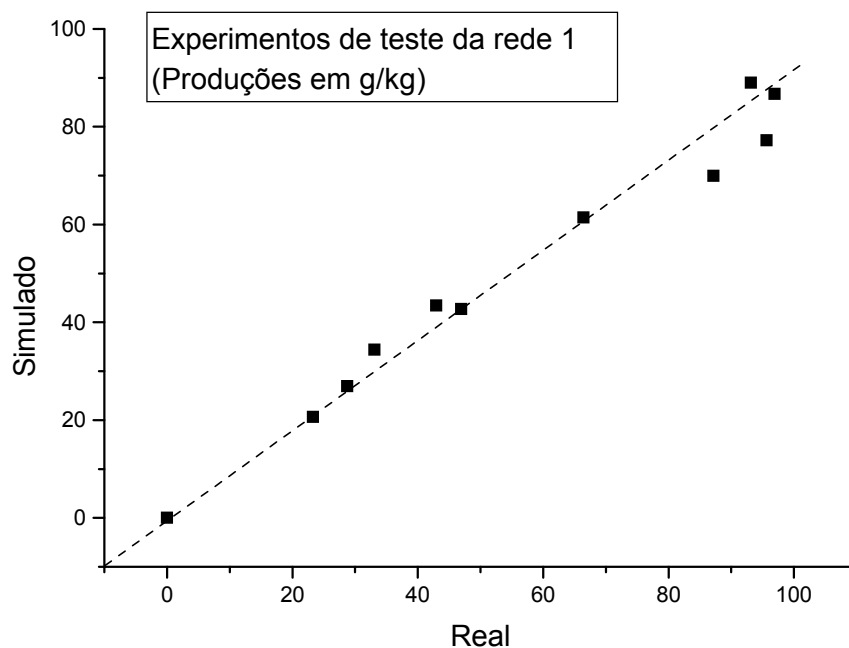
Em linha contínua os erros de treino e em linha tracejada os erros de teste. Na abscissa o número da iteração e na ordenada o erro quadrático.

FIGURA 5.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES EXPERIMENTAIS E OS CALCULADOS PELA REDE 1 (PRODUÇÃO DE ÁCIDO FUMÁRICO EM g/kg)

a) Experimentos de treino



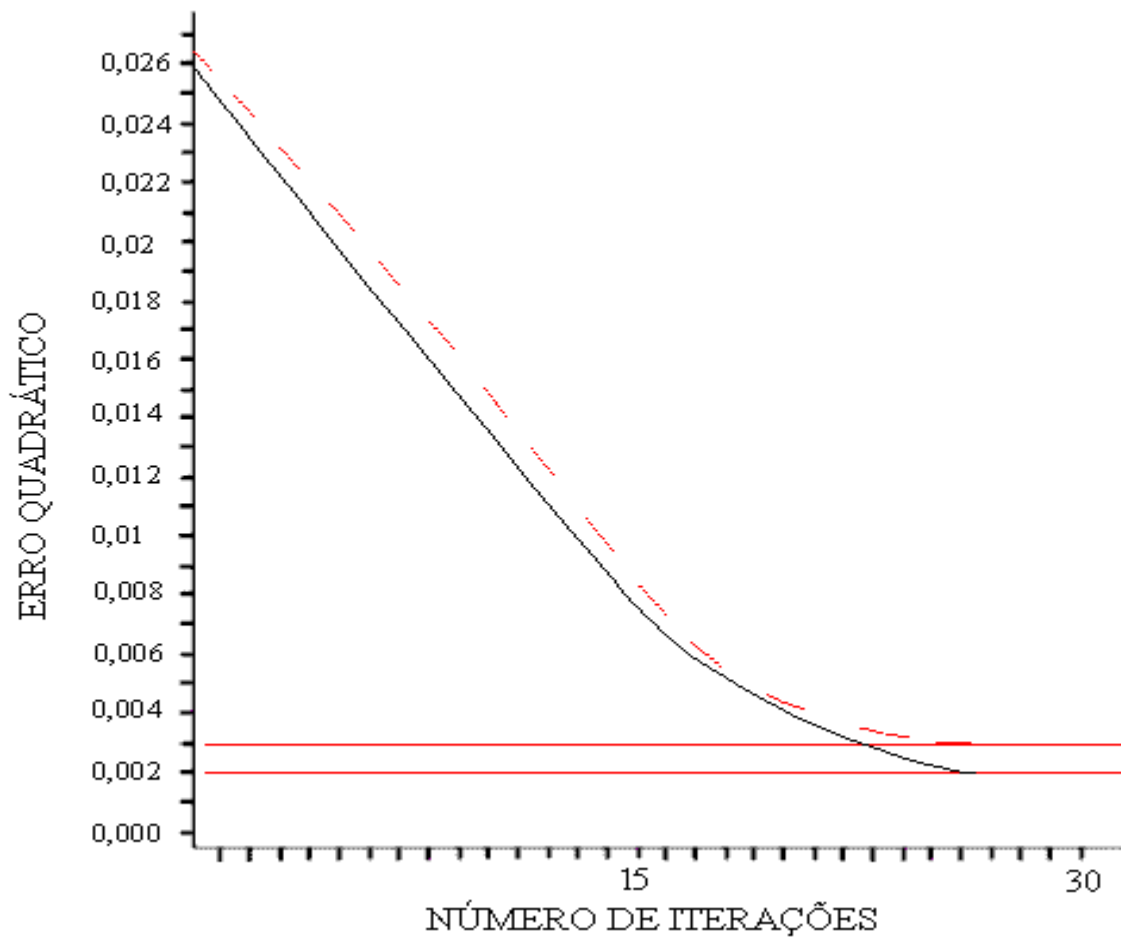
b) Experimentos de teste



Como pode ser visto na figura 5.4 os pontos simulados estão bem próximos dos valores reais. Normalmente os erros de treino são menores que os erros de teste. Foram, portanto, calculados estes erros (utilizou-se o erro quadrático), e os resultados foram os seguintes: erro de treino 0,00053 e erro de teste 0,0043. Além disso estes erros estão dentro de parâmetros aceitáveis (BAUGHMAN & LIU, 1995).

Os erros da rede 2 estão apresentados nas figuras 5.5 e 5.6.

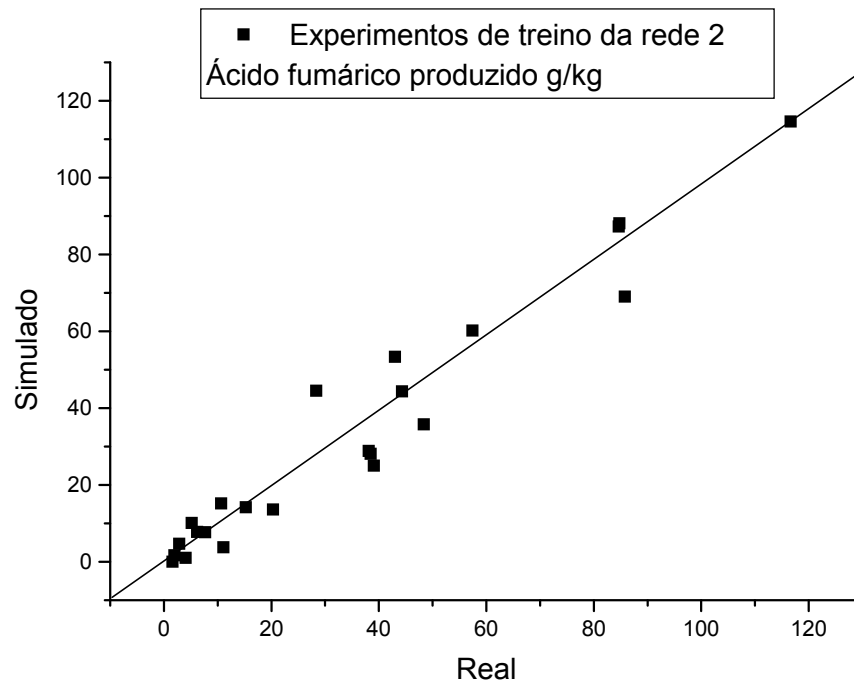
FIGURA 5.5 EVOLUÇÃO DOS ERROS QUADRÁTICOS DE TREINO E TESTE DA REDE 2



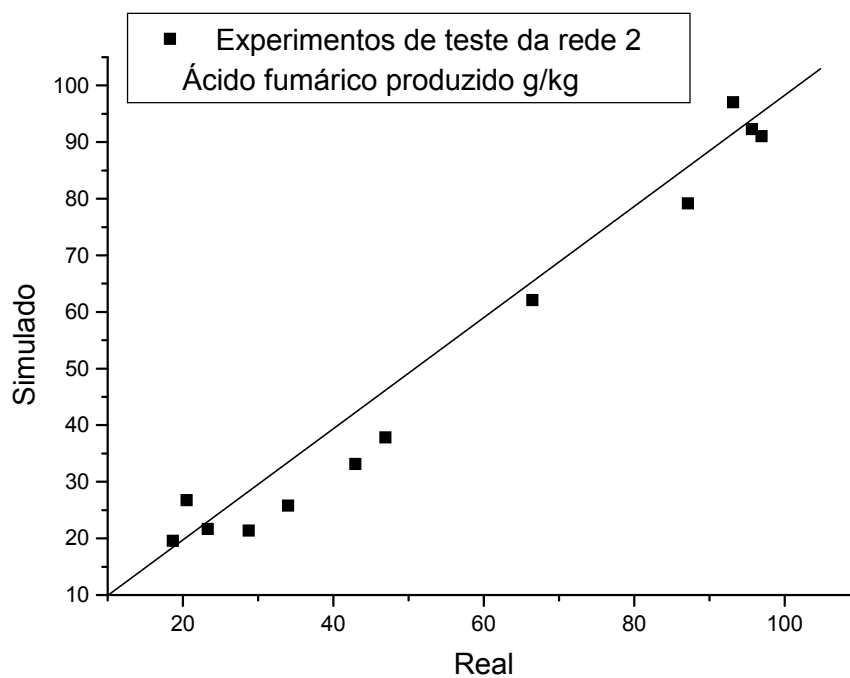
Em tracejado os erros de teste e em contínuo os erros de treino.

FIGURA 5.6 COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES EXPERIMENTAIS E OS CALCULADOS PELA REDE 2 (PRODUÇÃO DE ÁCIDO FUMÁRICO EM g/kg)

a) Experimentos de treino



b) Experimentos de teste



Como pode ser visto, nas figuras 5.5 e 5.6, os erros de treino e de teste estão dentro dos valores usuais, erro quadrático de treino de 0,00228 e erro de teste de 0,00232 (BAUGHMAN & LIU, 1995), os erros de treino e teste são o primeiro critério para a escolha de uma rede. Os dados foram analisados procurando-se redes que possuísem o menor erro de teste.

Posteriormente na validação das redes é que os dados foram comparados com os dos ensaios 4 e 5.

5.3 Resultados da otimização com as redes neurais das condições de cultivo.

O meio de fermentação descrito no item 4.2.1 foi implementado nos ensaios em laboratório que determinaram as condições a serem testadas pelas redes neurais. Utilizou-se o programa de varredura *otimrede* para rastrear as melhores condições de cultivo na umidade de 70%, e os resultados foram:

Temperatura de 32° C

Taxa de inoculação de 3×10^7

pH de 7,2

Umidade de 70%

Tempo de fermentação de 10 dias.

A metodologia para obtenção destes dados está descrita no item 4.2.2 (Otimização das condições de cultivo com as redes neurais) e os resultados estão apresentados na tabela 5.2

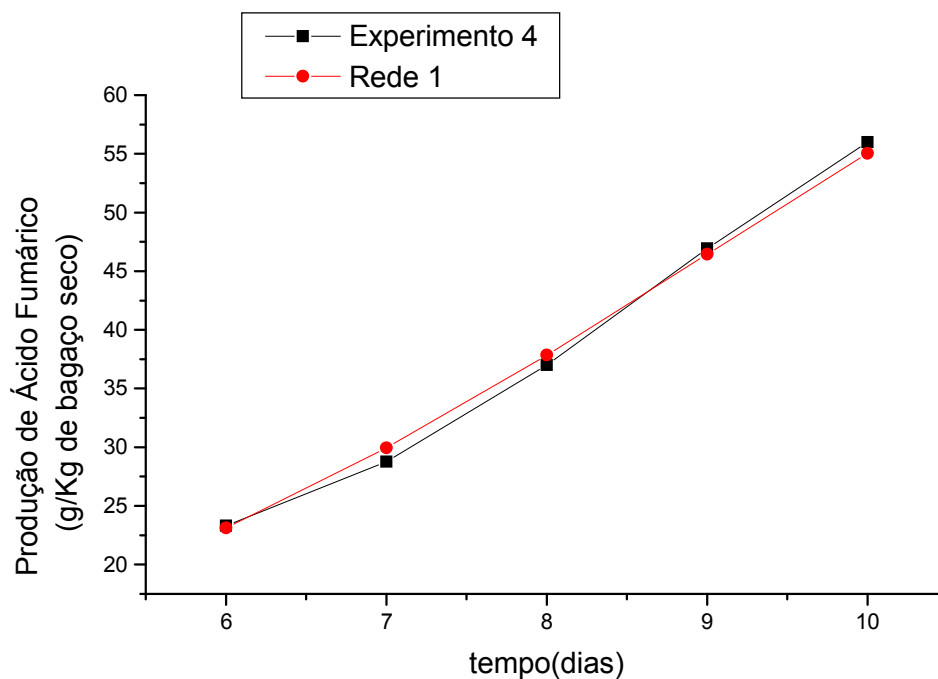
TABELA 5.2 BUSCA EXAUSTIVA FEITA PELO PROGRAMA OTIMREDE

PARA A REDE 1

Dados de entrada	Intervalo	Incremento	Melhor produção com
Temperatura (°C)	28-32	0,5	32
Taxa de inoculação (10 ^x)	6,00-8,00	0,25	7,50
pH	6,00-8,00	0,2	7,20
Umidade (%)	60-70	5	70
Tempo (dias)	7-10	1	10

Para se confirmar a validade da rede foi feita uma comparação com o ensaio 4 e os resultados estão mostrados na figura 5.7.

FIGURA 5.7 RESULTADOS DO ENSAIO 4 x REDE 1



Como pode ser visto na figura 5.7 os dados da rede 1 e do ensaio 4 estão com um erro médio menor que 1%, validando os valores da rede.

A produção máxima foi de 55,21 g de ácido fumárico por kg de bagaço de mandioca (valores simulados). Esta baixa produção foi devido ao consumo de água durante a fermentação, o que diminui muito a atividade de água ao longo do processo, se for analisada a tabela 5.3 que traz as umidades finais deste experimento, ficará evidenciado que houve uma diminuição da umidade causando uma queda na produção. Estas condições foram reproduzidas experimentalmente e obteve-se uma produção de 55,99 g de ácido fumárico por kg de bagaço de mandioca seco. Para resolver o problema foi feita uma otimização utilizando-se as umidades finais. A rede escolhida foi denominada de rede 2 (os dados da rede 2 estão na tabela 5.1), foi feita uma busca utilizando-se o programa *otimrede*, programa de varredura que verificou mais de 10000 condições, e os melhores resultados foram temperatura de 30° C, taxa de inoculação de 6×10^6 esporos por grama de bagaço de mandioca seco, pH de 7,2, umidade final de 80%, tempo de fermentação de 12 dias e produção de ácido fumárico de 114,6 g de ácido fumárico por kg de bagaço seco (valores simulados). Os resultados do programa *otimrede* estão na tabela 5.3.

TABELA 5.3 UMIDADES FINAIS DO ENSAIO 4.

Tempo(dias)	Umidades finais do ensaio 4	U _f ensaio 5
1	68,8%	78,0%
2	66,7%	77,1%
3	67,7%	78,1%
4	68,0%	77,6%
5	70,3%	77,2%
6	65,8%	79,4%
7	63,2%	74,7%
8	62,9%	74,5%
9	65,9%	77,9%
10	61,8%	74,6%
11		71,5%
12		74,5%

TABELA 5.4 BUSCA EXAUSTIVA FEITA PELO PROGRAMA OTIMREDE
PARA A REDE 2

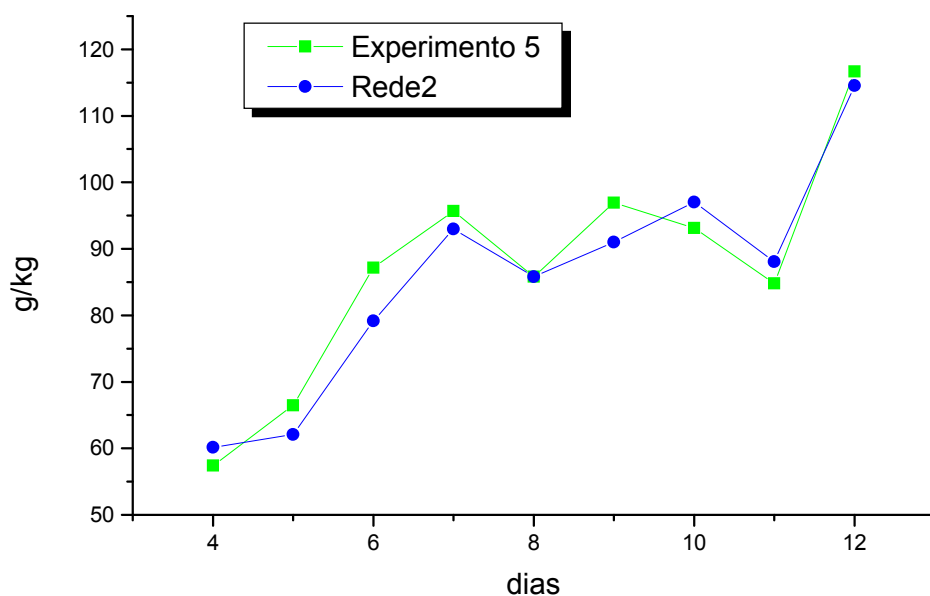
Dados de entrada	Intervalo	Incremento	Melhor com produção
Temperatura(°C)	28-32	0,5	30
Taxa inoculação(10 ^x)	6,00-8,00	0,25	6,75
pH	6,00-8,00	0,4	7,2
Umidade Final (%)	65-80	5	80
Tempo (dias)	7-12	1	12

Estas condições foram reproduzidas experimentalmente e obteve-se uma produção de 116,63 g de ácido fumárico por kg de bagaço de mandioca. Conforme pode ser visto nos

dados do ensaio 5 mostrado na figura 5.8. Neste experimento foi empregada uma umidade mais alta. O objetivo deste experimento era realizar uma fermentação onde fosse garantida a existência de umidade acima de 70% durante todo o processo de fermentação. Para tanto foi realizada uma fermentação onde a umidade inicial foi de 81,4%, mesmo apresentando água livre. Com isso, a umidade final nunca esteve abaixo de 70% conforme tabela 5.3. Assim foi possível garantir o metabolismo normal do microrganismo ao longo de todo o experimento com altas produções de ácido fumárico.

No ensaio 5 foi utilizada temperatura de 30° C, taxa de inoculação de 6×10^6 , pH de 7,2, umidade inicial de 81,40%, e tempo variando de 1 a 12 dias. Os experimentos foram realizados em duplicata e os resultados apresentados são a média aritmética das duas medidas.

FIGURA 5.8 RESULTADOS DO ENSAIO 5 X REDE 2



Observa-se no gráfico da figura 5.8 que os dados experimentais estão com um erro médio menor que 2%. É importante salientar que a curva simulada varia em função dos mesmos parâmetros que determinaram a variação da curva real, tempo e umidade. No décimo primeiro dia houve uma queda de produção devido a uma redução da umidade, provavelmente por evaporação.

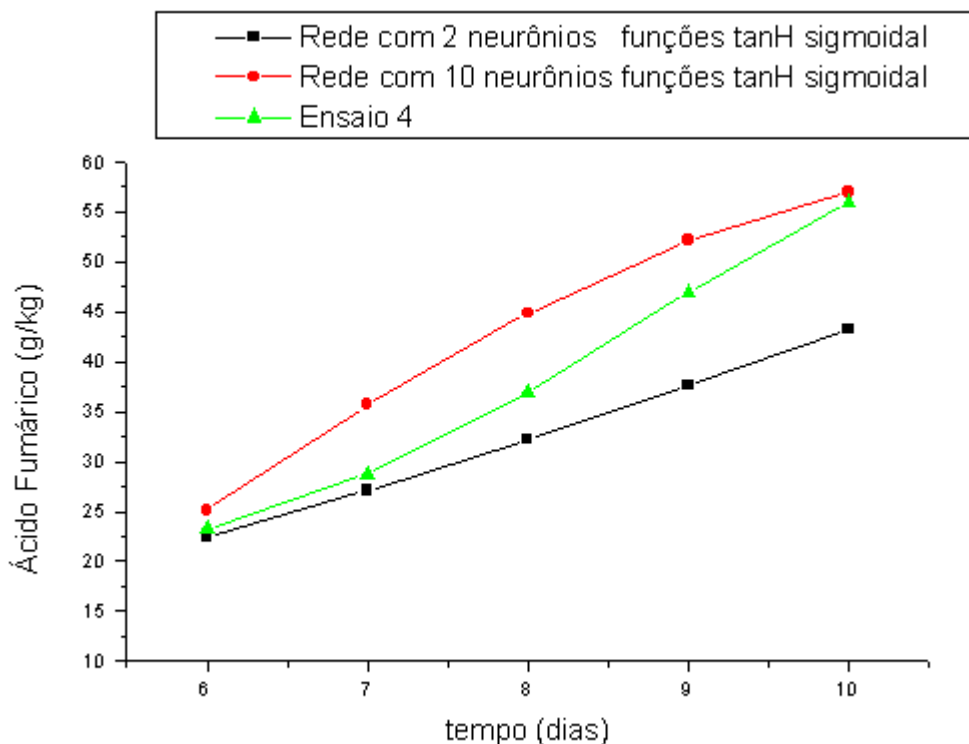
5.3.1 Outras redes testadas

Foram feitos vários testes com várias redes, na figura 5.9 estão apresentadas redes obtidas em 20000 épocas (iterações), ambas feitas com base na umidade inicial e comparadas com o ensaio 4. A escolha do ensaio 4 e foi baseada na simplicidade do mesmo como pode ser visto na figura 5.7. O critério de seleção era escolher as redes que apresentassem o menor erro quadrático para experimento de teste. Entretanto algumas redes não precisaram ser testadas por terem um número muito baixo ou muito alto de neurônios. Segundo HAYKIN (2001) um critério muito utilizado, onde o tamanho da rede é importante, é o método construtivo, já discutido no item 3.1, utilizado neste experimento, onde se começa com um número baixo de neurônios para chegar até a complexidade desejada. Existe um número máximo e mínimo de neurônios determinados pelo número de experimentos de treino. No exemplo em questão haviam 29 experimentos de treino então era necessário de dois a quatro neurônios na camada oculta.

A rede com dois neurônios, muito simples, traçou praticamente uma reta. O que significa que ela foi incapaz de representar toda a complexidade da curva e do processo, avaliando como ruído a inflexão da mesma, além de apresentar um desvio de 10° em relação à curva original conforme pode ser visto na figura 5.9. Por outro lado, se a rede possuir muitos neurônios ela ficará superparametrizada e tenderá a fazer uma curva muito complicada aprendendo ruídos que não fazem parte do processo como pode ser

visto no exemplo da figura 5.9 onde uma rede com 10 neurônios apresentou uma inflexão diferente da curva obtida pela plotação dos resultados do ensaio laboratorial.

FIGURA 5.9 OUTRAS REDES TESTADAS



5.4 Comparação dos resultados

5.4.1 Produção de ácido fumárico

Foi feita uma tentativa de comparação dos resultados obtidos nesta tese com os resultados de outros autores, mas surgiram dificuldades pois eles usaram diferentes bases de cálculo, ou em diferentes condições de substrato. Contudo, os dados de RHODES (1959) permitiram fazer algumas comparações.

RHODES (1959), obteve 97 g de ácido fumárico por litro de meio utilizando uma solução de glucose como substrato.

Convertendo-se os cálculos de Rhodes para a base de cálculo utilizada neste trabalho ele produziu 112 g de ácido fumárico / kg de glucose, praticamente igual ao obtido neste trabalho 116,6 g de ácido fumárico por kg de bagaço de mandioca seco. Mas não há nenhum indício que este teria sido o melhor resultado de produção de ácido fumárico até agora encontrado, não há um critério de avaliação objetivo, e também há a produção via química de ácido fumárico sem grau técnico para consumo humano e pecuário, que não foi contabilizada.

CARTA (1999) conseguiu 21,3 g/L utilizando hidrolisado de bagaço de mandioca na concentração de 120 g/L de açúcar redutor, na mesma base de cálculo de Rhodes, em meio líquido.

GANGL *et al.* (1990) obteve concentração de 73,3 g/L de ácido fumárico a partir de uma solução com 102 g/L de glucose.

SOCCOL (1994) conseguiu uma produção de 140 g/L, partindo de uma solução de glucose (180 g/L) imersa em um suporte de bagaço de cana.

5.4.2 Precisão dos resultados obtidos pelas redes neurais

Na validação da rede 2 em comparação com ao ensaio 5 o erro médio foi menor que 2%. Já os resultados simulados pela rede 1 em relação ao ensaio 4 tiveram um erro médio abaixo de 1%.

5.4.3 Comparação das condições de cultura na fermentação do bagaço de mandioca por fermentação no estado sólido.

Os resultados obtidos nesta tese foram determinados com a cepa *R. arrhizus* NRRL 2582, mas muitos dos resultados foram semelhantes aqueles obtidos por outros autores com cepas diferentes.

Nestes trabalhos, em posse de algumas informações sobre a fisiologia do crescimento do microrganismo, procurou-se avaliar o efeito de alguns fatores (temperatura, taxa de inoculação, umidade, pH inicial e tempo de fermentação) na fermentação do bagaço de mandioca em meio sólido. Esses fatores são fundamentais na otimização das condições de cultura em meio sólido.

A temperatura ótima para o crescimento do microrganismo e para a produção de ácido fumárico obtida neste trabalho foi de 30° C, para umidade inicial de 81,4% e de 32° C para umidade inicial de 70% coerente com o resultado de SOCCOL (1994). A faixa de temperatura ótima para o crescimento do fungo em meio sólido situa-se entre 28 e 32° C. O crescimento nas temperaturas de 28 e 32° C é muito mais importante pois, uma camada branca de micélio envolve totalmente o bagaço de mandioca, enquanto que nas temperaturas de 22 e 36° C não se verifica um crescimento tão intenso também coerente com os resultados desta tese. Nas temperaturas de 28 e 32° C o pH permaneceu ligeiramente mais elevado após a fermentação em comparação aos valores inferiores obtidos com o crescimento do fungo nas temperaturas de 28 e 36° C, indicando baixa produção de ácido fumárico. Neste trabalho ocorreu uma redução da umidade em todos os experimentos, em SOCCOL (1994) ocorreu um aumento no seu teor após a fermentação nas diferentes temperaturas estudadas, com um aumento bem mais importante para a temperatura de 32° C. Nos dados obtidos nesta tese observou-se uma perda de umidade, com diminuição da atividade de água provavelmente devido ao longo tempo de fermentação e à falta de mecanismos para manter a atmosfera úmida.

Neste trabalho foi verificado que as taxas de inoculação mais baixas resultavam em produção mais alta de ácido fumárico, segundo outros autores a taxa de inoculação dos esporos deve ser suficiente para assegurar uma inoculação homogênea do substrato e também um início de crescimento rápido de modo a evitar uma eventual competição com os contaminantes.

No entanto, a taxa de inoculação não deverá ser muito importante, porque uma densidade de esporos muito elevada pode provocar fenômenos de inibição e redução da porcentagem de germinação (RAIMBAULT, 1997). Uma dose de inóculo de 2×10^7 esporos/g de bagaço de mandioca é suficiente para se obter um bom crescimento.

ORIOLO (1987) trabalhando com *Aspergillus niger* descreveu que taxas de inoculação de cerca de 10^6 a 10^7 esporos/g de suporte (bagaço de cana) são suficientes para um bom crescimento dessa espécie de fungo. LAUKEVICS *et al.* (1985) assinalaram que os fenômenos de interferência estérica poderão ter lugar. BARRIOS *et al.* (1988) observaram fenômenos de inibição da germinação dos esporos quando taxas de inoculação superior a 10^8 esporos/g de substrato são utilizadas.

No estudo sobre o efeito da taxa de inoculação no crescimento de *R. oryzae* 28627, pode-se verificar em SOCCOL (1994) que a taxa ótima de inoculação foi de 10^5 esporos por grama de bagaço seco. O crescimento do fungo foi medido de forma indireta através da avaliação protéica após a fermentação.

SOCCOL (1994) verificou que o valor final em proteínas, diretamente relacionado ao crescimento fúngico, para a taxa de inoculação de 10^5 esporos por grama de bagaço de mandioca foi de 11,67 % maior que os 5,3 % obtidos com a taxa de inoculação de 10^8 esporos/g de bagaço de mandioca seco. A taxa de inoculação está relacionada com a concentração da fonte de carbono no substrato. Neste trabalho a melhor produção foi obtida com uma taxa de 6×10^6 esporos por grama de bagaço de mandioca seco, confirmando a tendência de se obter produções maiores com taxas de inoculação entre 10^5 e 10^6 esporos por grama de substrato seco.

O efeito do pH na biotransformação do bagaço de mandioca por *R. oryzae* 28627 foi de fundamental importância. Os resultados obtidos, demonstram que o fungo

desenvolve-se melhor em pH próximo da neutralidade. Essa preferência ficou evidenciada quando se trabalhou com diferentes níveis de pH no bagaço de mandioca.

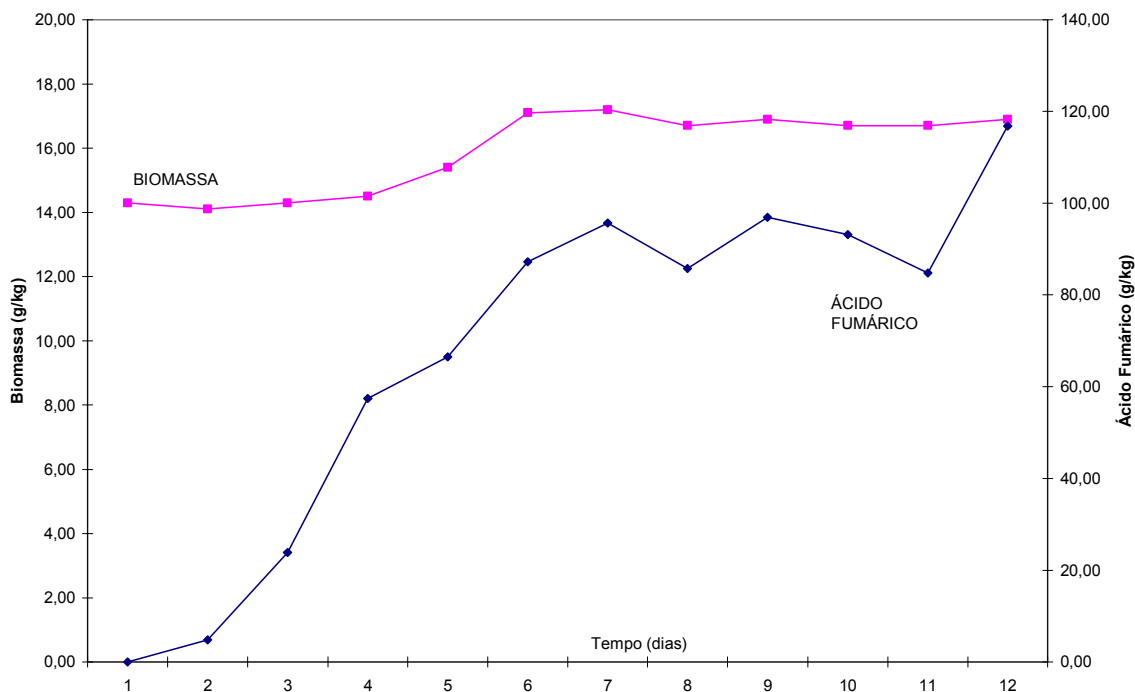
Os valores no crescimento micelial foram medidos através da proteína microbiana sintetizada. O pH 5,7 e 6,4 mostram ser os melhores para o crescimento do fungo no bagaço de mandioca, enquanto que pH variando de 4,7 a 5,4 apresentaram níveis protéicos inferiores. Estes dados são confirmados por SOCCOL (1994). No entanto neste trabalho fez-se a necessidade de se trabalhar com pH neutro, pois os valores de pH baixo dificultavam o crescimento do microrganismo, e a preocupação com contaminação foi constante e muitos trabalhos tiveram que ser refeitos devido a problemas de crescimento de microrganismos estranhos (principalmente *Aspergillus*) durante as fermentações.

A umidade ideal projetadas pelas redes 1 e 2 foi 70%, mas como havia consumo de umidade para a rede 2 utilizou-se as umidades finais. Para outros autores fungos são capazes de desenvolver-se em concentrações de umidade muito mais reduzidas que as exigidas por bactérias e leveduras. Por esta razão estudaram a faixa de umidade que permite o crescimento da cepa previamente selecionada. O crescimento de *R. oryzae* 28627 no bagaço mandioca foi avaliado em seis diferentes teores de umidade, variando de 50 a 80% (SOCCOL, 1994). A faixa de 60-75% forneceu boas condições para o desenvolvimento do microrganismo no bagaço mandioca. Contudo, a umidade inicial de 70% fornece condições ótimas para obtenção de taxas mais elevadas de crescimento, medida indiretamente através da proteína sintetizada. As umidades extremas, de 50 e 80% induzem a um menor crescimento e conseqüentemente menor valor protéico. NISHIO et al. (1979) assinalaram um aumento na velocidade específica de crescimento e produção de biomassa por *Aspergillus niger* quando a umidade do farelo de trigo foi elevada de 32 para 56%.

RAIMBAULT, 1980 trabalhando com *Aspergillus niger* e *Rhizopus spp* demonstrou que o teor de umidade ótimo para o crescimento dos fungos foi de 50-55%. Obteve um aumento da biomassa produzida durante a fermentação quando o conteúdo de água inicial eleva-se de 25,6 a 40,3%. Devido a tais fatos deve-se estudar a faixa de umidade que permite um crescimento ótimo de uma cepa em bagaço de mandioca.

Neste trabalho o tempo ótimo ficou entre 10 e 12 dias. Com outras cepas este tempo foi menor. SOCCOL (1994) apresenta a evolução cinética de diferentes parâmetros avaliados durante a fermentação do bagaço de mandioca cru por *R. oryzae* 28627 tais como a evolução do consumo de amido bem como a síntese de proteínas ao longo de 30 horas de fermentação. Aproximadamente 53% do amido presente no bagaço foi consumido durante a biotransformação. Após 30 horas de fermentação o nível em proteína real atinge valores da ordem de 12,8 g por 100 g de bagaço de mandioca seco. Isso representa um aumento no valor protéico de aproximadamente dez vezes em 30 horas de fermentação. SOCCOL (1994) obteve um excelente rendimento da ordem de 58,72% foi obtido entre o amido consumido e a proteína formada. Constatou uma ligeira elevação do pH nas primeiras 12 horas de fermentação, seguida de uma importante redução do pH nas horas seguintes atingindo valor de 4,6 no final da fermentação. SOCCOL (1994) considerou positiva essa redução de pH, devido a provável produção de ácido fumárico.

FIGURA 5.10 PRODUÇÃO DE BIOMASSA (PROTEÍNAS) DURANTE O ENSAIO 5



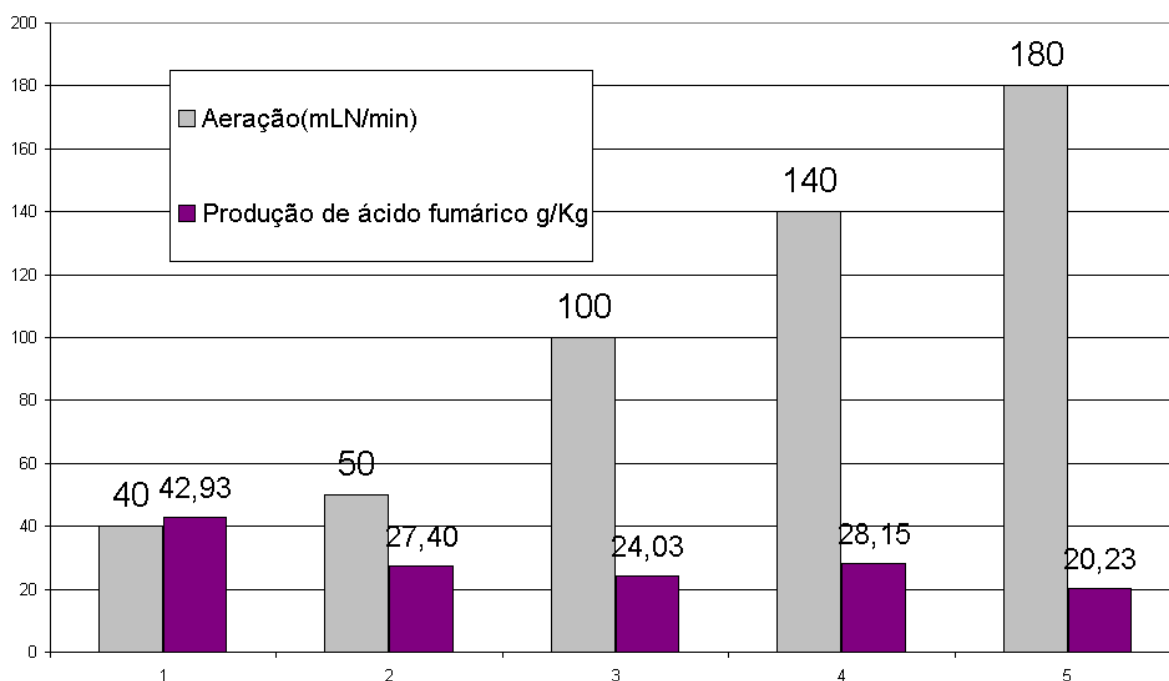
A relação C/N é importante limitadora do crescimento do microrganismo, favorecendo a economia do substrato para a produção do metabólito de interesse. Conforme mostrado no cálculo do anexo B, a relação C/N utilizada foi de 29,2.

Como pode ser visto na figura 5.10 a produção de ácido fumárico varia ao longo de todo o período de fermentação, mas a produção de biomassa atinge um patamar e pára devido à falta de nitrogênio para produzir novas células. Isto mostra que a quantidade de nitrogênio adicionado ao meio de cultivo foi ideal pois o microrganismo cresceu o suficiente para produzir o metabólito de interesse.

5.5 Fermentação em colunas de Raimbault e testes respiro-métricos de fermentação

Com o objetivo de avaliar a taxa de aeração necessária ao processo foi realizada a fermentação em colunas variando-se a taxa de aeração aplicada.

FIGURA 5.11 GRÁFICO QUE MOSTRA A VARIAÇÃO NA PRODUTIVIDADE DE ÁCIDO FUMÁRICO EM RELAÇÃO À TAXA DE AERAÇÃO DA COLUNA

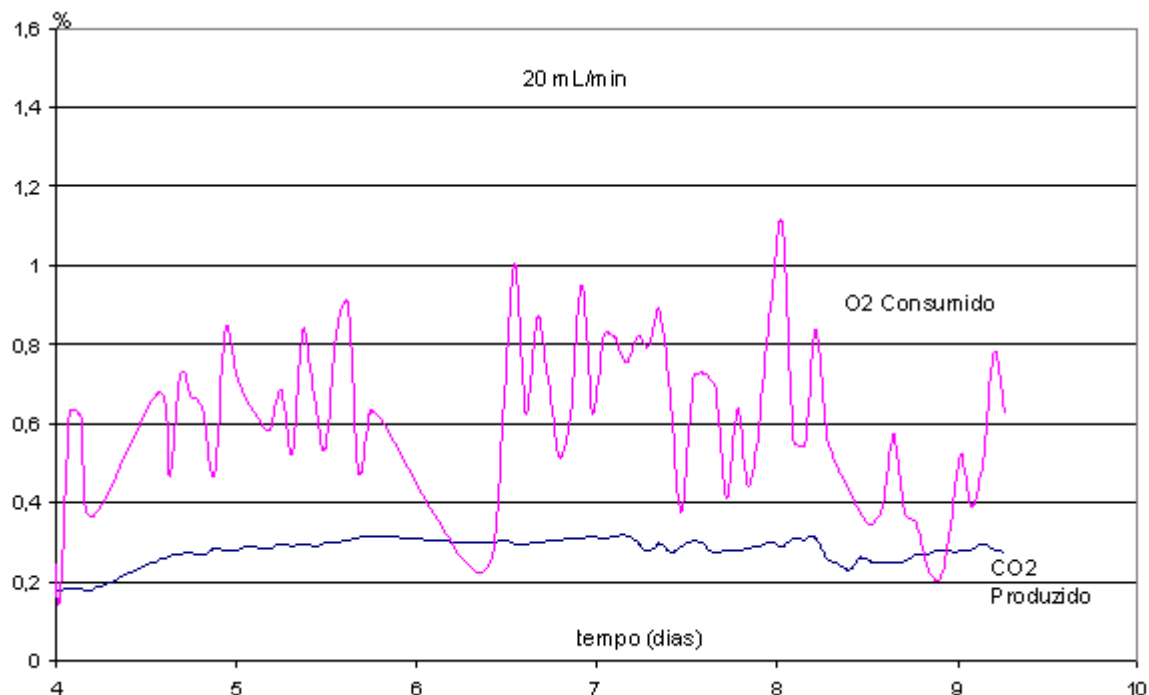


Observou-se que um aumento na taxa de aeração implica numa queda na produção de ácido fumárico, SOCCOL (1994), atribui esta queda ao aumento da respiração do fungo. Os testes 1, 2, 3, 4 e 5 foram feitos a vazões de ar de 40, 50, 100, 140 e 180 (mL^N)/min (O N sobrescrito significa que o medidor de vazão foi calibrado a 25° C e 760 mmHg). Em vermelho aparece a produção de ácido fumárico que tende a diminuir à medida que a vazão sobe até quatro vezes seu valor.

Um resultado semelhante na produção de outro metabólito foi encontrado por VANDENBERGHE (2000) que testou três taxas de aeração e três umidades diferentes e concluiu que as menores taxas de aeração são melhores para produção de ácido cítrico, em fermentação no estado sólido. Não obstante, tanto Vandenberghe quanto Soccol verificaram um aumento do crescimento do microrganismo utilizado com o aumento da aeração, confirmando também os resultados desta tese apresentados e discutidos a seguir.

Foi portanto feita uma análise da respirometria do *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582 em função da aeração, os resultados estão apresentados na figura 5.12 a 5.15.

FIGURA 5.12 RESULTADOS DA RESPIROMETRIA FEITA EM COLUNAS PARA UMA VAZÃO DE 20 mL^N /min. DE AR FORNECIDO À COLUNA EM FUNÇÃO DO TEMPO EM DIAS.



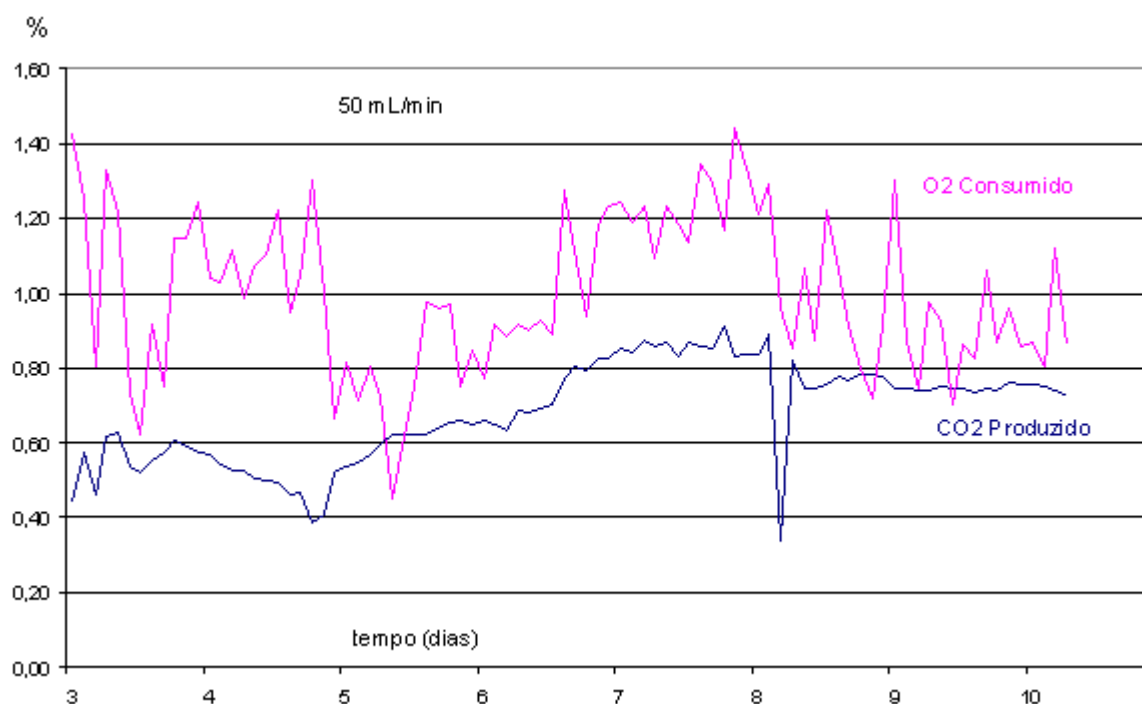
O O₂ consumido apresenta essas variações pois ele é função do ar fornecido pelo compressor. Pequenas regulagens (ajustes feitos diariamente na bomba em 20 mL^N/min) resultaram nessas oscilações.

Com a aeração média de 20 mL^N/min a quantidade de CO₂ produzido era em torno de 0,3% resultando num baixo crescimento. A relação destas duas curvas determinam se o processo é aeróbio ou anaeróbio (VANDENBERGHE, 2000). Esta relação (R) é dada pela equação 5.1:

$$R = \frac{CO_2 \text{ Produzido}}{O_2 \text{ Consumido}} \quad 5.1$$

Avaliando-se a curva de produção de CO_2 da figura 5.13, observou-se uma elevação na concentração de CO_2 no ar efluente da coluna de fermentação de uma média de 0,2% para 0,7%, com a variação das taxas de aeração de 20 para 50 $\text{mL}^{\text{N}}/\text{min}$. Esse aumento na produção de CO_2 corresponde a um aumento no crescimento do microrganismo.

FIGURA 5.13 RESULTADOS DA RESPIROMETRIA FEITA EM COLUNAS PARA UMA VAZÃO DE 50 $\text{mL}^{\text{N}}/\text{min}$. DE AR FORNECIDO À COLUNA EM FUNÇÃO DO TEMPO EM DIAS.



Para estudar a aerobiose do processo, foi feito o quociente do valor de CO_2 (0,84%) produzido e O_2 consumido (1,21%) no dia 8, e obteve-se uma relação de 0,69 que indica que nesse dia o crescimento já estava completo e esta taxa de aeração já era suficiente para o microrganismo. O fungo tende a passar para a anaerobiose quando houver alguma condição que o leva a tal, por exemplo excesso de indivíduos, ele adapta-se à nova condição e por esse mesmo motivo deve-se controlar o crescimento do microrganismo com uma relação carbono nitrogênio ideal, tal qual a comentada no item 5.4.3,

Essa mudança de comportamento do microrganismo é uma defesa natural, se ele não mudasse o metabolismo a biomassa produzida começaria a perder viabilidade logo no oitavo dia. Desta forma conseguem uma sobrevivência, muito embora com baixo metabolismo. Este dado é comparado com o pequeno aumento de ácido fumárico produzido após o oitavo dia de fermentação mostrado na figura 5.13

Com uma taxa de $100 \text{ mL}^{\text{N}}/\text{min}$ figura 5.14 a concentração de CO_2 no gás efluente da coluna caiu de 0,7 para 0,3% de CO_2 produzido, e a relação CO_2/O_2 no dia 8 (0,33/0,56) foi para 0,59 indicando que o aumento da taxa de aeração e o excesso de oxigênio com uma vazão de $100 \text{ mL}^{\text{N}}/\text{min}$, foi prejudicial ao crescimento do microrganismo estudado. A queda na produção de CO_2 de 0,7 para 0,35 determinou que um aumento na taxa de aeração resulta numa diminuição na taxa de crescimento, apesar de o *R. arrhizus* ser um microrganismo aeróbio o aumento da respiração, pode compensar o efeito da aeração.

FIGURA 5.14 IDEM PARA UMA VAZÃO DE $100 \text{ mL}^{\text{N}}/\text{min}$.

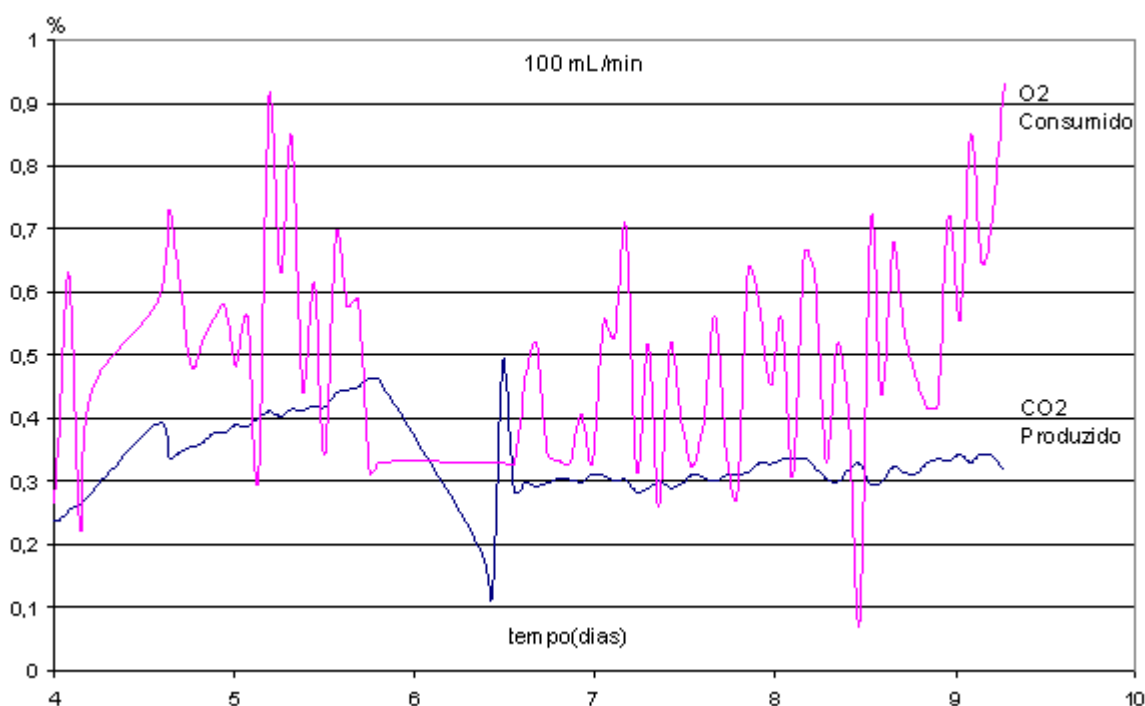
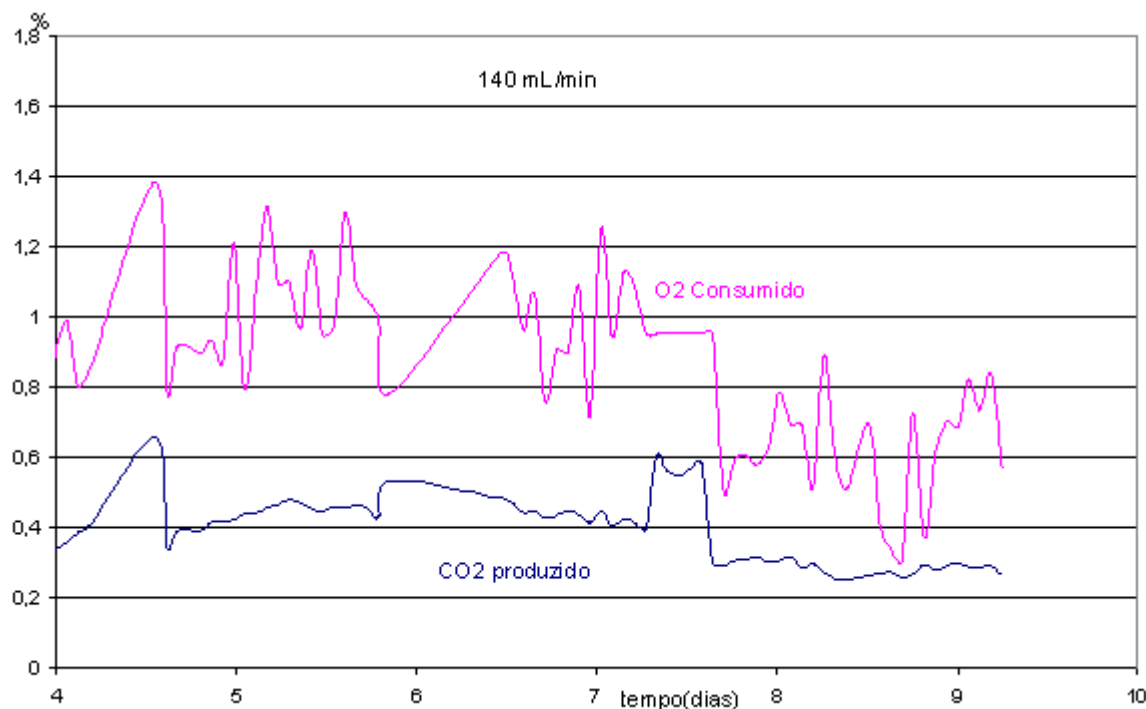


FIGURA 5.15 IDEM PARA UMA VAZÃO DE 140 mL^N/min.

Para uma vazão de 140 mL^N/min indicador de crescimento, produção de CO₂, tomando como base para avaliar o crescimento do fungo *R. arrhizus* NRRL 2582, ficou em torno de 0,4% e a relação CO₂/O₂ no dia 8 mudou para 0,39 indicando que o processo não é beneficiado com o aumento da taxa de aeração e que o microrganismo tem crescimento limitado em tais condições.

Então como resultado desses gráficos pode-se concluir que houve uma diminuição do crescimento de aproximadamente 0,8% de CO₂ numa vazão de ar de 50 mL^N/min para 0,3% onde foi utilizada vazão de ar de 140 mL^N/min, demonstrando que ar em excesso não é só prejudicial para a produção de ácido fumárico, mas também para o crescimento do microrganismo, conforme mostra a figura 5.15.

6 Conclusão

A melhor contribuição do trabalho foi a verificação da viabilização da utilização das redes neurais na otimização da biotransformação de resíduos em produtos com maior valor agregado. Conforme foi descrito na introdução, foram feitas comparações entre os rendimentos obtidos por vários autores e o rendimento obtido neste trabalho esteve bem próximo ao obtido por SOCCOL (1994). Fica evidente o cunho social do trabalho que usa um resíduo agroindustrial para produzir um metabólito fermentado com maior valor agregado e com menor impacto sobre o meio ambiente, conclui-se que o método de produção de ácido fumárico a partir de um resíduo sólido é mesmo a fermentação no estado sólido.

A FES tem rendimento similar à fermentação submersa (SOCCOL, 1994). A produção de ácido fumárico a partir de resíduos da agroindústria de mandioca por fermentação no estado sólido apresenta uma segunda vantagem sobre a fermentação submersa. Embora esta também consuma resíduos para produção de um produto com maior valor agregado, a fermentação submersa gera um aumento no volume total do produto final, inviabilizando seu emprego em grande escala como reutilização de resíduos, pois em qualquer processamento a primeira coisa que se busca é a redução de volume. Ao empregar a fermentação no estado sólido para a biotransformação de bagaço de mandioca em ração animal, por exemplo, ocorre o reaproveitamento completo do resíduo.

O bagaço de mandioca mostrou ser um substrato apropriado para produção de ácido fumárico por FES, viabilizando o consumo do amido presente no bagaço de mandioca, no seu estado natural (sólido) sem a necessidade de gelatinização ou solubilização.

As redes neurais são uma ferramenta viável para otimizar uma condição de processo. Uma vez estabelecida a rede que melhor reproduz o processo pode-se, aplicando-se esta ferramenta, testar quaisquer conjunto de condições experimentais e projetar o resultado.

Foi visto que com o crescimento do microrganismo ocorre aumento de umidade após perda de umidade para o meio ambiente na seqüência do processo. Em sistemas onde não é possível manter a umidade do ambiente, um adicional de umidade inicial pode suprir o esta perda.

A umidade é um parâmetro fundamental para o processo fermentativo estudado em fermentação no estado sólido. Observou-se que em sistemas onde não era possível adicionar-se água durante o processo, a produção de ácido fumárico foi baixa. A solução para o problema foi iniciar-se o processo fermentativo com um excedente de água livre.

Meios ricos em substratos hidroxilados e carbonatados produzem uma liberação de calor extremamente importante podendo elevar a temperatura de fermentação à 65° C. Nos estudos de fermentação em pHs elevados só produziram aqueles experimentos realizados em temperatura ambiente. Os demais não produziram devido ao aumento da temperatura.

A melhor produção de ácido fumárico foi de 116,6 g de ácido fumárico por kg de bagaço de mandioca seco. Este dado foi reproduzido por uma rede de três neurônios funções de ativação tangente-hiperbólica/linear denominada *rede 2* com uma imprecisão abaixo de 2%. Como pode ser visto na comparação dos resultados nos itens 5.4.1 e 5.4.2 a produção obtida foi boa, as precisões obtidas foram excelentes e o método mostrou ser instrumento viável e adequado ao processo. O resultado de 116,6 g/kg viabiliza o experimento tanto para transformar o bagaço de mandioca em ração animal como para a extração aquosa para posterior utilização industrial. Esse melhor rendimento foi obtido no estudo cinético sem limitação de umidade. A reprodução deste dado por uma rede de

três neurônios funções de ativação tangente-hiperbólica/linear denominada *rede 2* foi de 114,6 g de ácido fumárico por kg de bagaço de mandioca seco, com um erro médio abaixo de 2% em relação aos valores experimentais..

ANEXOS

Anexo A

Dados experimentais alimentados às redes neurais, ensaios 1 e 2

T °C	Taxa de inoculação	pH	U ₀ e U _f	dias	g/kg
35	1,25 x 10 ⁹	7,20	75,0% 71,59%	6	6,20
32	3,70 x 10 ⁸	5,90	70,0% 66,63%	6	27,90
32	3,70 x 10 ⁷	5,40	60,0% 41,14%	6	11,10
35	3,70 x 10 ⁶	2,30	56,0% 2,78%	6	1,600
28	3,70 x 10 ⁸	5,90	70,0% 60,52%	6	38,50
25	1,25 x 10 ⁹	7,20	75,0% 75,20%	6	24,30
28	3,70 x 10 ⁷	5,40	60,0% 49,99%	6	2,00
25	3,70 x 10 ⁶	2,30	56,0% 52,67%	6	0,00
35	1,00 x 10 ⁸	11,6	82,5% 80,50%	6	7,17
35	1,00 x 10 ⁸	9,50	70,0% 63,70%	7	10,65
32	1,00 x 10 ⁸	8,60	75,0% 71,30%	8	38,15
32	1,00 x 10 ⁸	7,20	80,0% 72,20%	9	71,06
28	1,00 x 10 ⁸	7,20	80,0% 70,90%	10	43,02
25	1,00 x 10 ⁸	9,50	70,0% 68,50%	11	27,27
25	1,00 x 10 ⁸	11,6	82,5% 81,60%	12	44,33
28	1,00 x 10 ⁸	8,60	75,0% 67,60%	13	42,94
30	5,00 x 10 ⁷	7.20	70,20% 64,00%	8	39,09
30	5,00 x 10 ⁶	7.20	70,16% 65,00%	8	39,02
30	4,00 x 10 ⁶	7.20	70,00% 66,92%	8	28,41

Nesta tabela encontram-se os dados de dois ensaios fatoriais. Observa-se que nos ensaios sempre há uma variável constante para possibilitar a estatística 2⁴⁻¹. Encontram-

se também os dados de três *screening* utilizados na determinação da cepa maior produtora de ácido fumárico.

Ensaio 3

T °C	Taxa de inoculação	pH	U ₀ e U _f	dias	g/kg
32	1,00 x 10 ⁶	7,20	70,16% 50,57%	3	2,85
32	1,00 x 10 ⁶	7,20	70,16% 39,60%	4	4,07
32	1,00 x 10 ⁶	7,20	70,16% 52,33%	5	5,20
32	1,00 x 10 ⁶	7,20	70,16% 50,57%	6	7,70
32	1,00 x 10 ⁶	7,20	70,16% 50,57%	7	0,37
32	1,00 x 10 ⁶	7,20	70,16% 50,57%	8	20,35
32	1,00 x 10 ⁶	7,20	70,16% 50,57%	9	9,97
32	1,00 x 10 ⁶	7,20	70,16% 50,57%	10	15,26
32	1,00 x 10 ⁸	9,50	70,00%60,00%	8	0,00
32	1,00 x 10 ⁸	5,36	65,00%57,00%	8	13,65
32	1,00 x 10 ⁶	9,50	65,00%52,00%	8	0,00
32	1,00 x 10 ⁶	5,36	70,00%67,00%	8	6,50
28	1,00 x 10 ⁸	9,50	65,00%56,00%	8	2,15
28	1,00 x 10 ⁸	5,36	70,00%67,00%	8	38,28
28	1,00 x 10 ⁶	9,50	70,00%63,00%	8	30,54
28	1,00 x 10 ⁶	5,36	65,00%64,00%	8	11,71

Ensaio 4

T °C	Taxa de inoculação	pH	U ₀ e U _f	dias	g/kg
32	$3,00 \times 10^7$	7,2	70,00% 68,8%	1	0,81
32	$3,00 \times 10^7$	7,2	70,00% 66,7%	2	0,91
32	$3,00 \times 10^7$	7,2	70,00% 67,7%	3	5,37
32	$3,00 \times 10^7$	7,2	70,00% 68,0%	4	18,68
32	$3,00 \times 10^7$	7,2	70,00% 70,3%	5	20,50
32	$3,00 \times 10^7$	7,2	70,00% 65,8%	6	23,30
32	$3,00 \times 10^7$	7,2	70,00% 63,2%	7	28,76
32	$3,00 \times 10^7$	7,2	70,00% 62,9%	8	33,99
32	$3,00 \times 10^7$	7,2	70,00% 65,9%	9	46,92
32	$3,00 \times 10^7$	7,2	70,00% 61,8%	10	55,99

Neste ensaio foi variado apenas o tempo de fermentação, a umidade utilizada para a rede 1 foi a umidade inicial.

Ensaio 5

T °C	Taxa de inoculação	pH	U ₀ e U _f	dias	g/kg
30	6,00 x 10 ⁶	7,2	81,40% 78,0%	1	0,00
30	6,00 x 10 ⁶	7,2	81,40% 77,1%	2	4,80
30	6,00 x 10 ⁶	7,2	81,40% 78,1%	3	23,85
30	6,00 x 10 ⁶	7,2	81,40% 77,6%	4	57,42
30	6,00 x 10 ⁶	7,2	81,40% 77,2%	5	66,46
30	6,00 x 10 ⁶	7,2	81,40% 79,4%	6	87,17
30	6,00 x 10 ⁶	7,2	81,40% 74,7%	7	95,67
30	6,00 x 10 ⁶	7,2	81,40% 74,5%	8	85,80
30	6,00 x 10 ⁶	7,2	81,40% 77,9%	9	96,93
30	6,00 x 10 ⁶	7,2	81,40% 74,6%	10	93,13
30	6,00 x 10 ⁶	7,2	81,40% 74,5%	11	84,79
30	6,00 x 10 ⁶	7,2	81,40% 71,5%	12	116,6
30	6,00 x 10 ⁶	7,2	81,40% 71,5%	13	84,65

Neste ensaio foi variado apenas o tempo de fermentação, como ele foi desenvolvido com excesso de umidade ele foi comparado com a rede 2 que utilizou as umidades finais.

Anexo B

Relação carbono-nitrogênio

A relação carbono nitrogênio é uma medida direta do crescimento do microrganismo, pois o nitrogênio é utilizado para a produção de proteínas que formam as células do microrganismo, quando o nitrogênio acaba o carbono passa a ser processado de modo incompleto pelo microrganismo tornando o processo de metabolismo do microrganismo, de crescimento e respiração para fermentação ou biotransformação. Ao invés de respirar e crescer (levar todo o processo de fermentação até a produção de carbono orgânico, CO₂ e H₂O) o processo é interrompido em um produto intermediário de interesse comercial. Por isso uma relação carbono-nitrogênio ótima é importante para determinação do crescimento ideal e produção máxima.

Cálculo da relação carbono nitrogênio para o meio otimizado

Cálculo da relação carbono nitrogênio no amido

Mol do amido igual a 180,06 g/Mol

Proporção de carbono no amido de 40%

Proporção de amido na mandioca de 63,3%

Ou 25,43 g de carbono em 100 g de bagaço de mandioca

Proporção de proteínas no bagaço de mandioca 1,5 g em 100 g de mandioca

Ou 0,24 g de nitrogênio em 100 g de bagaço de mandioca

Para cada 100 g de bagaço de mandioca foi adicionado 300 mL de solução salina. Em termos de peso seco tem-se:

Para 83,3 g de mandioca foi adicionado 250 mL de solução salina

Em 83,3 g de mandioca 21,19 g de C e 0,2 g de N.

-Cálculo do nitrogênio da solução salina

Mol do nitrato de potássio 101,1

proporção de nitrogênio no nitrato de potássio: 0,14

Em 3,76 g de nitrato de potássio tem-se 0,5234 g de nitrogênio

-Cálculo da relação carbono-nitrogênio total

$$C = 21,19 + 0,00 = 21,19$$

$$N = 0,2 + 0,5264 = 0,7264$$

$$C/N = 21,19/0,7264 = 29,2$$

A produção de ácido fumárico pode ser aumentada pela reprodução de uma relação carbono nitrogênio mais próxima da relação natural do solo. Mesmo a produção natural do solo pode ser alterada pela adição de nitrogênio orgânico ao solo (KARMARKAR, 1991).

O carbono presente no CaCO_3 não foi considerado no cálculo total porque é carbono não assimilável pelo microrganismo. A função do CaCO_3 é tamponar o meio em pH 7,2 cujo pKb só é alterado por ácidos e bases fortes. Nas variações de pH, foram utilizados HCl e NaOH em concentrações elevadas. Se, por exemplo, for utilizado CaCO_3 para fazer as variações de pH, a umidade não será constante no meio, embora o seja em termos de gramas de água por grama de mandioca seca.

Anexo C

Produções de ácido fumárico conseguidas por cepa de *Rhizopus* a 32° C, taxa de inoculação 10⁸ esporos por grama de mandioca seca, pH de 7,2, umidade inicial de 78% e tempo de 8 dias.

<i>Cepa</i>	Produção de ácido Fumárico g/kg de bagaço de mandioca seco
<i>R. arrhizus</i> 2582	71,1
<i>R. sp</i> 25975	62,0
<i>R. oryzae</i> 28168	58,0
<i>R. oligosporus</i> 3267	43,1
<i>R. formosa</i> 28422	42,5
<i>R. oryzae</i> 28627	40,6
<i>R. delemar</i> 34612	17,2
<i>R. arrhizus</i> 28425	5,5
<i>R. arrhizus</i> 16179	4,5
<i>R. oryzae</i> 395	2,3
<i>R. circicans</i> 1475	0,0

REFERÊNCIAS

- ALEKSANDER, I. Self-adaptive universal logic circuits. **Electronics Letters**. n. 2, p. 321-322, 1966.
- ALMEIDA, J. S.; Tratamento de resultados em biotecnologia: imitando a biologia **Boletim de Biotecnologia na Net** – n. 59. 1998.
- ALTIPARMAK-MEHMET-RIZA; APAYDIN-SUHEYLA; TRABLUS-SINAN; SERDENGECTI-KAMIL; ATAMAN-REZZAN; OZTURK-RECEP; EREK-EKREM TURAN GUNES BULVARI, DENIZATI KENT SITESI, Systemic fungal infections after renal transplantation. **Turkey-Scandinavian Journal-of-Infectious-Diseases**.; v. 34, n. 4, p.284-288, 2002.
- ASSESSMENT STATION FOR AGRICULTURAL TECHNOLOGY OF LAMPUNG PROVINCE. **Improvement of nutritive quality of crop by-products using bioprocess technique and their uses for animals**. [s.l.: s.n.], 1994.
- BAUGHMAN, D. R.; LIU, A. Y. **Neural Networks in Bioprocessing and Chemical Engineering**. USA. San Diego, Inc. 1995.
- BARRIOS, G. J.; TOMASINI, A.; VINIEGRA, G. G.; LOPEZ, J. Penicillin production by solid state fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 10, n. 11, p. 793-798, 1988.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 2.ed., 1.Reimpr. São Paulo: Livraria Varela. 1992a. 223p.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela. 1992b. p19.
- BOWEN, R. Fundamental physiology and anatomy of the digestive system. **Brief Review of Food Chemistry** 1995.
- BRAMORSKI, A. **Caracterização do crescimento e produção de metabólitos voláteis por fungos filamentosos cultivados sobre substratos agroindustriais**. Dissertação (Mestrado) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1997.
- BRAZ, R. S. **Alto nível em redes neurais** 86p. Dissertação (Mestrado) IME USP-São Paulo 1998.
- BULSARI, A. B. **Neural networks for chemical engineers** Amsterdam: Elsevier. 1995.
- CARPENTER, G. A.; GROSSBERG, S. Learning, Categorization, Rule Formation, and Prediction by Fuzzy Neural Networks Center of adaptive Systems and Department of Cognitive Neural Systems. Bostom: Boston University.1993.
- CARTA, F. S. **Hidrólise enzimática dos resíduos de fecularias e produção de ácido fumárico por fermentação de fungos do gênero Rhizopus**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química)- Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 88f. 1999.
- CEREDA, M. P. **Caracterização dos resíduos da industrialização da mandioca. Industrialização da mandioca no Brasil**. São Paulo: Nobel, 1994. 392p.

- CHARNIAK, E.; McDERMOTT, D. **Introduction to artificial intelligence**. [s.l]: Addison-Wesley. 1987.
- CHEN, C. H. **Fuzzy logic and neural network handbook university of massachusetts dartmouth**. [s.l.: s.n.], 1996.
- CHEN, L.; BERNARD, O.; BASTIN, G.; ANGELOV, P. Hybrid modeling of biotechnological processes using neural networks **Control Engineering Practice**, n. 8, p. 821-827, 2000.
- DOELLE, H. W. Biotechnology of solid substrate fermentation in the production of food. **ASEAN Food Journal**, v. 1, n. 1, p 10-14, 1985.
- DUNLOP, R. M., HAMONO, P. B.; D-lactic acidosis in Ruminants. **Ann. NY. Acad. Sci**, v. 119, 1109-1132, 1965.
- DYMINSKI, A. S. **Análise de problemas geotécnicos através de redes neurais**. 208f. Tese (Doutorado). Pont. Univ. Cat. Rio de Janeiro. 2000.
- FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M Immobilization of filamentous fungi: A new frontier in the production of organic acids. **Italian Journal of Food Science** v. 9, n. 3, p. 171-182, 1997.
- FERREIRA, L. S.; SOUZA, M. B.; JR, J. O.; BROXTERMANN, R.O.M. Aspects concerning the use of biosensors for process control: Experimental and simulation investigations. **Computers and Chemical Engineering** v. 27, p. 1165-1173, 2003.
- FUGMANN H. A. J. **Introdução ao processamento de Alimentos. Tecnologia da conserva**. Curitiba: Ed. Universidade Federal do Paraná. 1973.
- GANGL *et al.* **Applied Biochem. And Biotechnol.** v. 24/ 25, p. 663-677, 1990.
- GOLDBERG, I.; STIEGLITZ, B. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 27, p 1067-1069, 1985.
- GROSSBERG, S. Adaptive pattern classification and universal recording, I-II. **Biological Cybernetics**, n. 23 v. 121-134; 187-202. 1976.
- HAYKIN, S. **Redes Neurais princípios e práticas** 2. ed. Bookman. 2001.
- HEBB, D. O. **The organization of behavior**. New York: John Wiley. 1949.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ, **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**, v.1 p. 32-33. São Paulo, 1967.
- KARMARKAR, S. V.; TABATABAI, M. A. Biology and fertility of soils. v. 3, n. 12, p. 165-169, 1991.
- KAUTOLA H., LINKO YU-YEN Production of fumaric acid with immobilized biocatalysts. **Applied Biochemistry and Biotechnol.** p. 161-170. 1990.
- KENEALY, W. *et al.* Biochemical aspects of fumaric acid accumulations by *Rhizopus arrhizus*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 52, p. 128-133, 1986.

- KIRK, E.; OTHEMER, D. F. **Encyclopedia of Chemical Technology**. Intercience Publishers. v. 8, p 680-696, 1952.
- KOHONEN, T. Correlation matrix memories **IEEE Transactions on Computers**, v. C-21, p. 353-359.
- KOLICHESKI, M. B. **Produção de ácido cítrico por fermentação no estado sólido utilizando como substrato bagaço de mandioca**. Dissertação (Mestrado), Dep. Eng. Quím., Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 135f. 1995.
- KOMPIANG, I. P.; SINURAT, A.P.; SUPRIYATI, P. T.; DARMA, J. Nutritive value of protein enriched cassava: **Cassapro. Ilmu dan Peternakan**. v. 2, n. 7, p. 22-25, 1994.
- LAUKEVICS J. J.; APSITE A. F.; VIESTURS U. S.; TENGEDY R. P. Sterichindrance of growth of filamentous fungi in solid substrate fermentation of water straw, **Biotechnology & bioengineering**, n. 27. p.1687-1691, 1985.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Coleção Biotecnológica Industrial**. Processos Fermentativos e Enzimáticos. v. 3, São Paulo: Edgard Blucher Ltda São Paulo, 593p, 2001.
- LONSANE *et al.* Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme Microbiology and Technology**. v. 7, p. 258-265, 1985.
- MACHADO, C. M. M. **Produção de ácido giberélico por fermentação no estado sólido em biorreatores da agroindústria do café**. Dissertação de mestrado Dep. Eng. Quím., Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2000. 73f.
- MAHEVA, E. *et al.* Sporulation of *Penicillium roqueforti* in Solid Substract Fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 6, p. 97-102, 1984.
- MARCH, J. **Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms, and Structure** 4.ed. New York: Wiley, 1992 p. 127.
- McCULLOCH, W.S.; PITTS, W. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. **Bulletin of Mathematical Biophysics**. n.5 p115-133, 1943.
- MELEIRO, L. A. C.; MACIEL FILHO, R.; Self-tuning adaptive control to an industrial large scale ethanol production **Computers and Chemical Engineering** n. 24 p. 925-930. 2000.
- MINSKY M. Some universal elements for finite automata. **IN SHANNON, C. AND MCCARTHY, J.** Princeton, NJ: Princeton University Press. p. 117-128. 1956.
- MINSKY, M.; PAPERT, S. **Perceptrons**. Cambridge MIT Press. 1969.
- MORESI, M.; PARENTE, E.; PETRUCCIOLI, M; FREDERICI, F. Optimization of Fumaric Acid Production from Potato Flour by *Rhizopus arrhizus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 36, 35-39, 1991.
- MORIN, M. A.; WARD, O. P. **Mycol. Res.** v. 94, p. 505-510, 1990.
- NEOGERA Tecnologia para toda obra Soluções para o mercado de Arquitetura, **Engenharia e Construção** 2001.

NISHIO, N.; TAI, K.; NAGAI, S. Hydrolase production by *Aspergillus niger* in solid state cultivation, **European J. Appl. Microbiol.** n. 8, p.263-270. 1979.

ORIOLE, E. **Croissance d'Aspergillus niger sur milieu solide: importance de l'eau de l'activité de l'eau**, 113f. Thèse (Doctorat) Microbiologie, INSA Toulouse, 1987.

PANDEY, A. Recent process development in solid-state fermentation. **Biochemistry**, v. 27, p.109-117, 1992.

PELKZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia** 3. ed. New York: McGraw-Hill.; 950p. 1959.

PETRUCCIOLI, M.; ANGIANI E. Fumaric acid production by *Rhizopus arrhizus* immobilized in different Carriers n. 9 v.3 p. 171-182. 1997.

QUEEN, M. WESTFIELD, C. Back-propagation and its variations Neural Networks for Chemical Engineers n. 3 p. 48-68. 1995.

RAIMBAULT, M. **Fermentation in milieu solid. Croissance de champignons filamenteux sur substrate amylacé**. 291f. Thèse (Doctorat) Université Paul Sabatier, Toulouse. 1980.

RAIMBAULT, M. **General and microbiological aspects of solid substrate fermentation**. Apresentado no Intemational Training Course in Solid State Fermentation., Curitiba, Brazil, 1997.

RAIMBAULT, M.; ROUSSOS, S., LONSANE B. K.. Solid State Fermentation at orstom: history, evolution and perspectives. **In-Advances in solid state fermentation**, Kluwer Acad Pub., Dordrecht, p. 577-612, 1997.

RHODES, R. A.; MOYER, A. J.; SMITH, M. L.; KELLEY, S. E. Production of fumaric acid by *Rhizopus arrhizus* **Appl. Microbil.**, v. 7, p. 74-80, 1959.

ROSENBLATT, F. The perceptrons: a probabilistic model for information storage and organization in the brain. **Psychological Review**. n. 65 p. 386-408. 1958.

RUMELHART, D. E. HINTON, G. E.; WILLIAMS, R.J. Learning internal representations by error propagation. In R D. E. and McC J. L. (Editors). **Parallel Distributed Processing: Explorations in the Microstructures of Cognition**, Cambridge: MIT Press: A. 1996a.

RUMELHART, D E., HINTON, G. E.,; WILLIAMS, R.J. Learning representations by back- propagation of errors. **Nature**. n. 323, p. 533-536. 1986b.

SILMAN, R. W. Enzyme formation during solid substrate fermentation in rotate vessels **Biotechnology and Bioengineering** n. 22, p. 411-420,1980.

SOCCOL, C. R. **Contribuição ao Estudo da Fermentação no Estado Sólido em relação com a produção de Ácido Fumárico. Biotransformação de resíduo Sólido de mandioca por Rhizopus e Basideomacromicetos do Gênero Pleurotus**. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Paraná Curitiba, 228f. 1994.

SRIOTH, K. PIYACHOMKWAN, K. SANTIOSPARSI, V. OATES, C. G. Environmental conditions during root development: Drought constraint on cassava starch quality. *Euphytica* v. 1, n. 120, p. 95-101, 2001..

STERTZ, S. C. **Bioconversão da Farinha de Mandioca Crua (Manihot esculenta crantz) por Fungos do Gênero *Rhizopus* em Fermentação no Estado Sólido.** 108f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Paraná 108p. Curitiba, 1997.

THE MERCK INDEX. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals 11.ed. Rahay, N. J., 1989.

THE NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **NIST Chemistry Book Database** n. 69. 2001.

TONIAL, T. M. **Otimização do crescimento do Fungo comestível *Volvariella volvacea* em Fermentação no estado sólido e em fermentação submersa a partir de resíduos agroindustriais.** 91f. Dissertação (Doutorado) Universidade Federal do Paraná, Curitiba,. 1997.

TSAPTSINOS, D.; TANG, R.; LEIGH, J. R. Neuroidentification of a biotechnological process: Issues and application *Neurocomputing* n. 9 p. 63-79. 1994.

VANDENBERGHE, L. P. S. **Développement d'un Procédé pour la production d'Acide Citrique par fermentation en Milieu Solide à partir de Résidus de l'Agro-Industrie du manioc.** 205f. (Docteur de l'UTC) Compiègne. 2000.

VERVACK, W. **Analyse des Aliments. Méthodes courantes d'analyse. Laboratoire de Biochimie de la Nutrition,** Louvam la Neuve. UCL:1973.

WISTLER, R. L.; SMART, C. L. **Polysaccharide Chemistry.** New York: 1953.

WOICIECHOWSKI, A. L. **Bioconversão de Hidrolisado Hemicelulósico de *Pinus taeda*, obtido pelo processo de explosão a vapor, na produção de ácido l(+) láctico pelo fungo *Rhizopus oryzae*.** 101f. Dissertação (Mestrado) Uiv. Fed. PR. Curitiba. 1997.

WOICIECHOWSKI, A. L. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção da Goma Xantana a partir de Resíduos Agro-industriais de Café e de Mandioca.** 189f. Tese (Doutorado)- Setor de tecnologia, Universidade federal do Paraná. Curitiba. 2001.

YAMAMOTO, C. I. **Modelagem matemática e otimização do processo industrial de síntese da Amônia Utilizando Redes Neurais.** 209f. Tese (Doutorado em Engenharia)- Escola Politécnica, Universidade de São Paulo. 1998.

ZOBEL, H. F. Starch granule structure, **Developments in Carbohydrate Chemistry,** American Association of Cereal Chemists [s.l.]. 1992. p. 26.