



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**MODELAGEM MATEMÁTICA PARA SÍNTESES ENZIMÁTICAS DE
BIOSURFACTANTES CATALISADAS POR LIPASES IMOBILIZADAS**

ALICE DE CARVALHO LIMA TORRES

SÃO CARLOS – SP

2021

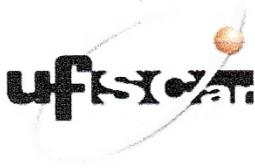
ALICE DE CARVALHO LIMA TORRES

**MODELAGEM MATEMÁTICA PARA SÍNTESES ENZIMÁTICAS DE
BIOSURFACTANTES CATALISADAS POR LIPASES IMOBILIZADAS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Química. Área de concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Ruy de Sousa Júnior

SÃO CARLOS – SP



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Alice de Carvalho Lima Torres, realizada em 08/07/2021.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Ruy de Sousa Junior (UFSCar)

Prof. Dr. Miriam Maria de Resende (UFU)

Prof. Dr. Edson Romano Nucci (UFSJ)

Prof. Dr. Carlos Alberto Galeano Suarez (UFG)

Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli (UFSCar)

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais, M^a Lúcia e Luiz, com todo meu amor.

Essa conquista também é de vocês. Pelo carinho e apoio incondicional.

*Por terem sempre os estudos como prioridade na educação,
fator de grande importância nessa minha caminhada.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por guiar meus passos, iluminar o caminho, me amparar e dar forças para seguir sempre em frente. Sem a confiança Nele, tudo teria sido mais difícil.

Agradeço aos meus maiores apoiadores, minha família! Mainha, painho, Marcelo, Fabi, Mari e Iago, obrigada por acreditarem em mim mais do que eu mesma. Aos pequenos, Clarice e João, por nos proporcionarem momentos de leveza, afinal são os sorrisos que nos fazem seguir em frente. Ao meu amor, meu exemplo, minha força nesses anos de Doutorado, Ricardo. Foram cerca de seis anos de pós-graduação, e o teu apoio foi imprescindível. Obrigada pela paciência!

Aos meus grandes amigos do DEQ, Camila, Thiago e José Roberto. Serei eternamente grata por essa amizade, pelo apoio, pelas risadas, pelas diversas vezes que me ajudaram a sanar dúvidas, por tudo o que aprendi com cada um. Levarei vocês no coração, nas lembranças maravilhosas que ficaram guardadas. Obrigada!

Ao meu orientador, Professor Ruy, muito obrigada por ter me dado a excelente oportunidade em ser orientada por você. Obrigada por todos os ensinamentos e pela confiança em mim depositada. Levo comigo o exemplo de um professor que ensina com firmeza, paciência e dedicação.

Ao Professor Paulo Waldir, agradeço por compartilhar seus conhecimentos com a concessão dos dados experimentais e contribuição na produção do artigo.

À Lionete Nunes de Lima, pelo fornecimento dos dados experimentais utilizados neste trabalho.

Ao Rafael Akira, colega do DEQ, obrigada por aceitar trabalhar comigo na etapa final. Agradeço por compartilhar seus conhecimentos, por ter sido tão compreensivo e paciente. Sua contribuição foi essencial!

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho de Doutorado.

Apoio Financeiro: O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, e Processo No 2016/10636-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

Reações enzimáticas de esterificação de ácidos graxos com carboidratos geram biossurfactantes, produtos com alta capacidade em reduzir tensões superficiais e interfaciais, aplicáveis principalmente nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. A modelagem matemática, por sua vez, pode ser uma ferramenta útil, em suas diferentes abordagens, para simulação e otimização dos processos enzimáticos. Assim, este trabalho foi realizado em três etapas distintas e teve como objetivo a modelagem matemática de processos enzimáticos para a produção de biossurfactantes, fazendo uso da aplicação de abordagens fenomenológicas (semi-mecanísticas), neurais e nebulosas (*fuzzy*). O modelo cinético fenomenológico de Ping Pong Bi Bi foi ajustado a dados experimentais, fazendo-se uso de dados cinéticos da produção de biossurfactantes por esterificações de ácidos oleico e láurico com frutose e lactose, utilizando lipase B de *Candida antarctica* imobilizada (CALB-IM-T2-350) e lipase de *Pseudomonas fluorescens* (PFL) imobilizada em octil-sílica (sílica silanizada com octiltrietoxissilano), fornecidos pelo LabEnz-UFSCar. Foi aplicado o método clássico de ajuste de parâmetros de Levenberg-Marquardt resultando em uma boa correspondência entre o modelo proposto e os dados experimentais. Para validação do modelo, um novo conjunto de dados experimentais foi utilizado, mostrando excelente capacidade de previsão. Em seguida, foram construídos modelos cinéticos neurais utilizando dados experimentais de esterificações de xilose com ácidos oleico e/ou láurico, realizadas com emprego do biocatalisador CALB-IM-T2-350 e de derivados da CALB imobilizada em Micropartículas Magnéticas de Sílica (SMMPs) com grupos octil (CALB-SMMP-octil) ou com grupos octil mais glutaraldeído (CALB-SMMP-octil-glu). Fazendo uso do pacote *Neural Network Toolbox* do Matlab, foram treinadas cinco redes neurais artificiais (RNAs), uma para cada tipo de biocatalisador e ácido, obtendo-se valores de R-quadrático superiores a 0,97. Como um último esforço em modelagem neural, duas novas RNAs foram ajustadas com o agrupamento dos dados em relação ao tipo de biocatalisador. Os valores de R-quadrático, acima de 0,98, indicaram boa capacidade de previsão. Por fim, foi estudada a modelagem por sistema de inferência *fuzzy*, com uso da ferramenta *Neuro Fuzzy Designer* do ANFIS (Adaptive Network-Based Fuzzy Inference System) do Matlab. Foram construídos modelos *fuzzy* para cada um de três biocatalisadores em estudo (CALB-IM-T2-350, CALB-SMMP-octil e CALB-SMMP-octil-glu), considerando

como variáveis linguísticas de entrada o tipo de ácido, temperatura, tempo de reação e a razão molar de substratos (RMS), para prever a conversão do processo de esterificação. Foram utilizadas funções de pertinência gaussianas e função linear para a saída, numa abordagem *fuzzy* de Takagi e Sugeno. Os parâmetros foram ajustados por um método de otimização paramétrica híbrido. Os resultados mostraram que as saídas dos modelos estavam muito próximas dos alvos, com valores de RMSE abaixo de 0,006. Visando demonstrar o potencial da modelagem nebulosa na otimização dos processos, foram construídas superfícies de resposta para a conversão da xilose em função de distintas condições operacionais. As superfícies nebulosas indicaram que maiores valores de conversão de xilose são atingidos a partir das 45h de reação, em temperaturas acima dos 50°C e na RMS de 1:0,2 (ácido:açúcar). Assim, o presente trabalho explorou a capacidade da modelagem matemática, sob distintas abordagens, no estudo da produção enzimática de biossurfactantes.

Palavras-chave: Biossurfactantes; Modelagem Matemática; Ping Pong Bi Bi; Redes Neurais Artificiais; Lógica Fuzzy.

ABSTRACT

Enzymatic reactions of esterification of fatty acids with carbohydrates generate biosurfactants, products with high capacity to reduce surface and interfacial tensions, applicable mainly in the food, pharmaceutical and cosmetic industries. Mathematical modeling, in turn, can be a useful tool, in its different approaches, for the simulation and optimization of enzymatic processes. Thus, this work was carried out in three distinct steps and aimed at the mathematical modeling of enzymatic processes to produce biosurfactants, making use of the application of phenomenological (semi-mechanistic), neural and fuzzy approaches. The phenomenological kinetic model of Ping Pong Bi Bi was fitted to experimental data. For this, kinetic data of the production of biosurfactants by esterification of oleic and lauric acids with fructose and lactose, using immobilized lipase B from *Candida antarctica* (CALB-IM-T2-350) and lipase from *Pseudomonas fluorescens* (PFL) immobilized on octyl-silica (silanized with octyltriethoxysilane), provided by LabEnz-UFSCar, were used. The classic Levenberg-Marquardt parameter fitting method was applied, resulting in a good correspondence between the proposed model and the experimental data. For validation of the semi-mechanistic model, a new set of experimental data was used, showing excellent predictive capacity of the model. Then, neural kinetic models were built using experimental data of enzymatic esterification of xylose with oleic and/or lauric acids, performed using the biocatalyst CALB-IM-T2-350 and CALB derivatives immobilized on Silica Magnetic Microparticles (SMMPs) with octyl groups (CALB-SMMP-octyl) or with octyl groups plus glutaraldehyde (CALB-SMMP-octyl-glu). Using Matlab Neural Network Toolbox, five artificial neural networks (ANNs) were trained, one for each type of biocatalyst and acid, obtaining R-squared values greater than 0.97. As a last effort in neural modeling, two ANNs were fitted (for two of the biocatalysts), each one of them already incorporating, in its inputs, an option referring to the type of acid. The R-squared values, above 0.98, also showed good predictability. Finally, modeling by fuzzy inference systems was studied, using the Neuro Fuzzy Designer tool from ANFIS (Adaptive Network-Based Fuzzy Inference System) of Matlab. Fuzzy models were built for each of the three biocatalysts under study (CALB-IM-T2-350, CALB-SMMP-octyl and CALB-SMMP-octyl-glu), considering as input linguistic variables the type of acid, temperature, reaction time and substrate molar ratio to predict the conversion of the esterification process. Gaussian membership functions and linear output functions

were used, in a Takagi- Sugeno's fuzzy approach. The parameters were fitted by a hybrid parametric optimization method. The results showed that the fuzzy model outputs were very close to the targets, with RMSE values below 0.006. To demonstrate the potential of fuzzy modeling to optimize processes, response surfaces were built for the conversion of xylose as a function of different operating conditions. The fuzzy surfaces indicated that higher values of conversion are reached after 45h of reaction, at temperatures above 50°C and at RMS of 1:0.2 (acid:sugar). Thus, the present work explored, in a broad way, all the capability of mathematical modeling, under different approaches, in the study of enzymatic production of biosurfactants.

Keywords: Biosurfactants; Mathematical Modeling; Ping Pong Bi Bi; Artificial neural networks; Fuzzy Logic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representante da tríade catalítica de lipases, apresentando os resíduos como um “grampo de cabelo”	26
Figura 2 - Mecanismo enzimático Ping Pong Bi Bi para esterificação com inibição pelo açúcar	28
Figura 3 - Esquema dos métodos de imobilização enzimática	30
Figura 4 - Esquema representativo do funcionamento do processo de aprendizagem supervisionada por redes neurais	33
Figura 5 - Modelo não-linear de um neurônio.....	34
Figura 6 - Variável linguística temperatura.....	38
Figura 7 - Estrutura básica de um sistema de inferência nebuloso	40
Figura 8 - Arquitetura da RNA com uma camada oculta contendo: a) 2 neurônios e b) 5 neurônios.....	47
Figura 9 - Consumo de ácido para a síntese de oleato de frutose a 45°C, 250 rpm, 72h de reação, razão molar ácido: açúcar de 1:1, usando CALB-IM-T2-350 (0.5 g de derivado) em solvente terc-butanol.....	52
Figura 10 - Consumo de ácido para a síntese de oleato de frutose a 45°C, 250 rpm, 72h de reação, razão molar ácido: açúcar de 1:1, usando PFL-octil-sílica (0.25 g de derivado) em solvente terc-butanol.....	53
Figura 11 - Consumo de ácido para a síntese de laurato de frutose a 45°C, 250 rpm, 72h de reação, razão molar ácido: açúcar de 1: 1, usando PFL-octil-sílica (0.5 g de derivado) em solvente 2-metil-2-butanol.....	53
Figura 12 - Consumo de ácido para a síntese de laurato de lactose a 45°C, 250 rpm, 72h de reação, razão molar ácido: açúcar de 1: 1, usando PFL-octil-sílica (0.5 g de derivado) em solvente terc-butanol.....	54
Figura 13 - Consumo de ácido para a síntese de oleato de frutose a 45°C, 250 rpm, 72h de reação, razão molar ácido: açúcar de 1:2, utilizando CALB-IM-T2-350 (0.5 g de derivado) em solvente terc-butanol.....	55
Figura 14 - Consumo de ácido para a síntese de oleato de frutose a 55°C, 250 rpm, 72h de reação, razão molar ácido: açúcar de 1: 2, utilizando CALB-IM-T2-350 (0.5 g de derivado) em solvente terc-butanol.....	55
Figura 15 - Consumo de ácido para a síntese de oleato de frutose a 45 ° C, 250 rpm, 72 h de reação, razão molar ácido: açúcar de 1:2, utilizando CALB-IM-T2-350 (0.25 g de derivado) em solvente terc-butanol.....	57
Figura 16 - Gráficos de regressão para dados de treinamento, validação e teste da RNA-1, empregada na previsão dos dados da síntese de Oleato de xilose com CalB- IM-T2-350 ...	61

Figura 17 - Gráficos de regressão para dados de treinamento, validação e teste da RNA-2, empregada na previsão dos dados da síntese de Laurato de xilose com CalB- IM-T2-350 .	62
Figura 18 - Gráficos de regressão para dados de treinamento, validação e teste da RNA-3, empregada na previsão dos dados da síntese de Laurato de xilose com CalB-SMMP-octil	63
Figura 19 - Gráficos de regressão para dados de treinamento, validação e teste da RNA-4, empregada na previsão dos dados da síntese de Oleato de xilose com CalB-SMMP-octil-Glu	64
Figura 20 - Gráficos de regressão para dados de treinamento, validação e teste da RNA-5, empregada na previsão dos dados da síntese de Laurato de xilose com CalB-SMMP-octil-Glu	65
Figura 21 - Modelagem cinética da síntese de Oleato de xilose catalisada por CALB-IM-T2-350 em diferentes temperaturas (RNA-1)	67
Figura 22 - Modelagem cinética da síntese de Laurato de xilose catalisada por CALB-IM-T2-350 em diferentes temperaturas (RNA-2)	68
Figura 23 - Modelagem cinética da síntese de Laurato de xilose catalisada por CALB-SMMP-octil em diferentes temperaturas (RNA-3)	68
Figura 24 - Modelagem cinética da síntese de Oleato de xilose catalisada por CALB-SMMP-octil-glu em diferentes temperaturas (RNA-4)	69
Figura 25 - Modelagem cinética da síntese de Laurato de xilose catalisada por CALB-SMMP-octil-glu em diferentes temperaturas (RNA-5)	69
Figura 26 - Gráficos de regressão para dados de treinamento, validação e teste da RNA-6 empregada na previsão dos dados de síntese de ésteres de xilose com CalB-IM-T2-350...	71
Figura 27 - Gráficos de regressão para dados de treinamento, validação e teste da RNA-7 empregada na previsão dos dados de síntese de ésteres de xilose com CalB-IM-SMMP-octil-glu.....	72
Figura 28 - Modelagem cinética de sínteses de ésteres de xilose catalisadas por CalB-IM-T2-350 em diferentes temperaturas e ácidos graxos (RNA-6).....	74
Figura 29 - Modelagem cinética de sínteses de ésteres de xilose catalisadas por CalB-IM-SMMP-octil-glu em diferentes temperaturas e ácidos graxos (RNA-7).....	74
Figura 30 - Resultados dos ajustes das funções de pertinência de entrada do sistema fuzzy realizado pelo ANFIS	76
Figura 31 - Resultado da etapa de teste comparando os dados alvos com os dados previstos pelos modelos para cada biocatalisador: CALB-IM-T2-350 (A); CALB-SMMP-octil (B); CALB-SMMP-octil-glu (C)	79
Figura 32 - Modelagem nebulosa de síntese de ésteres de xilose com a) ácido oleico e b) ácido láurico, catalisadas por CalB-IM-T2-350 em diferentes temperaturas.....	80

Figura 33 - Modelagem nebulosa de síntese de ésteres de xilose e ácido láurico catalisadas por CALB-SMMP-octil em diferentes temperaturas.....	81
Figura 34 - Modelagem nebulosa de síntese de ésteres de xilose com a) ácido oleico e b) ácido láurico, catalisadas por CALB-SMMP-octil-glu em diferentes temperaturas.....	82
Figura 35 - Superfícies desenvolvidas pelo modelo nebuloso referente aos dados de esterificação de xilose com ácido oleico (a, b, c) e ácido láurico (d, e, f), para CalB-IM-T2-350	83
Figura 36 - Superfícies desenvolvidas pelo modelo nebuloso referente aos dados de esterificação de xilose com ácido láurico, para CalB-SMMP-octil	84
Figura 37 - Superfícies desenvolvidas pelo modelo nebuloso referente aos dados de esterificação de xilose com ácido oleico (a, b, c) e ácido láurico (d, e, f), para CalB-SMMP-octil-glu	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições operacionais de esterificação de ácidos graxos e açúcares em sistemas com diferentes solventes, catalisadas por lipases imobilizadas	44
Tabela 2 - Especificações das redes neurais artificiais construídas e treinadas.....	46
Tabela 3 - Condições operacionais dos dados experimentais selecionados	48
Tabela 4 - Valores de V_{max} , $K_{açúcar}$ e $K_{ácido}$ ajustados aos dados de esterificação enzimática (consumo de ácido e açúcar) ^(a)	56
Tabela 5 - Constantes cinéticas para o modelo cinético Ping-Pong Bi-Bi de esterificação enzimática de ácidos carboxílicos com carboidratos em meio orgânico.....	59
Tabela 6 - Valores dos pesos entre as variáveis da camada de entrada e os neurônios da camada oculta ao final do treinamento	66
Tabela 7 - Valores dos pesos entre os neurônios da camada oculta e da camada de saída	66
Tabela 8 - Especificações das duas redes neurais construídas para os dados agrupados por tipo de biocatalisador	70
Tabela 9 - Valores dos pesos entre as variáveis da camada de entrada e os neurônios da camada oculta ao final do treinamento	73
Tabela 10 - Valores dos pesos entre os neurônios da camada oculta e da camada de saída	73
Tabela 11 - Valores dos parâmetros das funções de pertinência de entrada do sistema nebuloso ajustados pelo ANFIS	76
Tabela 12 - Valores dos coeficientes das funções lineares de saída do FIS referente ao biocatalisador CALB-IM-T2-350 ajustados pelo ANFIS.....	96
Tabela 13 - Valores dos coeficientes das funções lineares de saída do FIS referente ao biocatalisador CALB-SMMP-octil ajustados pelo ANFIS	97
Tabela 14 - Valores dos coeficientes das funções lineares de saída do FIS referente ao biocatalisador CALB-SMMP-octil-glu ajustados pelo ANFIS	98

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Tipos de funções de ativação presentes no pacote Neural Network Toolbox do software Matlab R2016b	34
Quadro 2 - Modus ponens generalizado	39
Quadro 3 - Variáveis de entrada, com respectivos valores linguísticos, e variável de saída do modelo FIS	50

LISTA DE SIGLAS/ABREVIATURAS

- CALB: *Candida antarctica* Lipase B
- CALA: *Candida antarctica* Lipase A
- PFL: *Pseudomonas Fluorescens* Lipase
- RNAs: Redes Neurais Artificiais
- SFAEs: *Sugar fatty acid esters*
- His: Histidina
- Asp: Aspartato (ácido aspártico)
- Glu: Glutamato (ácido glutâmico)
- Ser: Serina
- 2M2B: 2-metil-2-butanol
- ILs: Líquidos iônicos
- CLEC: *Cross-Linked Enzyme Crystals*
- CLEA: *Cross-Linked Enzyme Aggregates*
- NNTOOL: *Neural Network Toolbox*
- LM: Levenberg Marquardt
- TS: Takagi e Sugeno
- ANFIS: *Adaptive Network Based Fuzzy Inference System*
- FIS: Sistema de Inferência Fuzzy
- FCM: *Fuzzy C-Means*
- RMS: Razão Molar do Substrato
- RMSE: *Root mean squared error*
- GUIs: *Graphical User Interfaces*
- MAG: Monoacilglicerol
- DAG: Diacilglicerol
- TAG: Triacilglicerol

LISTA DE SIMBOLOS

L^* : Intermediário acil-enzima

L: Lipase

LacCa: Éster de lactose

Lac: Lactose

CA: Ácido cáprico

L-CA: Lipase-ácido cáprico

L-LacCa: Lipase-lactose caprato

LacCa: Lactose-caprato

$K_{\text{açúcar}}$: Constante de Michaelis-Menten para o açúcar

$K_{\text{ácido}}$: Constante de Michaelis-Menten para o ácido

t : Tempo

T: Temperatura

pI: Ponto isoelétrico

[CA]: Concentração de ácido cáprico

[Lac]: Concentração de lactose

[FA]: Concentração de ácido graxo

[S]: Concentração do açúcar

V_{max} : Velocidade máxima

$K_{m(\text{Lac})}$: Constante de Michaelis Menten para lactose

$K_{m(\text{CA})}$: Constante de Michaelis Menten para ácido cáprico

K_i : Coeficiente de inibição da lactose

K_s : Constante de Michaelis Menten para o açúcar

K_{FA} : Constante de Michaelis Menten para o ácido graxo

μ_A : Função de pertinência de A

η_{k-1} : Tamanho de passo

f_{k-1} : Função equivalente ao erro

I : Matriz identidade

J^T : Jacobiano da matriz transposta

SÚMARIO

RESUMO	6
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
3.1 BISSURFACTANTES	23
3.1.2 Ésteres de ácidos graxos de açúcar (<i>Sugar fatty acid esters - SFAEs</i>)	24
3.2 LIPASES	25
3.2.1 Lipase B de <i>Pseudozyma (Candida) antarctica</i>	27
3.3 MECANISMO CATALÍTICO DE LIPASES NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO	28
3.3.1 Equação cinética para reação de esterificação	29
3.4 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	30
3.5 REDES NEURAIS ARTIFICIAIS (RNAs).....	32
3.5.1 Arquitetura de redes neurais	32
3.5.2 Aplicação de RNAs em processo de esterificação enzimática.....	35
3.6 LÓGICA FUZZY.....	36
3.6.1 Variáveis linguísticas e valores linguísticos.....	37
3.6.2 Funções de Pertinência	37
3.6.3 Regras Se-Então	38
3.6.4 Sistema de inferência <i>fuzzy</i>	39
3.6.5 Modelos Takagi-Sugeno.....	41
3.6.6 Sistemas de inferência <i>fuzzy</i> baseado em redes adaptativas (ANFIS).....	42
3.6.7 Aplicação de lógica <i>fuzzy</i> em processo de esterificação enzimático.....	42
4. METODOLOGIA	44
4.1 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS REFERENTES AO MODELO PING PONG BI BI	44
4.1.1 Condições experimentais	44
4.1.2 Otimização dos parâmetros do modelo	45
4.2 DESENVOLVIMENTO DA MODELAGEM EM REDES NEURAIS ARTIFICIAIS.....	45
4.2.1 Condições experimentais	45
4.3 DESENVOLVIMENTO DE MODELAGEM EM SISTEMAS FUZZY.....	48
4.3.1 Condições experimentais	48
4.4 METODOLOGIA DE AJUSTE DE PARÂMETROS.....	50

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS REFERENTES AO MODELO PING PONG BI BI	52
5.2 DESENVOLVIMENTO DA MODELAGEM EM REDES NEURAIAS ARTIFICIAIS.....	60
5.3 DESENVOLVIMENTO DE MODELAGEM EM SISTEMA DE INFERÊNCIA <i>FUZZY</i> ... 75	
6. CONCLUSÕES	87
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	88
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
APÊNDICE	96

1 INTRODUÇÃO

Reações de esterificação de ácidos graxos com carboidratos ou álcoois de cadeia curta rendem produtos de grande interesse comercial: ésteres graxos de açúcares e aromas, respectivamente (LIMA *et al.*, 2018; VESCOVI; SANTOS; TARDIOLI, 2017). Ésteres graxos de açúcar são surfactantes utilizados na indústria alimentar, farmacêutica, cosmética (COLLA *et al.*, 2010; KHAN; RATHOD, 2015), pesticidas, e indústrias petroquímicas (NITSCHKE; PASTORE, 2002; PACWA-PŁOCINICZAK *et al.*, 2011; SACHDEV; CAMEOTRA, 2013). Devido ao seu carácter anfifílico, eles são capazes de reduzir a tensão superficial, sendo utilizados na formação de emulsões, em estabilização de sistemas aerados, melhoria de consistência e textura dos produtos (PACWA-PŁOCINICZAK *et al.*, 2011; SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011).

Ésteres de ácidos graxos de açúcar são industrialmente sintetizados por esterificação química que requerem altas temperaturas (superiores a 100°C) e a utilização de catalisadores alcalinos, o que pode degradar parcialmente o produto, além de causar a formação de subprodutos indesejáveis, até mesmo tóxicos e alergênicos (BROEK; BOERIU, 2013; KHAN; RATHOD, 2015; VESCOVI; SANTOS; TARDIOLI, 2017). Rotas alternativas para a síntese de surfactantes foram usadas principalmente nas indústrias de alimentação, farmacêutica e cosmética devido ao crescente interesse dos consumidores em produtos mais naturais (MUSTAFA; KARMALI; ABDELMOEZ, 2016; VESCOVI; SANTOS; TARDIOLI, 2017).

A síntese de biosurfactantes por microrganismos pode ocorrer devido à ação metabólica de uma variedade de microrganismos, em geral bactérias e fungos (NITSCHKE; PASTORE, 2002). A possibilidade de produzir surfactantes microbianos usando materiais brutos renováveis ou resíduos agrícolas dá um aspecto de sustentabilidade, o que tem sido cada vez mais valorizado pelos consumidores (NITSCHKE; SILVA, 2018).

A via enzimática é uma síntese *in vitro* com a utilização de enzimas, que opera a temperaturas de 30-70 °C, promove menor consumo de energia e uma conversão mais elevada do que na via química (KHAN; RATHOD, 2015; MUSTAFA; KARMALI; ABDELMOEZ, 2016). Assim, este método tem sido indicado como uma alternativa à via química (GUMEL *et al.*, 2011; KENNEDY *et al.*, 2006) e tem sido amplamente

estudado na literatura, considerando principalmente o uso de lipases (AN *et al.*, 2019; COLLA *et al.*, 2010; DANG; OBIRI; HAYES, 2005; LIMA *et al.*, 2016, 2018; MUSTAFA; KARMALI; ABDELMOEZ, 2016; VESCOVI; SANTOS; TARDIOLI, 2017; ZAIDAN *et al.*, 2011) devido à sua versatilidade, pois são capazes de efetuar reações de hidrólise, esterificação e transesterificação e são aplicáveis em diferentes ramos industriais.

De modo similar, é visto como sustentável a produção de biossurfactantes por via enzimática fazendo uso de fontes alternativas como subprodutos de outros processos reacionais. Outras vantagens são melhorias nos custos na produção devido a questões como a redução de uso de substratos caros (NITSCHKE; PASTORE, 2002), um menor gasto energético pela via enzimática e o reaproveitamento do biocatalisador nos sistemas produtivos que utilizam enzimas imobilizadas (DUTTA, 2008).

A produção de biossurfactantes por esterificação de ácidos graxos (oleico e láurico) e carboidratos (frutose e lactose) na presença dos solventes terc-butanol e 2-metil-2-butanol já foi avaliada por LIMA *et al.* (2018) usando como biocatalisadores a lipase comercial B de *Candida Antarctica* imobilizada (CALB-IM-T2-350) e lipase de *Pseudomonas Fluorescens* (PFL) imobilizada em octil-sílica (sílica silanizada com octiltrietoxissilano), apresentando rendimentos acima de 95%. Os experimentos foram realizados em triplicada e forneceram os perfis de conversão do ácido ao longo do tempo.

Embora a produção de ácidos graxos de açúcar catalisados por lipases ser amplamente relatada na literatura (AN *et al.*, 2019; DANDEKAR; PATRAVALE, 2009; ENAYATI *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2019; MARATHE; SHAH; SINGHAL, 2020; MUSTAFA; KARMALI; ABDELMOEZ, 2016; NETA *et al.*, 2012; NGUYEN *et al.*, 2019; SOULTANI; ENGASSER; GHOUL, 2001; VESCOVI; SANTOS; TARDIOLI, 2017), poucos trabalhos têm explorado a cinética da reação de esterificação entre ácidos carboxílicos e carboidratos (DANG; OBIRI; HAYES, 2005; LI *et al.*, 2015; TORRES *et al.*, 2020; ZAIDAN *et al.*, 2011). Para modelar as reações de esterificação de ácidos graxos com açúcares geralmente tem sido considerado o mecanismo de Ping Pong Bi Bi, com base no fato de que em reações de esterificação com os açúcares ocorre inicialmente a formação de um complexo intermediário acil-enzima e sua posterior ligação ao açúcar (DANG; OBIRI; HAYES, 2005; LI *et al.*, 2015; ZAIDAN *et al.*, 2011). Do ponto de vista de processo, diferentes condições (tipos de açúcares, ácidos, temperaturas,

razão molar de substratos, etc.) podem ser aplicadas para a produção de biossurfactantes por biocatálise heterogênea utilizando lipases imobilizadas.

Dentro deste contexto, a modelagem matemática das reações enzimáticas pode ser uma ferramenta útil para a simulação dos processos como forma de contribuir para um melhor entendimento do processo, permitindo prever o efeito das mudanças nas condições operacionais, indicar fatores que mais influenciam na conversão dos substratos, além de ser aplicada em projetos de otimização, dimensionamento de equipamentos, análise de viabilidade econômica e aumento de escala (NELLES, 2001). Em algumas situações, quando modelos matemáticos complexos não são capazes de descrever determinado processo reacional, o emprego de modelos empíricos se torna relevante. Neste caso, as Redes Neurais Artificiais (RNAs) surgem como uma boa opção para a modelagem matemática do processo (FACELI et al., 2011).

Dessa forma, o presente trabalho trata da modelagem matemática de sínteses enzimáticas produtoras de biossurfactantes sob três abordagens distintas: modelagem fenomenológica semi-mecanística por utilização de modelo baseado no mecanismo de Ping Pong Bi Bi (“caixa-branca”), uso de RNAs em uma modelagem empírica (“caixa-preta”) e o desenvolvimento de um modelo *fuzzy*, realizando o estudo também em uma abordagem intermediária (“caixa-cinza”).

É importante ressaltar que este trabalho de Doutorado se enquadra dentro do Projeto Temático Fapesp intitulado “Da fábrica celular à biorrefinaria integrada biodiesel-bioetanol: uma abordagem sistêmica aplicada a problemas complexos em micro e macroescalas”. O conceito de biorrefinaria indica que os produtos (biossurfactantes, no presente caso) podem ser obtidos a partir de subprodutos de outros processos de produção.

2 OBJETIVOS

Este trabalho foi realizado em três etapas distintas e teve como objetivo a modelagem de diversos processos reacionais na produção de biossurfactantes. Para isto, foram utilizados dados experimentais fornecidos pelo Laboratório de Tecnologia Enzimática da Universidade Federal de São Carlos (LabEnz-UFSCar).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Em uma modelagem semi-mecanística, realizar a otimização de parâmetros do modelo Ping Pong Bi Bi considerando o ajuste do modelo a dados de conversão de síntese de ésteres de açúcares (frutose ou lactose) com ácidos graxos (oleico ou láurico) com emprego de PFL-OCTIL-SÍLICA e CALB-IM-T2-350 como biocatalisadores.
- ✓ Construir e treinar Redes Neurais Artificiais capazes de prever o comportamento de dados referentes à reação de esterificação de xilose com ácidos graxos (oleico ou láurico) realizada em solvente terc-butanol com emprego de CALB-IM, CALB-SMMP-OCTIL e CALB-SMMP-OCTIL-GLU.
- ✓ Estudar a modelagem *fuzzy*, realizada a partir da aplicação da metodologia ANFIS (Adaptive-Network-Based Fuzzy Inference System), como uma ferramenta potencial na otimização do processo de esterificação enzimática de xilose com ácidos graxos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOSSURFACTANTES

Biossurfactantes são moléculas produzidas por microrganismos, em geral bactérias e fungos, com capacidade de reduzir as tensões superficiais e interfaciais devido sua estrutura molecular que possui uma porção hidrofílica (polar) e uma porção hidrofóbica (apolar) (RIBEIRO; GUERRA; SARUBBO, 2020). *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizomucor miehei*, *Candida antarctica*, entre outros, são alguns microrganismos que produzem surfactantes durante a fermentação (KHAN; RATHOD, 2015).

Os biossurfactantes têm sido cada vez mais reconhecidos pelos consumidores como uma alternativa mais saudável além de ecologicamente correta devido suas características biodegradáveis (ENAYATI *et al.*, 2018), podendo ser produzidos a partir de fontes renováveis ou resíduos agrícolas. Por exemplo, biossurfactantes ramnolípídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* com melão de soja, compostos estruturalmente por moléculas de ácido β -hidroxidecanóico ligadas a uma molécula de ramnose (SILVA *et al.*, 2019), são biossurfactantes promissores em termos de produção industrial (COSTA; NITSCHKE; CONTIERO, 2008; LIU *et al.*, 2018).

Em consequência, a demanda por biossurfactantes tem aumentado ao longo dos anos no mercado mundial. Segundo o Global Market Insights, em 2019 o mercado de biossurfactantes ultrapassou US\$ 1,5 bilhão e, em meio à crise da COVID-19, o mercado global de biossurfactantes estava com estimativa para crescer em US\$ 4,5 bilhões no ano de 2020 com projeção para US\$ 6,5 bilhões em 2027 (Global Market Insights, 2020).

A classificação dos biossurfactantes no Global Market Insights (2020) de acordo com o tipo é feita em cinco grupos: os ramnolípídios, soforolípídios, ésteres de sacarose, ésteres de sorbitano e outros. De acordo com a aplicação, se dividem em detergentes domésticos, cuidados pessoais, processamento de alimentos, limpadores industriais, produtos químicos agrícolas, produtos químicos para campos petrolíferos e outros.

3.1.2 Ésteres de ácidos graxos de açúcar (*Sugar fatty acid esters - SFAEs*)

Ésteres de ácidos graxos de açúcar (do inglês, SFAEs) produzidos por reação enzimática de esterificação entre um açúcar e um ácido graxo são reconhecidos como biossurfactantes, sendo surfactantes biodegradáveis, não tóxicos e não irritantes (GUMEL *et al.*, 2011). Em escala industrial, os SFAEs são produzidos por vias químicas não enzimáticas, por transesterificação com uso de catalisadores alcalinos ou metálicos e em condições de altas temperaturas, o que implica alto gasto energético no processo (LIMA *et al.*, 2018; YAN *et al.*, 2001). A rota química possui baixa seletividade, baixa conversão e ainda contaminação com subprodutos tóxicos (GUMEL *et al.*, 2011).

As vantajosas propriedades dos SFAEs em relação aos surfactantes químicos, como alta biodegradabilidade, estabilidade em variadas condições ambientais (temperatura, pH e salinidade), propriedades antioxidantes, baixa toxicidade, baixa irritabilidade para olhos e pele (sendo ainda inodoros e insípidos), os tornam promissores para aplicação na indústria de alimentos, farmacêutica, cosmética (ENAYATI *et al.*, 2018; REN; LAMSAL, 2017; RIBEIRO; GUERRA; SARUBBO, 2020).

Na indústria de cuidados pessoais, podem ser usados na formulação de cremes e shampoos (KHAN; RATHOD, 2015), assim como em emulsões cosméticas, como produtos para lábios e bases (DRAKONTIS; AMIN, 2020). Na área dermatológica, melhorando a funcionalidade de células epidérmicas (DUMAS; BONTE, 2002). São usados na indústria farmacêutica devido suas propriedades antimicrobianas (LEE; SANDHU; WALSH, 2017; PERINELLI *et al.*, 2018), sendo que na medicina também atuam com propriedades antivirais e anti-inflamatórios (MARATHE; SHAH; SINGHAL, 2020; NITSCHKE; COSTA, 2007).

Na indústria alimentícia, os ésteres graxos de açúcar são usados há mais de 40 anos (ZAIDAN *et al.*, 2011). Devido seu alto poder emulsificante, é um aditivo essencial na formação da consistência e textura de diversos produtos alimentares, além de auxiliar na dispersão de fase e solubilização de aromas (NITSCHKE; COSTA, 2007). Aplicado inicialmente como espumante para bolos, têm sido aplicados como emulsificantes em biscoitos (RIBEIRO *et al.*, 2020), em molhos para saladas (CAMPOS; STAMFORD; SARUBBO, 2019), na confeitaria e laticínios (REN; LAMSAL, 2017), como emulsificantes em leite de coco (NETA *et al.*, 2012), entre outros.

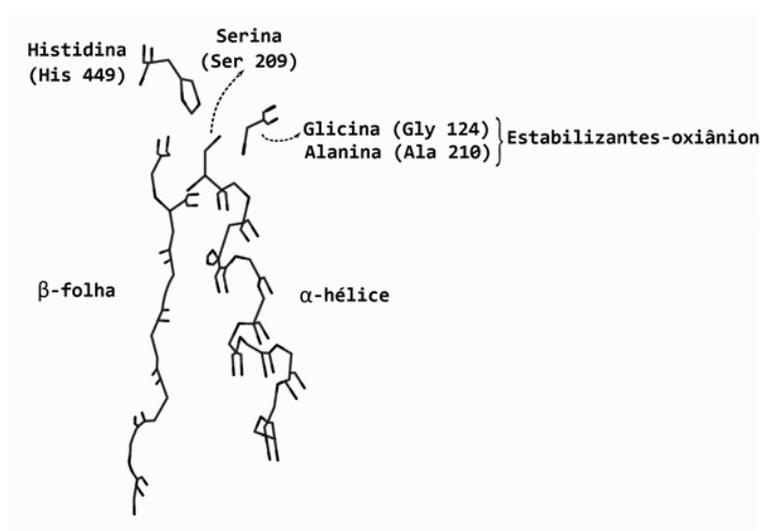
3.2 LIPASES

Lipases, triacilglicerol acilhidrolases (EC 3.1.1.3), são enzimas que catalisam a esterificação, assim como reações de transesterificação (alcoólise e ácidolise) e interesterificação em meios com baixa concentração de água (REIS *et al.*, 2008; THANGARAJ; SOLOMON, 2019). São amplamente utilizados na indústria por causa da sua elevada especificidade com seus respectivos substratos, o que impede a formação de subprodutos indesejáveis, sua eficiência catalítica, além de atuarem sob condições amenas de temperatura e pH (BROEK; BOERIU, 2013; KENNEDY *et al.*, 2006). Na presença de água, são capazes de catalisar a hidrólise de ligações de ésteres carboxílicos em tri-, di- e monoacilgliceróis. O resultado dessa clivagem, é a liberação de ácidos carboxílicos e glicerol (JAEGER; REETZ, 1998; STERGIOU *et al.*, 2013).

Lipases são moléculas de proteína e, portanto, formadas por junção de aminoácidos por meio de ligações peptídicas. Em geral, as proteínas têm sua estrutura classificada em primária, secundária, terciária e quaternária. Sua classificação primária se refere à ordem linear dos aminoácidos na sua cadeia. A estrutura secundária é resultado do dobramento da cadeia, resultando nas estruturas α -hélice e β -folha. Um enovelamento desta resulta na estrutura terciária, importante fator nas características específicas da enzima. Algumas enzimas formam ainda a estrutura quaternária que ocorre da junção de duas ou mais estruturas terciárias (NELSON; COX, 2014).

O padrão de dobramento característico da maioria das lipases é uma dobra de α/β hidrolases. Esta dobra contém um núcleo predominantemente de estruturas do tipo β -folhas cercadas por α -hélices e nesta dobra está situado o sítio ativo das lipases. O sítio ativo das lipases compreende uma tríade catalítica composta por resíduos de serina, histidina e aspartato ou glutamato e vários resíduos estabilizantes-oxiânion (CAJAL *et al.*, 2000; KAZLAUSKAS, 1994). Como exibido na Figura 1, a dobra de α -hélice e β -folha se apresenta como um grampo de cabelo e o resíduo de serina nucleofílico se situa na virada do grampo. De um lado da serina ficam os resíduos de histidina (His) e aspartato (Asp) ou glutamato (Glu) enquanto do lado oposto ficam os resíduos estabilizantes-oxiânion em uma espécie de bolsão/orifício.

Figura 1 - Esquema representante da tríade catalítica de lipases, apresentando os resíduos como um “grampo de cabelo”



Fonte: (KAZLAUSKAS, 1994) - Adaptado

Em solução, um seguimento polipeptídico em forma de hélice chamado “tampa” ou “aba” cobre o sítio ativo em lipases em sua conformação fechada e considerada inativa, mas, na presença de lipídio ou solvente orgânico, a tampa é aberta, expondo o sítio ativo, tornando-o acessível aos substratos. Essa reestruturação conformacional da lipase, referente à abertura da tampa, cria uma região nucleofílica ao redor do resíduo de serina, e a desprotonação da serina ocasiona a formação de oxiânions, regiões no sítio ativo que irão acomodar os grupos da cadeia lateral dos substratos (PAIVA *et al.*, 2000; KAZLAUSKAS, 1994).

O mecanismo catalítico das lipases ocorre de modo semelhante ao modelo proposto para a quimotripsina, uma serina protease, devido à similaridade estrutural entre o sítio ativo de lipases e proteases. No início ocorre a desprotonação da serina com auxílio da histidina, através de uma ligação de hidrogênio. Assim, a serina atua como um grupo nucleófilo e ocorre o ataque do grupo hidroxila da serina no átomo de carbono do substrato com a consequente formação do intermediário acil-enzima tetraédrico. As cadeias laterais do substrato se posicionam por meio de ligações de hidrogênio na região de oxiânions, comumente chamada de bolsão ou orifício oxiânion, contribuindo para a estabilização do intermediário. Nesta etapa, o resíduo de aspartato (ou glutamato) participa estabilizando a carga positiva formada na histidina, uma vez que a desprotonação do aspartato neutraliza parcialmente a carga no complexo intermediário. Para desfazer o intermediário tetraédrico, a histidina perde

o próton e é formado um complexo acil enzima, liberando o primeiro produto. Por fim, na etapa de desacilação, o segundo substrato ataca o complexo acil enzima, formando novamente um intermediário tetraédrico. O intermediário tetraédrico é desfeito, ocorre a liberação do produto e regeneração do biocatalisador com a devolução do próton à serina nucleófila (JAEGER; REETZ, 1998; POLGÁR; HALÁSZ, 1982; REIS *et al.*, 2009).

3.2.1 Lipase B de *Pseudozyma (Candida) antarctica*

Conhecida como *Candida antarctica*, a levedura *Pseudozyma antarctica basidiomicetos* produz dois tipos de lipases, nomeadas A e B, com características distintas. A lipase A (CALA) não é específica e é mais termoestável, possuindo uma massa molecular de 45 kDa e um ponto isoelétrico (pI) de 7,5 (MARTINELLE; HOLMQUIST; HULT, 1995; UPPENBERG *et al.*, 1994).

A lipase B (CALB) é formada por uma estrutura de 317 aminoácidos, possuindo massa molecular de 30 a 33kDa e ponto isoelétrico (pI) igual a 6 (UPPENBERG *et al.*, 1994). É um dos principais biocatalisadores em síntese enzimática devido suas características que a fazem ser bastante versátil. A CALB é altamente regioseletiva na síntese de monoésteres, tem alta termoestabilidade e exibe forte estereoespecificidade durante a hidrólise ou síntese orgânica (UPPENBERG *et al.*, 1994).

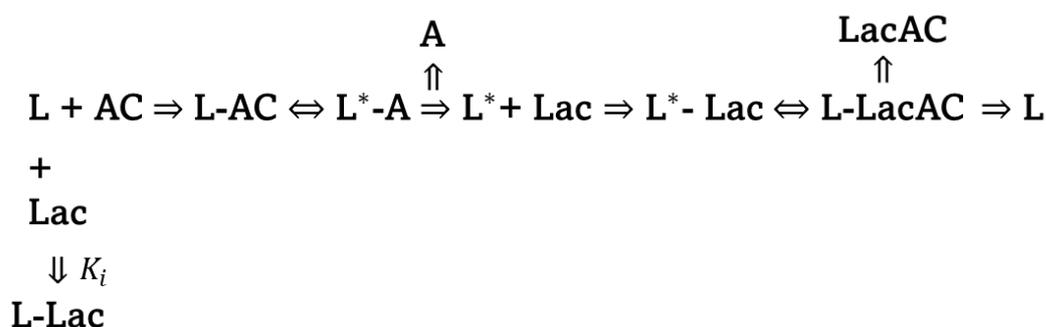
É importante dizer que lipase B de *Candida antarctica* (CALB) não tem ativação interfacial típica como a maioria das lipases. Sua estrutura apresenta um entrelaçado de α/β hidrolase com o sítio ativo formado pela tríade catalítica Ser105-Asp187-His244, mas não apresenta uma tampa comum (UPPENBERG *et al.*, 1994). Seu sítio ativo é parcialmente coberto por dois segmentos de alta mobilidade de resíduos de aminoácido em forma de $-\alpha$ hélice (α -hélice 5 e α -hélice 10) e o acesso ao local ativo é através de um canal hidrofóbico estreito (HERNANDEZ; GARCIA-GALAN; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; STAUCH; FISHER; CIANCI, 2015; UPPENBERG *et al.*, 1994). Apesar de tal estrutura formar uma espécie de tampa, não tem relação direta com a ativação interfacial (MARTINELLE; HOLMQUIST; HULT, 1995). A CalB assume a sua conformação aberta ou fechada de acordo com as propriedades do meio como, por exemplo, o aumento na temperatura do meio, presença de solventes orgânicos e alterações no pH (STAUCH; FISHER; CIANCI, 2015).

3.3 MECANISMO CATALÍTICO DE LIPASES NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO

Lipases catalisam a síntese da ligação éster de ácidos graxos com açúcares ou álcoois, produzindo biossurfactantes ou aromas, respectivamente. O mecanismo mais aceito para descrever as reações catalisadas por lipases é o Ping Pong Bi Bi. Em particular, na reação de esterificação com açúcares, a lipase se liga a uma molécula de ácido graxo formando uma versão acilada da enzima, um complexo intermediário acil-enzima, e liberando água. A acil-enzima se liga ao açúcar e uma ligação éster é formada com um dos grupos hidroxila disponível no substrato, finalmente liberando a enzima (OTERO *et al.*, 2001; STERGIOU *et al.*, 2013).

A Figura 2 apresenta o mecanismo Ping Pong Bi Bi de uma reação de esterificação catalisada por uma lipase comercial de *Candida rugosa* imobilizada em suporte de mica natural, a síntese de éster de lactose (LacAC) a partir dos substratos lactose (Lac) e ácido cáprico (AC). Inicialmente a lipase (L) reage com o ácido que doa um grupo acil para a formação de lipase-ácido cáprico não covalente (L-AC) que em sequência é transformado no intermediário acil-enzima, produzindo água (A). O intermediário (L*) se liga à lactose (Lac) e forma um complexo que é isomerizado por uma reação unimolecular a lipase-lactose caprato (L-LacAC), produzindo o éster lactose-caprato (LacAC) e liberando a enzima. Essa reação, em particular, representa um caso de inibição por lactose no qual, concomitantemente, a lactose se combina com a lipase formando um complexo lipase-lactose (L-Lac) (ZAIDAN *et al.*, 2011).

Figura 2 - Mecanismo enzimático Ping Pong Bi Bi para esterificação com inibição pelo açúcar



O que promove a reação de esterificação ou hidrólise é principalmente o teor de água do meio, a hidrólise ocorrendo em sistemas com alto teor aquoso.

3.3.1 Equação cinética para reação de esterificação

A equação de taxa para o mecanismo Ping Pong Bi Bi antes apresentado, com uma inibição por substrato, assumindo a influência dos produtos desprezível, é a Equação 1 a seguir.

$$v = \frac{V_{max}[CA][Lac]}{K_{m(CA)}[Lac]\left(1 + \frac{[Lac]}{K_i}\right) + K_{m(Lac)}[CA] + [CA][Lac]} \quad (1)$$

A taxa de reação é dada por v ; as concentrações dos substratos ácido cáprico e lactose são, respectivamente, $[CA]$ e $[Lac]$; V_{max} é a velocidade máxima, $K_{m(Lac)}$ e $K_{m(CA)}$ são as constantes de Michaelis Menten para lactose e ácido cáprico, e K_i é o coeficiente de inibição da lactose.

Li *et al.* (2015) avaliaram a síntese seletiva de frutose mono-acilada com ácido láurico catalisada pela CALB (Novozym 435) em 2-metil-2-butanol (2M2B) puro, ou usando líquidos iônicos (ILS) como co-solventes. Os autores relataram excelentes resultados para o ajuste de equações cinéticas com base no modelo de Ping Pong Bi Bi (com e sem inibição) para os dados de esterificação em 2M2B puro.

Dang; Obiri; Hayes (2005) em estudo de esterificação de frutose e ácido oleico catalisada por lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada (Lipozyme IM) em esferas de resina aniônica macroporosas em terc-butanol empregaram experimentos de taxa inicial para derivar um modelo cinético de Ping Pong Bi Bi sem inibição que concordou fortemente com os dados medidos (Eq. 2).

$$v = - \left(\frac{d[FA]}{dt} \right) = \frac{V_{max}[FA][S]}{K_S[FA] + K_{FA}[S] + [FA][S]} \quad (2)$$

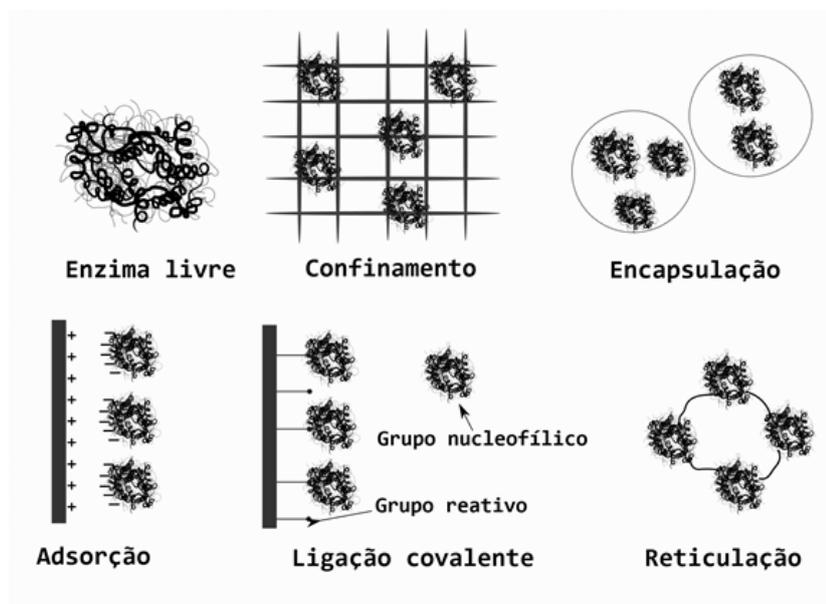
V_{max} representa a velocidade máxima, $[FA]$ indica a concentração do ácido graxo, $[S]$ a concentração do açúcar, K_S e K_{FA} são as constantes de Michaelis Menten.

3.4 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A maioria das enzimas são solúveis em água e, portanto, é impraticável a separação da enzima em um processo. O emprego de lipases imobilizadas no processo de esterificação permite a reutilização das mesmas por permitir a separação do biocatalisador e realização de processos contínuos, além de contornar problemas como a baixa estabilidade operacional e aumentar a resistência às influências de temperatura e pH (DUTTA, 2008; SOUZA *et al.*, 2017).

Os principais métodos para imobilizar enzimas são ligação à superfície, confinamento ou encapsulação em matriz porosa, e reticulação (autoagregação), apresentados na Figura 3.

Figura 3 - Esquema dos métodos de imobilização enzimática



Fonte: (SOUZA *et al.*, 2017) – Adaptado.

O confinamento envolve a síntese de uma matriz polimérica porosa em torno da enzima, aprisionando as moléculas entre as malhas, enquanto a encapsulação visa à imobilização da enzima no interior de cápsulas cujo envoltório é uma membrana polimérica (ex. alginato de cálcio). Essa membrana é semipermeável, impondo barreira física sem restringir sua mobilidade. A vantagem de ambos os métodos é a proteção da enzima do contato direto com o meio, o que minimiza chances de inativação. Dentre as dificuldades encontradas estão o controle do tamanho dos poros

do suporte, restrições para a transferência de massa e difusão dos substratos pelos poros (SOUZA *et al.*, 2017).

Na imobilização livre de suportes, os biocatalizadores podem ser ligados entre si no processo de reticulação. Dessa forma a enzima permanece praticamente pura, com alta estabilidade, e permite a redução no custo de produção. Neste método as enzimas imobilizadas são preparadas a partir da reação de um agente reticulante e preparados enzimáticos, dentre os quais os mais empregados são a enzima pura cristalizada e a enzima agregada, formando, respectivamente, cristais de enzima reticuladas (cross-linked enzyme crystals – CLEC) e agregados enzimáticos reticulados (cross-linked enzyme aggregates – CLEA) (SOUZA *et al.*, 2017).

A imobilização por ligação a superfícies ocorre por ligação covalente de moléculas de enzima, através de resíduos de aminoácidos não essenciais, para materiais funcionalmente insolúveis em água, por interações iônicas e por adsorção nos suportes por meio de ligações como forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas ou ainda pontes de hidrogênio. A imobilização por adsorção é o método mais comumente empregado e tem por grandes vantagens a facilidade e simplicidade do método, a reutilização do suporte, não necessidade de ativação e a estrutura conformacional da enzima pouco alterada. Materiais comumente empregados na produção de suportes incluem: celulose, dextrana, amido, polímeros, resinas, sílica, quitosana, agarose, entre outros (SOUZA *et al.*, 2017).

Em investigação sobre a cinética de ésteres de lactose e ácido cáprico na presença de lipase livre e imobilizada em suporte de mica, os resultados das constantes cinéticas apontaram uma maior afinidade dos substratos com a enzima imobilizada em suporte em comparação com a enzima livre na reação. Os autores obtiveram valores das constantes de Michaelis mais baixos em reações com a lipase em suporte e, também, velocidade máxima de reação mais alta para a enzima imobilizada. O coeficiente de efetividade, definido como a razão entre a máxima taxa de reação de lipase imobilizada sobre a de lipase livre, foi de 1,6, indicando uma maior eficiência em se empregar enzima imobilizada em suporte em detrimento do uso de enzima livre. A mudança na conformação da proteína após a imobilização pode ter aberto ou proporcionado uma posição dos sítios ativos mais favorável ao acesso pelos substratos (ZAIDAN *et al.*, 2011).

Nesse contexto, a imobilização enzimática pode ser vista como solução para a estabilidade no processo de catálise, tendo a conformação estrutural das lipases mais

favorável à reação, além das vantagens já citadas, como a possibilidade de reuso (fornecendo um meio de reduzir custos no processo).

3.5 REDES NEURAIS ARTIFICIAIS (RNAs)

Redes neurais artificiais (RNAs) são mecanismos de modelagem empírica inspirados nos sistemas nervosos biológicos, na habilidade de processamento e aprendizagem do cérebro humano (MATHWORKS, 2002; HAYKIN, 2007). Características que fazem das RNAs mecanismos largamente aplicados para a modelagem são a capacidade em resolver problemas complexos, a habilidade em aprender, a não-linearidade, a natureza maciçamente paralela, a tolerância a falhas e o seu poder de generalização (HAYKIN, 2007).

RNAs podem reconhecer padrões, organizar dados e determinar tendência comportamental. Devido a suas diversas características vantajosas e alta capacidade de modelagem, são amplamente utilizadas em diversas aplicações de engenharia química, como previsão de etapas da atividade enzimática (NUCCI *et al.*, 2007) predição da concentração de biomassa, substratos e produtos em bioprocessos (SILVA *et al.*, 2019), avaliação de remoção de concentração de oxigênio dissolvido em biorreator para tratamento de águas residuais (ANTWI *et al.*, 2018), estimativa de variáveis no processo de fermentação (KARIM; RIVERA, 1992).

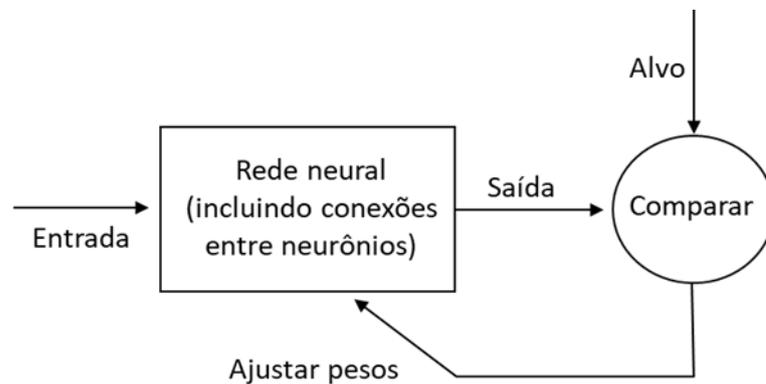
Consistem em camadas paralelas com elementos de processamento (neurônios artificiais) interligados entre si por pesos ajustáveis e, assim como o cérebro humano, têm a capacidade em armazenar conhecimento por meio de um processo de aprendizagem. O processo de aprendizado faz uso de um algoritmo de aprendizagem, e se refere ao procedimento com função de modificar os pesos da rede de forma a minimizar uma função objetivo (HAYKIN, 2007). O algoritmo mais comum das RNAs envolve um princípio de correção de erros, no qual se recorre à otimização de uma função quadrática do erro entre as respostas da RNA e as saídas desejadas (FACELI *et al.*, 2011).

3.5.1 Arquitetura de redes neurais

A função de uma rede é determinada em grande parte pelo número de neurônios que compõem cada camada e conexões (pesos sinápticos) entre os

elementos que a compõe. Em aprendizagem supervisionada, pode-se treinar uma rede neural para executar uma certa função ajustando os valores dos pesos dessas conexões para que determinada informação de entrada leve a uma saída específica. A rede é ajustada por meio da comparação entre a saída e o alvo, como indica a Figura 4 (MATHWORKS, 2002; FACELI *et al.*, 2011). Os pesos sinápticos ponderam as entradas recebidas por cada neurônio em conjunto com constantes denominadas por *bias* ou vieses, sendo que ambos são ajustáveis e adaptados no processo de aprendizado a cada novo treinamento da rede (FACELI *et al.*, 2011; HAYKIN, 2007).

Figura 4 - Esquema representativo do funcionamento do processo de aprendizagem supervisionada por redes neurais



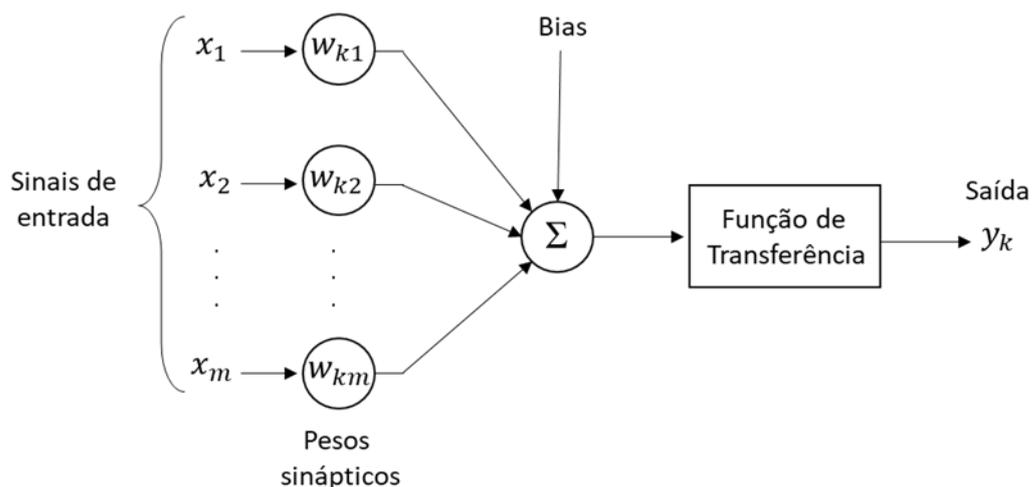
Fonte: (MATHWORKS, 2002) - Adaptado

Na forma mais simples de redes neurais, a rede de camada única, os sinais de entrada se projetam em uma saída por intermédio da ação de um único neurônio. A Figura 5 apresenta o modelo de um neurônio, indicando elementos básicos do modelo neuronal: um conjunto de sinapses, cada uma caracterizada por um peso; um *bias* (viés) aplicado externamente, com o efeito de aumentar ou diminuir a entrada da função de transferência; um somador para os sinais de entrada, ponderados pelos pesos e vieses; e, por fim, uma função de transferência para compensar as inter-relações entre as entradas (HAYKIN, 2007).

A rede costuma ser formada com mais de um neurônio e uma rede neural mais complexa possui várias camadas de neurônios, em uma rede multicamadas. São chamadas de camadas ocultas aquelas que se posicionam entre a camada de entrada e a camada de saída. Em cada neurônio de cada camada, a variável de entrada é transmitida, ponderada pelo peso, para formar o argumento da função de

transferência que, por sua vez, produz o valor de saída. O *bias*, quando presente, é somado ao produto da entrada ponderada.

Figura 5 - Modelo não-linear de um neurônio



Fonte: (HAYKIN, 2007) - Adaptado

Existem diversos tipos de função de transferência, sendo que algumas estão indicadas no Quadro 1 (MATHWORKS, 2002; HAYKIN, 2007).

Quadro 1 - Tipos de funções de ativação presentes no pacote Neural Network Toolbox do software Matlab R2016b

Função de Transferência	Expressão Matemática	Simbologia
Limite rígido (<i>hardlim</i>)	$f(x) = 1, x \geq 0$ $f(x) = 0, x < 0$	
Linear (<i>purelin</i>)	$f(x) = ax, \forall a \text{ constante}$	
Sigmoide (<i>logsig</i>)	$f(x) = \frac{1}{(1 + e^{-x})}$	
Tangente hiperbólica (<i>tansig</i>)	$f(x) = \frac{2}{(1 + e^{-2x}) - 1}$	
Rampa – Linear de saturação positiva (<i>satlin</i>)	$f(x) = x, 0 \leq x \leq 1$ $f(x) = -1, x < 0$ $f(x) = 1, x > 0$	

A função de transferência é comumente chamada de função de ativação, pois transforma as variáveis de entrada em uma escala menor, ativando-as para o próximo neurônio. A função de ativação utilizada neste trabalho é a sigmoide, uma das mais comumente utilizadas, dentre as funções não lineares, principalmente devido a assumir valores sempre positivos e ao seu comportamento “mais suave”.

3.5.2 Aplicação de RNAs em processo de esterificação enzimática

Estudos de modelagem com aplicação de redes neurais artificiais para previsão de dados em reações de síntese enzimática de biossurfactantes ainda são escassos na literatura. Foram encontrados poucos trabalhos com aplicação de RNAs em processos catalisados por lipase, de esterificação entre ácidos graxos e álcool. Em destaque, o trabalho de Adnani *et al.* (2011) que utilizaram redes neurais na previsão de dados em reações de esterificação entre ácido graxo e álcool.

Adnani *et al.* (2011) aplicaram RNAs para prever a conversão na esterificação enzimática entre xilitol e ácido palmítico. Os dados experimentais foram obtidos em reações catalisadas por lipase B de *Candida antarctica* imobilizada (Novozym 435) em solvente hexano. As variáveis de entrada das redes foram: razão molar de substrato, quantidade de peneira molecular, carga enzimática, volume de solvente, temperatura e tempo de reação. A variável de saída foi a conversão em éster. Inicialmente, os autores avaliaram diferentes arquiteturas e avaliaram o melhor número de camadas, neurônios, pesos e bias para cada rede. Segundo Adnani *et al.* (2011), é conveniente encontrar o número ótimo de camadas ocultas (o que melhora a capacidade de generalização da rede) e o número ideal de neurônios da(s) camada(s) oculta(s) (evitando que ocorra um sobreajuste).

No estudo foi empregada uma “caixa de ferramentas” (NNTOOL - *Neural Network Toolbox*) do Matlab para construção e treinamento das redes neurais *feedforward*. A função de transferência selecionada foi a função tangente hiperbólica (*tansig*) e, para a camada de saída, uma função de transferência linear (*purelin*). O algoritmo de aprendizagem de Levenbeg- Marquardt (LM) foi selecionado para treinamento das redes e ajuste dos seus parâmetros. Foram avaliados os desempenhos de redes com uma, duas e três camadas ocultas, variando o número de neurônios em cada uma delas. Os resultados mostraram que a rede com duas camadas ocultas contendo seis e sete neurônios na primeira e na segunda camada,

respectivamente, apresentou o melhor desempenho na previsão dos dados da conversão em éster. A correlação com o conjunto de dados de treinamento foi excelente, com R-quadrático igual a 1, para as três configurações de redes avaliadas. Com relação ao conjunto de dados de teste, a rede neural com duas camadas ocultas mostrou o melhor desempenho (com R^2 igual a 0,97) (ADNANI *et al.*, 2011).

Adnani *et al.* (2011) utilizaram o modelo de RNA que apresentou o melhor desempenho e estudaram o comportamento da enzima na produção de éster de xilitol. O processo foi analisado verificando a conversão em éster em função das variações nos parâmetros operacionais. Os autores verificaram que a conversão começava a diminuir após 7h de processo, sugerindo que a quantidade de água produzida na reação de esterificação poderia levar à hidrólise do éster. A conversão máxima do éster, em 7h de reação, foi obtida a 50°C, sendo que um aumento de temperatura ocasionou uma redução na conversão devido à desativação térmica da enzima. Quanto à quantidade de peneira molecular, foi verificado um aumento na conversão até 2,5g, sendo que depois disso pode ocorrer a remoção excessiva de água, que é necessária para a atividade enzimática. A carga enzimática também foi avaliada, verificando-se a carga ótima em 0,12g, sendo que uma maior quantidade de enzima poderia resultar em limitações de transferência de massa. A avaliação do efeito do aumento da razão molar de substratos (xilitol: ácido palmítico) indicou o aumento da conversão até um valor de RMS igual a 1. Já o volume ótimo de hexano como solvente foi avaliado como sendo de 10 mL.

3.6 LÓGICA FUZZY

Os conceitos da lógica *fuzzy* foram desenvolvidos inicialmente por Zadeh em 1965 e se baseiam na teoria dos conjuntos *fuzzy*. Enquanto na teoria de conjuntos clássica um elemento pertence ou não pertence a um conjunto, no sentido de que uma declaração só pode ser considerada verdadeira (valor 1) ou falsa (valor 0), na lógica nebulosa o raciocínio segue uma abordagem em que os valores extremos correspondem a limites e a variável também pode assumir valores dentro do intervalo [0, 1] (GOMIDE; GUDWIN, 1994; HASHMI; KHAN, 2015; NELLES, 2001).

A lógica *fuzzy*, nebulosa ou difusa, pode ser vista como uma metodologia para computação com uso de expressões linguísticas ao invés de valores numéricos somente, o que traz uma maior proximidade da intuição humana na resolução de

problemas (MATHWORKS, 2016). A lógica fornece um método de traduzir expressões verbais em valores numéricos. São consideradas a experiência, a intuição, o conhecimento dos operadores de processos e a imprecisão das observações humanas (HASHMI; KHAN, 2015; SIMÕES; SHAW, 2007).

3.6.1 Variáveis linguísticas e valores linguísticos

As observações imprecisas do operador, organizadas na forma de proposições, incluem determinados termos linguísticos nebulosos. Assemelha-se ao método experimental de se construir uma tabela em que se tem uma relação entre as variáveis de entrada e saída (variáveis linguísticas). As variáveis linguísticas são expressas na forma de conjuntos *fuzzy* (NELLES, 2001; SIMÕES; SHAW, 2007). Para rotular as entradas e saídas, em vez de se utilizar números reais pode-se utilizar valores linguísticos que descrevem tais condições e consequências. Também são chamados de “valores *fuzzy*” e são definidos matematicamente por funções de pertinência (SIMÕES; SHAW, 2007).

Variável linguística foi definida por Zadeh (1973) como uma variável cujos valores são sentenças em uma linguagem natural, informal. Por exemplo, se uma temperatura tem valor linguístico como “alto”, “baixo”, “muito alto” e “muito baixo”, então, temperatura é uma variável linguística. Em sistemas *fuzzy*, todos os possíveis valores de entradas $u(x)$ que podem ocorrer fazem parte do conjunto de entradas $U = \{u(x)\}$, onde U é universo de discurso da entrada. Uma entrada é dada como uma variável linguística u no universo de discurso U (ZADEH, 1973).

3.6.2 Funções de Pertinência

Cada valor linguístico da variável é um número nebuloso definido em U , ou seja, os termos como “alto”, “baixo”, “muito alto” e “muito baixo”, fazem referência a um valor definido em U (SIMÕES; SHAW, 2007). Um conjunto *fuzzy* A em um universo de discurso U é um subconjunto de elementos de U , sendo caracterizado por uma função de pertinência μ_A (Eq. 3) que assume valores no intervalo $[0, 1]$, em que o valor 0 indica uma completa exclusão e 1 indica completa pertinência. A função de pertinência associa a cada elemento x pertencente a U um número real $\mu_A(x)$ no

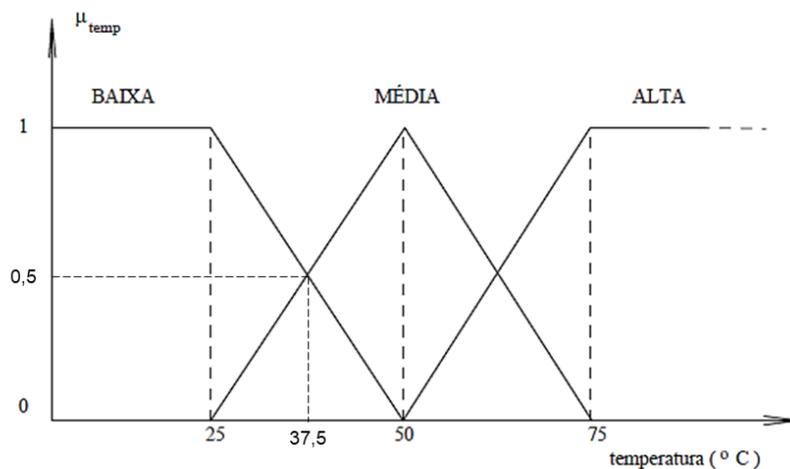
intervalo $[0, 1]$, caracterizando o grau de pertinência de x em A (GOMIDE; GUDWIN, 1994).

$$\mu_A : U \rightarrow [0, 1] \quad (3)$$

Em acréscimo, o conjunto *fuzzy* A é representado por um conjunto de pares ordenados $\{(\mu_A(x), x)\}$, para todo x pertencente ao conjunto universo U , em que $\mu_A(x)$ indica o quanto x é compatível com o conjunto A . Um determinado elemento x pode fazer parte de diferentes conjuntos difusos com compatibilidades diferentes, ou seja, diferentes valores para grau de pertinência (TANSCHEIT, 2007).

Os sistemas nebulosos lidam com cada entrada separadamente. A Figura 6 mostra os graus de pertinência que definem cada valor linguístico para a variável temperatura que, por sua vez, pode assumir um valor “baixo”, “médio” ou “alto”. Por exemplo, temperaturas menores ou iguais a 25°C são consideradas baixas, com grau de pertinência igual a 1, enquanto $37,5^\circ\text{C}$ é indicada como uma temperatura baixa com grau de pertinência 0,5 mas também média com grau de pertinência 0,5.

Figura 6 - Variável linguística temperatura



Fonte: (GOMIDE; GUDWIN, 1994) – Adaptado.

3.6.3 Regras Se-Então

As observações imprecisas do operador, na forma de proposições, são convertidas em regras *fuzzy*. Matematicamente, ao invés de se especificar um valor

exato de um ponto da função entrada-saída, uma seção cobre uma região da função que representa um conjunto de valores. Cada região é expressa por uma regra e são comumente utilizadas as regras do tipo Se-Então (SIMÕES; SHAW, 2007). Baseadas em expressões linguísticas, as regras Se-Então são representadas como (eq. 4):

$$\text{Se } \langle A \rangle \text{ Então } \langle B \rangle \quad (4)$$

Em que “A” é a condição (antecedente ou premissa) e “B” é a consequência da regra (consequente) (HASHMI; KHAN, 2015; SIMÕES; SHAW, 2007). Denominam-se as variáveis linguísticas utilizadas em “condição” como as entradas do modelo (de processo ou de controle) e as variáveis em “consequência” como as suas saídas. Com um conjunto completo de regras, todas as combinações possíveis entre as variáveis de entrada são cobertas (NELLES, 2001).

Nos termos da lógica matemática, podemos escrever a implicação $A_i \rightarrow B_i$, correspondente ao produto cartesiano $A_i \times B_i$ de dois conjuntos nebulosos, A e B. Em um sistema nebuloso, cada regra *fuzzy* representa uma relação, e o sistema como um todo será representado por uma implicação “global” *fuzzy* $R = \sum_i A_i \times B_i$ que combina todas as relações resultantes das regras nebulosas (GOMIDE; GUDWIN, 1994). O *modus ponens* generalizado, apresentado no Quadro 2, indica um mecanismo a partir dos conjuntos e regras *fuzzy*, do qual decorre importante regra de inferência: é possível afirmar o consequente B como verdadeiro a partir da afirmação do antecedente em A.

Quadro 2 - Modus *ponens* generalizado

Antecedente:	X é A
Implicação:	(X, Y) é $\sum_i A_i \times B_i$
Consequente:	Y é B

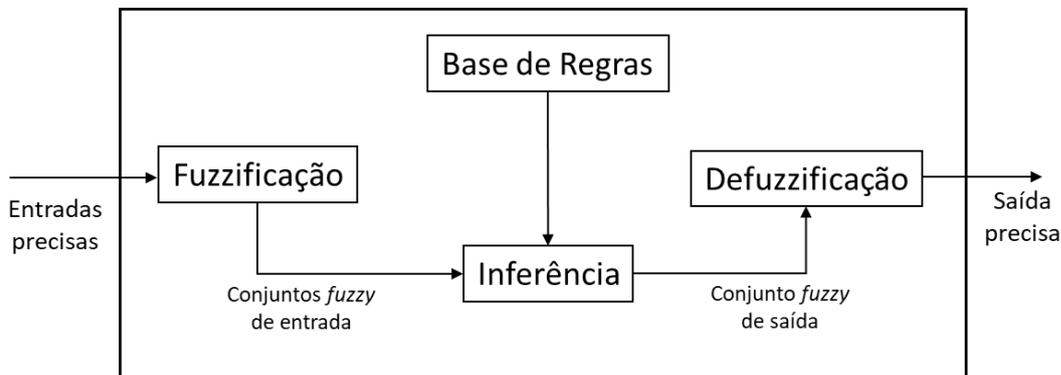
Fonte: SOUSA, 1999.

3.6.4 Sistema de inferência *fuzzy*

A avaliação em um sistema nebuloso é feita de acordo com as seguintes etapas: *fuzzificação*, inferência *fuzzy*, e *defuzzificação* (GOMIDE; GUDWIN, 1994;

TANSCHKEIT, 2007). A Figura 7 mostra um esquema com identificação das etapas de um sistema de inferência *fuzzy*.

Figura 7 - Estrutura básica de um sistema de inferência nebuloso



Fonte: (TANSCHKEIT, 2007) - Adaptado

Na etapa de *fuzzificação*, as variáveis de entradas precisas, resultantes de observações e medições experimentais, são mapeadas para os conjuntos *fuzzy* por meio das funções de pertinência. Ou seja, *fuzzificam-se* os valores das variáveis de entrada, transformando-os em conjuntos nebulosos (GOMIDE; GUDWIN, 1994; NELLES, 2001; TANSCHKEIT, 2007).

A fase de inferência é responsável pelo processamento dos dados nebulosos de entrada, junto com as regras, de modo a inferir a saída do modelo de processo (quando se tratar de modelagem *fuzzy* de processo, que é o caso do presente trabalho) ou as ações de controle (quando se tratar de aplicação de controle *fuzzy*). Inicialmente, combinam-se os antecedentes de cada regra Se-Então, aplicando operadores difusos “e” e “ou”, de acordo com o grau de acionamento da(s) regra(s) (MATHWORKS, 2016; NELLES, 2001). Posteriormente, os graus de ativação são utilizados para calcular a ativação das saídas das regras (o consequente, que é um conjunto difuso representado por uma função de pertinência). A agregação (ou acumulação) é o processo pelo qual todas as saídas das regras são combinadas nesse único conjunto difuso (MATHWORKS, 2016).

O conjunto *fuzzy* de saída agregada será a entrada para a etapa de *defuzzificação* e, por sua vez, a saída será um valor preciso (MATHWORKS, 2016). Dentre os métodos de *defuzzificação*, o do *Centro de Gravidade* é o mais comumente empregado e retorna, como valor de saída precisa, o valor que divide a área sob a

curva da função de pertinência em duas partes iguais (MATHWORKS, 2016; TANSCHKEIT, 2007). Existem sistemas em que a etapa de *defuzzificação* não se faz necessária porque a saída *fuzzy* é interpretada de modo qualitativo (SIMÕES; SHAW, 2007).

3.6.5 Modelos Takagi-Sugeno

Dentre os modelos que se destacam na literatura para implementação do mecanismo de inferência estão os sistemas do tipo Mamdani (em que os antecedentes e consequentes das regras estão na forma de conjuntos nebulosos), Takagi-Sugeno e Singleton (em que o consequente é um valor real) (NELLES, 2001). O modelo proposto por Takagi e Sugeno (TS) é comumente utilizado na modelagem de processos para aplicação da lógica nebulosa em sistemas não lineares (HASHMI; KHAN, 2015).

O modelo *fuzzy* TS possui uma estrutura baseada em regras Se-Então cujo termo antecedente envolve variáveis e valores linguísticos, mas o termo consequente admite a forma de funções que mapeiam as variáveis de entrada em saídas (Eq. 5) (TANSCHKEIT; GOMIDE; TEIXEIRA, 2007), sendo f , em geral, uma função linear das entradas (NELLES, 2001).

$$\text{Se } \langle (x_1 \text{ é } A_1) \text{ e } (x_2 \text{ é } A_2) \text{ e } \dots (x_n \text{ é } A_n) \rangle \text{ Então } \langle y = f(x_1, x_2, \dots, x_n) \rangle \quad (5)$$

A inferência decorrente do modelo TS de uma base de regras, ou seja, a saída nebulosa do sistema, é uma função obtida pela média ponderada das funções de cada uma das regras de acordo com seus respectivos graus de ativação (MATHWORKS, 2016; TANSCHKEIT; GOMIDE; TEIXEIRA, 2007).

Considerados como modelos locais ou globais de uma função, os parâmetros das funções de uma base de regras são determinados a partir de dados experimentais e satisfazem um critério como, por exemplo, a minimização dos erros quadráticos (TANSCHKEIT; GOMIDE; TEIXEIRA, 2007).

3.6.6 Sistemas de inferência *fuzzy* baseado em redes adaptativas (ANFIS)

Uma base de regras em um sistema *fuzzy* pode expressar o comportamento de um sistema com base nas observações de operadores humanos, através das relações do tipo Se-Então. Todavia, quando o comportamento do processo está na forma de conjunto de dados experimentais, pode-se utilizar sistemas de redes neurais artificiais treinadas com os conjuntos de dados para se obter automaticamente a base de regras necessária ao sistema nebuloso e, mais especificamente, as funções de pertinência e seus parâmetros (SIMÕES; SHAW, 2007). A ferramenta ANFIS (do inglês, Adaptive-Network-Based Fuzzy Inference System), disponível em *Fuzzy Logic Toolbox* do Matlab, pode ser utilizada (MATHWORKS, 2016). Ela funciona de maneira similar ao método de aprendizagem das redes neurais. O sistema neural realiza a modelagem definindo os parâmetros das funções de pertinência que permitem que o sistema de inferência difuso faça o mapeamento das entradas nas saídas. Os parâmetros das funções de pertinência são ajustados utilizando algoritmos de propagação retrógrada do erro (*backpropagation*) em combinação com algum método de estimativa de mínimos quadrados (MATHWORKS, 2016).

Inicialmente, utiliza-se uma estrutura de modelo hipotética (relacionando entradas e saídas às funções de pertinência para as regras). Depois, o ANFIS é treinado com dados de entrada e saída e gera um sistema de inferência *fuzzy* (FIS) que emula os dados de treinamento. Por fim, realiza-se a etapa de validação, feita a partir de conjuntos de dados de entrada e saída que não tenham sido utilizados. Um conjunto de dados de teste permite verificar a capacidade de previsão do modelo treinado. Utilizando um conjunto de dados de checagem, é possível verificar uma tendência na redução do erro da predição do modelo FIS à medida que o treinamento ocorre, até um ponto em que é observado um sobreajuste (*overfitting*) do modelo aos dados, momento em que o erro da predição do modelo começa a aumentar (MATHWORKS, 2016).

3.6.7 Aplicação de lógica *fuzzy* em processo de esterificação enzimático

Na literatura, não foram encontrados estudos de modelagem do processo de síntese de biossurfactantes por esterificação catalisada por lipases com aplicação do sistema de inferência *fuzzy*. Na modelagem e otimização da reação de esterificação

enzimática de álcool, destaca-se o trabalho de Chaibakhsh, Chaibakhsh e Rahman, (2011), que aponta a modelagem nebulosa como sendo bastante promissora. Em particular, os autores destacam a utilização da arquitetura ANFIS na identificação do modelo fuzzy (isto é, na determinação de seus parâmetros). Mais especificamente, Chaibakhsh, Chaibakhsh e Rahman (2011) estudaram a produção de adipato de diisobutil por esterificação de álcool isobutílico com ácido adípico em síntese catalisada por lipase CalB (Novozym 435). Os autores produziram um modelo *fuzzy* para a reação de esterificação com base em dados experimentais. Chaibakhsh, Chaibakhsh e Rahman (2011), mostram a aplicação da metodologia ANFIS, em uma estrutura que combina a capacidade de aprendizagem das redes neurais com a capacidade de modelagem de um sistema *fuzzy* baseado em regras.

Inicialmente, os autores definiram como variáveis de entrada a temperatura, o tempo, a carga enzimática e a razão molar do substrato (RMS – álcool: ácido) e, como variável de saída, o rendimento na produção do éster. Foi utilizado o ANFIS, amplamente utilizado para identificação de sistemas não lineares, com modelos do tipo Takagi-Sugeno. Um algoritmo de agrupamento *fuzzy* c-means (FCM) foi empregado para reduzir o número de regras e definir a estrutura do modelo *fuzzy*, visando reduzir a possibilidade de *overfitting* quando o banco de dados disponível fosse pequeno. O ajuste dos parâmetros do consequente, das regras agrupadas, foi realizado pelo método de minimização do erro quadrático com base em dados experimentais. Os autores realizaram o processo de treinamento do sistema neuro-*fuzzy* através da ferramenta *Simulink* no ambiente do software Matlab. Em uma última etapa, foi realizado o processo de otimização do processo de esterificação em busca das melhores condições operacionais utilizando o *Optimization Toolbox* do Matlab (CHAIBAKHSH; CHAIBAKHSH; RAHMAN, 2011).

Os resultados do FCM mostraram que quatro centros de agrupamento eram adequados para cobrir toda a gama de variáveis, com base nessa informação a estrutura do modelo foi definida e os ajustes dos parâmetros dos consequentes foi realizado. Os resultados obtidos indicaram que as saídas do modelo estavam muito próximas dos dados reais, com valores de R-quadrático acima de 0,99 nas etapas de treinamento e teste, e valores acima de 0,97 na etapa de validação, o que sugere a precisão do modelo desenvolvido. Na etapa de otimização, um experimento foi realizado com os mesmos parâmetros obtidos e houve boa concordância entre os dados previstos e reais (CHAIBAKHSH; CHAIBAKHSH; RAHMAN, 2011).

4. METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado em três etapas, utilizando-se dados de sínteses de biossurfactantes reportados por Lima *et al.* (2016; 2018), em distintas abordagens de modelagem matemática. A seguir são indicadas as condições operacionais e métodos empregados em cada uma dessas fases.

4.1 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS REFERENTES AO MODELO PING PONG BI BI

4.1.1 Condições experimentais

Os dados cinéticos de reações de esterificação utilizados nesta etapa do trabalho foram de Lima *et al.* (2018), obtidos sob as seguintes condições: 72 h de reação, 250 rpm de agitação, razões molares iniciais ácido: carboidrato de 1: 1 e 1: 2, concentrações de carboidratos de 25 e 50 mM em 10 mL de solvente orgânico (*tert*-butanol e 2-metil-2-butanol), temperaturas de 45 e 55 °C, cargas do biocatalisador de 0,25, 0,5 e 1,0 g, e 1,5 g de peneira molecular (material poroso que visa à adsorção do excesso de água do meio reacional). A Tabela 1 mostra as condições de operação dos experimentos selecionados para este estudo.

Tabela 1 - Condições operacionais de esterificação de ácidos graxos e açúcares em sistemas com diferentes solventes, catalisadas por lipases imobilizadas

Conjunto de dados	RMS ^(a)	Concentração de açúcar (mM)	Biocatalizador	Ácido graxo	Solvente	T (°C)	^(b) Massa (g)
1	1:1	Frutose (25)	CALB-IM-T2-350 ^(c)	Oleico	<i>tert</i> -butanol	45	0,50
2			PFL-octil-sílica ^(d)				Láurico
3				Lactose (50)	Oleico		
4			CALB-IM-T2-350				Oleico
5	1:2	Frutose (50)	CALB-IM-T2-350	Oleico	<i>tert</i> -butanol	55	
6						45	0,25
7							

^(a) Razão molar de substrato ácido:açúcar

^(b) Massa de biocatalisador

^(c) lipase comercial B de *Candida Antarctica* imobilizada

^(d) lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada hidrofobicamente em octil-sílica

O conjunto de dados 7, cujas condições operacionais estão na Tabela 1, foi utilizado apenas na etapa de validação do modelo.

4.1.2 Otimização dos parâmetros do modelo

Um software *in house* foi utilizado para a aplicação do método clássico de otimização paramétrica de Levenberg Marquardt. O modelo cinético Ping Pong Bi Bi sem inibição (Eq. 6) foi ajustado aos dados selecionados.

$$v = - \left(\frac{d[FA]}{dt} \right) = \frac{V_{max}[FA][S]}{K_{açúcar}[FA] + K_{ácido}[S] + [FA][S]} \quad (6)$$

Aqui V_{max} representa a taxa máxima, $[FA]$ indica a concentração do ácido graxo, $[S]$ a concentração de açúcar, e $K_{açúcar}$ e $K_{ácido}$ são as constantes de Michaelis-Menten para o açúcar e para o ácido, respectivamente.

4.2 DESENVOLVIMENTO DA MODELAGEM EM REDES NEURAIAS ARTIFICIAIS

4.2.1 Condições experimentais

Os dados utilizados para modelagem das redes neurais foram fornecidos por Lima *et al.* (2016), referentes à cinética de sínteses de ésteres de xilose e ácidos graxos obtidos por esterificação de ácido oleico ou láurico em meio de álcool *tert*-butílico. Os experimentos foram realizados nas seguintes condições ótimas previstas: 300 rpm de agitação, 72h de reação, 1g de peneira molecular, razão molar de ácido graxo/xilose (RMS) de 1:0,2 (20mM de xilose), carga de atividade de 37,5 UE/g de ácido e temperaturas de 46°C e 55°C. Os biocatalisadores empregados foram a lipase comercial B de *Candida Antarctica* imobilizada (CALB-IM-T2-350) e derivados da CALB imobilizada em Micropartículas Magnéticas de Sílica (SMMPs) com grupos octil (CALB-SMMP-OCTIL) ou com grupos octil mais glutaraldeído (CALB-SMMP-OCTIL-GLU).

As variáveis disponíveis para a modelagem foram os valores das concentrações de xilose (mM) ao longo do tempo (h) agrupadas com base nos tipos de ácido graxo (oleico ou láurico) e de biocatalisador (CALB-IM, CALB-SMMP-OCTIL ou CALB-SMMP-OCTIL-GLU). Inicialmente foram construídas as cinco RNAs

apresentadas na Tabela 2. Cada rede foi treinada com dados experimentais para as duas temperaturas disponíveis, 46°C e 55°C.

Tabela 2 - Especificações das redes neurais artificiais construídas e treinadas

Rede Neural	Biocatalisador	Ácido graxo
RNA-1	CALB-IM	Oleico
RNA-2		Láurico
RNA-3	CALB-SMMP-octil	Láurico
RNA-4	CALB-SMMP-octil-glu	Oleico
RNA-5		Láurico

A variável resposta utilizada como alvo no treinamento das redes foi a taxa de consumo do açúcar (velocidade em $\text{mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), previamente calculada por diferença finita a partir dos dados experimentais de concentração e tempo.

A construção e treinamento das redes neurais foi realizada utilizando, na interface gráfica de usuário do *software* Matlab versão R2016b, o pacote *Neural Network Toolbox*, que permite de forma simples a criação de redes, seleção das funções de transferência e método de aprendizado.

De acordo com a caixa de ferramentas do Matlab versão R2016b, para mapear um conjunto de dados de entradas em um conjunto de alvos, são indicadas redes do tipo *feed-forward* de duas camadas em que uma função de transferência sigmoide é utilizada na camada oculta e na camada de saída se utiliza uma função de transferência linear. Assim, neste trabalho foram utilizadas redes neurais do tipo *feed-forward* constituídas por uma camada de entrada, uma camada oculta e um neurônio na camada de saída.

As redes neurais do tipo *feed-forward* são as mais comumente empregadas na modelagem de bioprocessos e engenharia química, em diversas aplicações (ANTWI *et al.*, 2018; KARIM; RIVERA, 1992; LINKO; LUOPA; ZHU, 1997). Nelas os neurônios são organizados em camadas sem conexão lateral. Os dados entram na rede e as informações são propagadas para frente até a camada de saída, por meio de camadas intermediárias (NUCCI *et al.*, 2007).

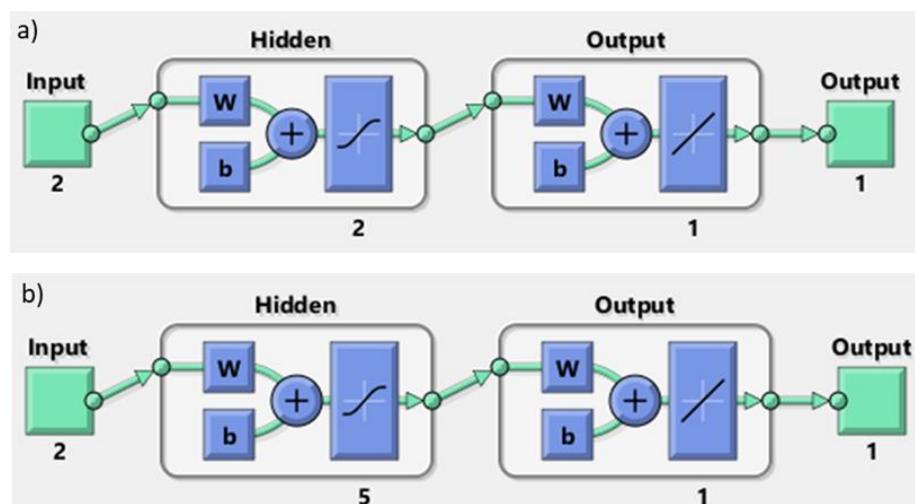
O algoritmo de aprendizagem de retropropagação (*backpropagation*) costuma ser usado para realizar os ajustes dos pesos e *bias* das RNAs durante a etapa de

treinamento, buscando minimizar o erro. Em retropropagação, primeiro as entradas são propagadas através da rede em um modo *feed-forward* para produzir as saídas, que são comparadas às saídas desejadas resultando em um sinal de erro para cada um dos neurônios de saída. Em seguida o erro é propagado para trás e os gradientes de erros são calculados para atualizar todos os pesos da rede (KARIM; RIVERA, 1992). O algoritmo minimiza a função erro por meio de um método de otimização baseado em gradiente (LINKO; LUOPA; ZHU, 1997). Dentro do pacote *Neural Network Toolbox*, foi selecionada a função “trainlm”, que emprega o método de Levenberg-Marquardt, apresentado no tópico 4.4.

O número de neurônios presentes na camada oculta normalmente depende do tipo e da complexidade do problema (BULSARI, 1993; LINKO; LUOPA; ZHU, 1997), a arquitetura ideal é definida a partir da realização de testes. Se a rede tiver muitos neurônios além do necessário, uma estrutura de modelo muito complexa é definida, sendo este um dos motivos para *overfitting* (NUCCI *et al.*, 2007).

Definidos os vetores entrada-saída, o tipo de arquitetura, o número de camadas e neurônios e as funções de transferência a serem utilizados, o programa apresenta um esquema da arquitetura da rede construída. A Figura 8 mostra as arquiteturas que apresentaram melhores desempenhos para as redes 1, 2, 4 e 5, que contém 2 neurônios na camada oculta (a), e da rede 3, com 5 neurônios. A figura também indica as funções de transferência utilizadas em cada camada: sigmoide (camada oculta) e linear (camada de saída).

Figura 8 - Arquitetura da RNA com uma camada oculta contendo: a) 2 neurônios e b) 5 neurônios



4.3 DESENVOLVIMENTO DE MODELAGEM EM SISTEMAS FUZZY

Buscando uma abordagem intermediária entre as duas utilizadas até o momento neste estudo, foi realizado o desenvolvimento de um modelo *fuzzy* para dados de síntese de biossurfactantes por esterificação enzimática. Em sistemas *fuzzy*, o conceito de “caixa preta” atribuído às modelagens empíricas por redes neurais é substituído pela ideia de “caixa cinza”, já que o comportamento passa a ser entendido pela relação semi-qualitativa nebulosa entre entrada e saída, regras *fuzzy*, funções de pertinência e variáveis linguísticas.

4.3.1 Condições experimentais

Os dados de cinética enzimática de esterificação de xilose com ácidos graxos (oleico ou láurico) em meio de álcool terc-butilíco foram fornecidos por LIMA *et al.* (2016). Os dados selecionados para esta etapa do estudo foram obtidos sob as seguintes condições operacionais: 300 rpm de agitação, 1g de peneira molecular, 20mM de xilose e carga enzimática de 37,5 UE/g de ácido. As variáveis de entrada neste estudo foram temperatura (T), razão molar de substratos ácido: açúcar (RMS), tempo de reação (t) e o tipo de ácido graxo (AG). Além disso, os biocatalisadores utilizados foram CALB-IM-T2-350, CALB-SMMP-OCTIL e CALB-SMMP-OCTIL-GLU. A Tabela 3 apresenta algumas especificações das condições operacionais que foram utilizadas para montar o banco de dados. Foi considerada a conversão de xilose (%) como variável de saída do sistema.

Tabela 3 - Condições operacionais dos dados experimentais selecionados

Ácido graxo (AG)	Oleico	Láurico		
Temperatura (T)	46°C	55°C		
Tempo de reação (t)	12h	24h	48h	72h
Razão ácido: açúcar (RMS)	1:0,2	1:0,14	1:0,1	

4.3.2 Modelagem *fuzzy*

Foi utilizada a ferramenta *Neuro Fuzzy Designer* do ANFIS do software Matlab na versão R2016b, que permite a criação do modelo por meio de interfaces gráficas de usuário (GUIs).

Foram realizadas as etapas necessárias separando os conjuntos de dados por tipo de biocatalisador, obtendo-se, portanto, 3 modelos distintos. Valores numéricos foram estipulados para distinguir os tipos de ácido graxo empregados: ácido oleico (1) e ácido láurico (2). De modo semelhante, foram consideradas as razões de ácido: açúcar como sendo 5 (1: 0,2), 7 (1: 0,14) e 10 (1:0,1). Visando melhorar a qualidade do ajuste do FIS, foram acrescentados dados a partir de uma interpolação feita a 36h.

Os dados de entrada e saída do sistema foram organizados em arquivo de texto, cada linha representando as combinações de variáveis de entrada e a respectiva saída. Assim, para cada biocatalisador, o arquivo de texto estaria na forma de vetor-coluna com 5 colunas, sendo a última correspondente aos dados de saída.

Depois de carregar os dados no ANFIS, eles são plotados num gráfico em que o eixo y representa a saída do sistema e o eixo x representa a posição dos dados no arquivo de texto. O modelo FIS foi gerado automaticamente pelo *Neuro Fuzzy Designer* bem como os valores linguísticos do modelo. Para a criação do sistema de inferência foi utilizada uma função de pertinência gaussiana (*gaussmf*), cuja relação é dada pela Equação 7 (Mathworks, 2016):

$$f(x; \sigma, c) = e^{\frac{-(x-c)^2}{2\sigma^2}} \quad (7)$$

Esta função é uma combinação de dois parâmetros: σ , que é o desvio padrão, e c , que é a média entre os valores de entrada x .

Foram selecionados previamente pelo operador os números de valores linguísticos 2, 2, 3 e 3 para tipo de ácido, temperatura, tempo e RMS, respectivamente. O Quadro 3 mostra as variáveis de entrada com seus respectivos valores linguísticos.

Quadro 3 - Variáveis de entrada, com respectivos valores linguísticos, e variável de saída do modelo FIS

Variáveis de entrada	Valores linguísticos	Variável de saída
AG	Oleico Láurico	Conversão de xilose (%)
T (°C)	Baixa Alta	
t (h)	Baixo Médio Alto	
RMS	Baixa Média Alta	

A etapa de treinamento do FIS foi realizada em sequência a partir da seleção do método de otimização paramétrica: híbrido (propagação retrógrada e mínimos quadrados). As condições operacionais eram iguais em todos os conjuntos de dados, de modo que os parâmetros das funções de pertinência ajustados pelo ANFIS foram iguais para todos os biocatalisadores, distinguindo apenas na saída do processo.

A Equação 8 representa as funções lineares de saída em função das variáveis linguísticas, em que a , b , c , d , e representam os parâmetros ajustados. Os valores dos parâmetros das funções de pertinência e funções de saída podem ser encontrados nos anexos deste trabalho.

$$f(AG, T, t, r)_i = a * AG + b * T + c * t + d * r + e \quad (8)$$

4.4 METODOLOGIA DE AJUSTE DE PARÂMETROS

O início do algoritmo de otimização paramétrica depende da definição de um critério. Na aprendizagem supervisionada, o erro $e(i)$ é normalmente calculado como a diferença entre a saída de medição do processo $y(i)$ e a saída do modelo $\hat{y}(i)$ para um dado número n de dados. A escolha mais comum para o critério é a soma do quadrado dos erros. Nelles (2001) fornece uma orientação para os problemas nos quais uma técnica geral de otimização local não linear pode ser mais adequada. O

número usual de avaliações de funções e iterações necessárias para encontrar o mínimo com uma determinada precisão de parâmetro, aplicando diferentes técnicas de otimização, também é apresentado por Nelles (2001): O algoritmo de Levenberg Marquardt (LM) tem um desempenho muito satisfatório. Quando a solução está longe do mínimo, o algoritmo se comporta como um método de gradiente descendente: lento, mas com garantia de convergência. Quando a solução está próxima do mínimo, ele se torna um método de Gauss-Newton e exibe convergência rápida. O método de LM, dado pela Equação 9, é o método de otimização local mais usado para ajuste de parâmetros, em que a busca iterativa é iniciada num ponto inicial e a região vizinha é explorada.

$$\theta_k = \theta_{k-1} - \eta_{k-1} (J_{k-1}^T \cdot J_{k-1} + \alpha_{k-1} \cdot I)^{-1} \cdot J_{k-1}^T \cdot f_{k-1} \quad (9)$$

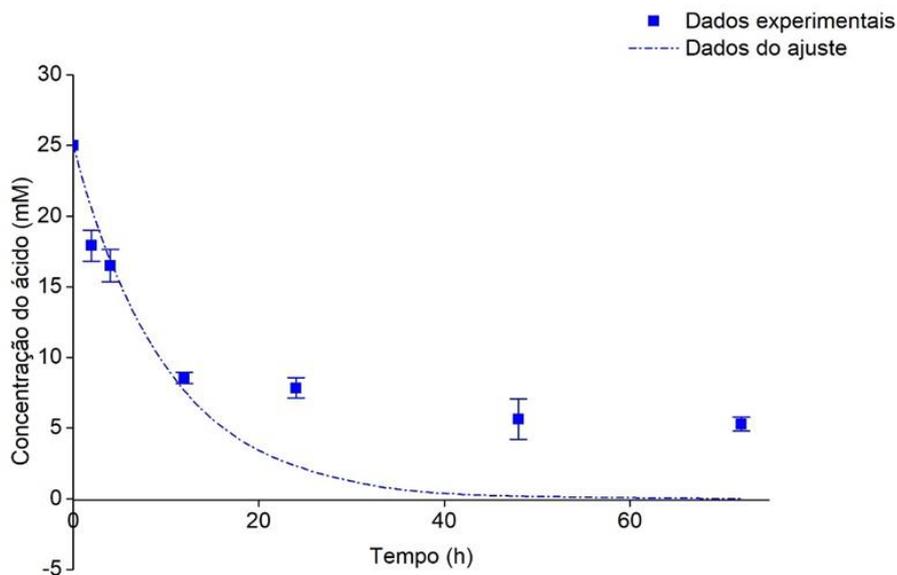
Aqui η_{k-1} é algum tamanho do passo, f_{k-1} é equivalente ao erro, $e(i)$, no passo $k-1$, I representa a matriz identidade, J^T é o jacobiano da matriz transposta, e α_{k-1} é um fator que determina se o algoritmo se aproxima de Gauss-Newton (valor pequeno) ou se aproxima do método do gradiente descendente (valores elevados).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS REFERENTES AO MODELO PING PONG BI BI

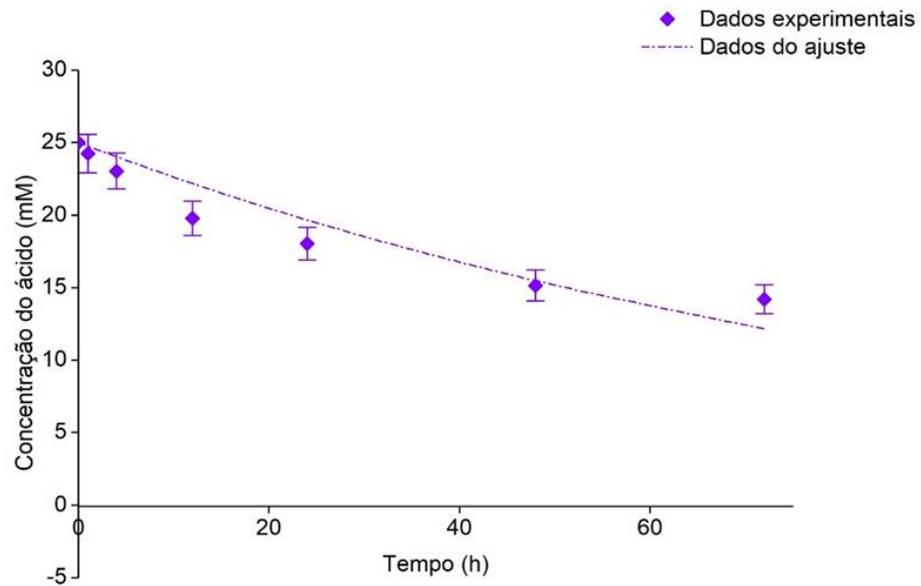
Para mostrar a eficiência do modelo proposto, os perfis de concentração de ácido são apresentados a seguir, indicando tanto os dados experimentais quanto dados do modelo ajustado (Figuras 9-14).

Figura 9 - Consumo de ácido para a síntese de oleato de frutose a 45°C, 250 rpm, 72h de reação, razão molar ácido: açúcar de 1:1, usando CALB-IM-T2-350 (0,5 g de derivado) em solvente terc-butanol



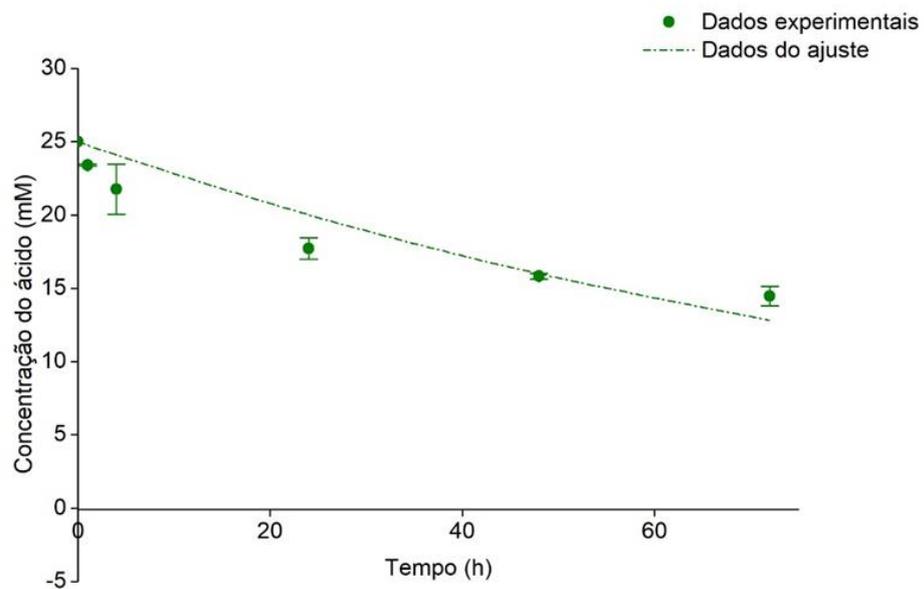
Fonte: Acervo pessoal

Figura 10 - Consumo de ácido para a síntese de oleato de frutose a 45°C, 250 rpm, 72h de reação, razão molar ácido: açúcar de 1:1, usando PFL-OCTIL-SÍLICA (0,25 g de derivado) em solvente terc-butanol



Fonte: Acervo pessoal

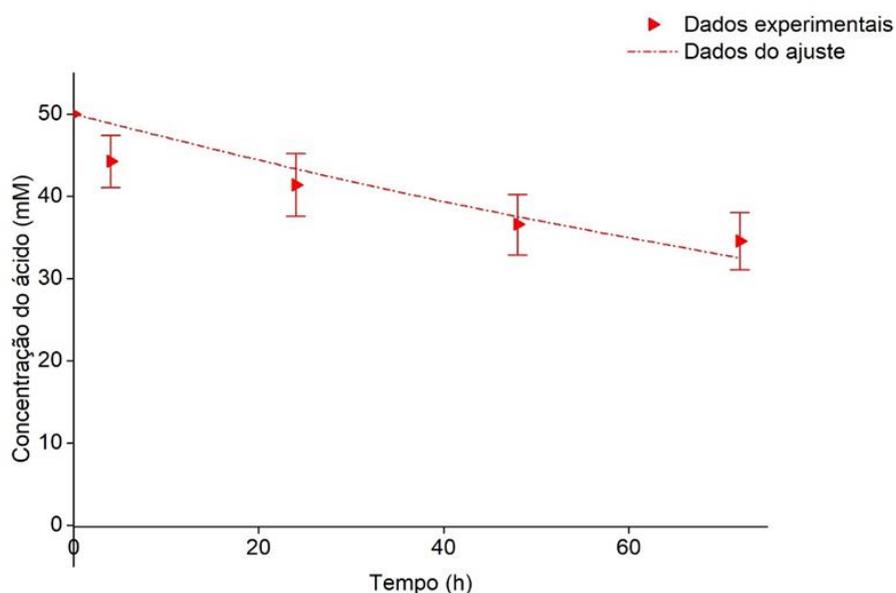
Figura 11 - Consumo de ácido para a síntese de laurato de frutose a 45°C, 250 rpm, 72h de reação, razão molar ácido: açúcar de 1: 1, usando PFL-OCTIL-SÍLICA (0,5 g de derivado) em solvente 2-metil-2-butanol



Fonte: Acervo pessoal

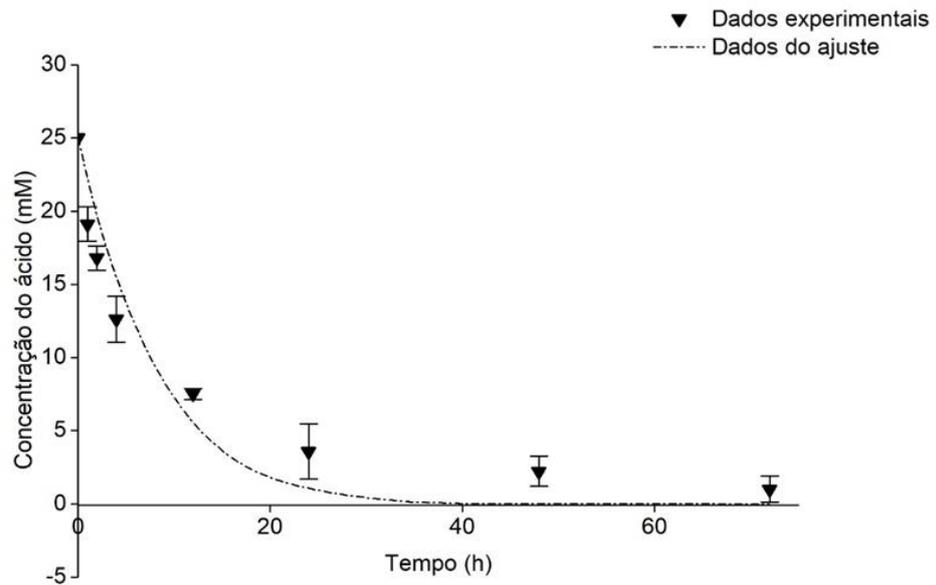
Pode ser visto nas Figuras 9-14 um bom ajuste do modelo proposto (mecanismo de Ping-Pong Bi Bi sem inibição) aos dados experimentais, com exceção para a síntese de oleato de frutose catalisada por CALB imobilizada utilizando um RMS de 1: 1 (Fig. 9). Provavelmente, como a reação foi realizada sob condições estequiométricas, a hidrólise do éster produzido pode ter ocorrido em alguma extensão devido a uma adsorção ineficiente de água na peneira molecular, o que não é previsto pelo modelo. Quando o valor da RMS foi aumentada para 1: 2 (Figuras 13 e 14), foi obtido um melhor ajuste, pois o excesso de açúcar desloca o equilíbrio da reação no sentido do produto. De fato, consumo quase que total de ácido é atingido após 24 h de reação usando a proporção molar 1: 2. Além disso, alguma inativação da enzima que não é prevista pelo modelo de esterificação também poderia explicar o consumo simulado superior de ácido. O estudo específico de hidrólise do éster e de inativação da enzima está além do objetivo deste trabalho.

Figura 12 - Consumo de ácido para a síntese de laurato de lactose a 45°C, 250 rpm, 72h de reação, razão molar ácido: açúcar de 1: 1, usando PFL-OCTIL-SÍLICA (0,5 g de derivado) em solvente terc-butanol



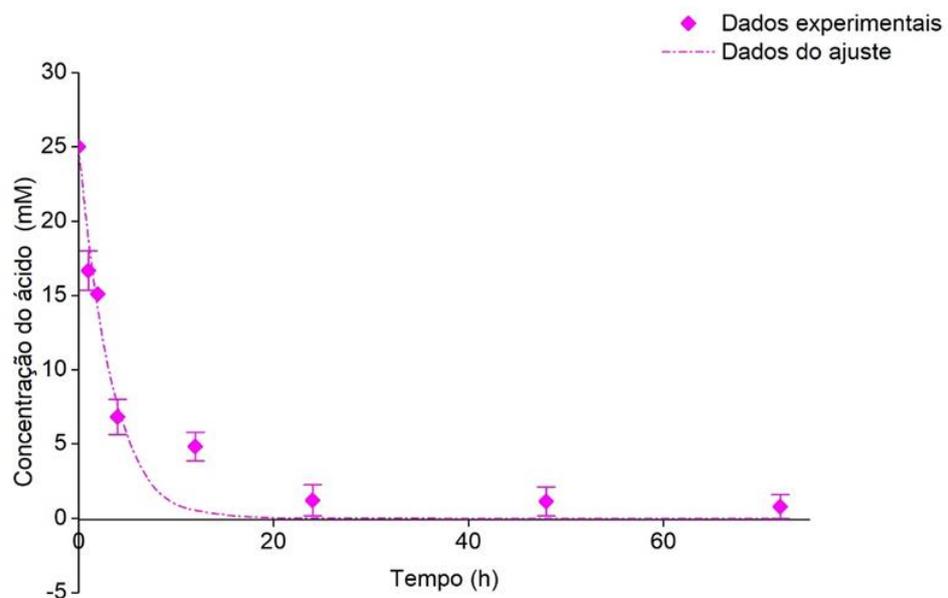
Fonte: Acervo pessoal

Figura 13 - Consumo de ácido para a síntese de oleato de frutose a 45°C, 250 rpm, 72h de reação, razão molar ácido: açúcar de 1:2, utilizando CALB-IM-T2-350 (0,5 g de derivado) em solvente terc-butanol



Fonte: Acervo pessoal

Figura 14 - Consumo de ácido para a síntese de oleato de frutose a 55°C, 250 rpm, 72h de reação, razão molar ácido: açúcar de 1: 2, utilizando CALB-IM-T2-350 (0,5 g de derivado) em solvente terc-butanol



Fonte: Acervo pessoal

Quando foi utilizado o biocatalisador PFL-OCTIL-SÍLICA, o consumo de ácido foi mais lento, mas o modelo proposto foi capaz de prever o comportamento experimental.

A Tabela 4 mostra os parâmetros cinéticos para o modelo (Eq. 3) ajustado aos dados experimentais de consumo de ácido (lembrando que foi assumida a produção apenas de monoésteres, relacionando o consumo de açúcar e de ácido por uma relação equimolar). Pode-se esperar a partir dos valores de K, constante de afinidade da enzima por seu substrato (SHULER; KARGI, 2001), que a CALB imobilizada comercial (conjuntos 1, 5 e 6) tem uma afinidade por frutose e ácido oleico maior que a PFL (conjunto 2).

Tabela 4 - Valores de V_{max} , $K_{açúcar}$ e $K_{ácido}$ ajustados aos dados de esterificação enzimática (consumo de ácido e açúcar) ^(a)

Conjunto de dados	RMS	T(°C)	V_{max} (mmol. L ⁻¹ .h ⁻¹)	$K_{açúcar}$ (mmol. L ⁻¹)	$K_{ácido}$ (mmol. L ⁻¹)
1	1:1	45	470 (fixo)	1378±1696	3298±1015
2			221±34	10000 (fixo)	12107 (fixo)
3			173±29	10000	8668 (fixo)
4			124±13	12000	8668
5	1:2	55	470	1378±1696	3298±1015
6			1133±221	1378±1696	3298±1015

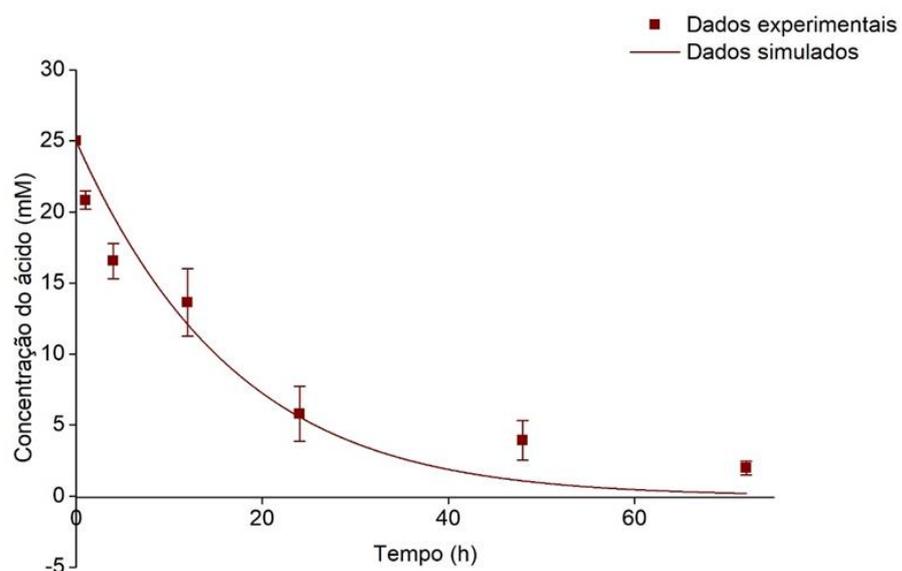
^(a)Método de Levenberg Marquardt foi utilizado para estimar os parâmetros cinéticos

É importante destacar que um ajuste simultâneo de parâmetros para os conjuntos de dados 1, 5 e 6 foi realizado pois não existem diferenças relevantes nas condições operacionais para os conjuntos de dados 1 e 5, e os valores de $K_{açúcar}$ e $K_{ácido}$ para o conjunto de dados 6 são iguais aos dos conjuntos de dados 1 e 5. Pode ser observado na tabela 4 que o valor de V_{max} para o conjunto de dados 6 foi de cerca de duas vezes maior do que o valor fixado para os conjuntos de dados 1 e 5. Este comportamento está em conformidade com a regra de Van't Hoff, ou seja, a taxa de reação quase duplica com um aumento de temperatura de 10°C (RUSSEL, 1994; SHULER; KARGI, 2001). Em geral, os valores de V_{max} são consistentes com os perfis de consumo de ácido experimentais. É importante mencionar que alguns parâmetros (valores de K) para os conjuntos de dados 2, 3 e 4, que foram ajustados

simultaneamente, puderam ser fixados (com alguns considerados iguais) durante a execução do procedimento de ajuste, reduzindo os graus de liberdade e tendo pouca influência nas estimativas dos parâmetros restantes. Os valores de K fixados correspondem àqueles para os quais tendiam naturalmente, enquanto a convergência no processo de ajuste era alcançada como um todo. Também é interessante notar que os valores de K do biocatalisador PFL foram muito semelhantes entre si (10000, 12000, 12107 e 8668 mmol. L⁻¹), independentemente do tipo de açúcar e do ácido graxo, com um valor médio ponderado calculado de $K = 10241 \pm 1526$ mmol/L.

A fim de validar o modelo proposto, um novo conjunto de dados experimentais de esterificação de frutose e ácido oleico foi usado, cuja carga enzimática de CALB-IM-T2-350 foi de 0,25 g (conjunto de dados 7 da Tabela 1). Nesta validação, os valores $K_{\text{açúcar}}$ e $K_{\text{ácido}}$ foram os mesmos obtidos para o conjunto de dados 5, mas utilizando o V_{max} (a partir de dados de ajuste do conjunto 5) dividido por dois, porque a carga de enzima no conjunto de dados 7 foi duas vezes mais baixa do que no conjunto de dados 5. A Figura 15 mostra que o modelo proposto foi capaz de prever com precisão o novo conjunto de dados experimentais.

Figura 15 - Consumo de ácido para a síntese de oleato de frutose a 45 ° C, 250 rpm, 72 h de reação, razão molar ácido: açúcar de 1:2, utilizando CALB-IM-T2-350 (0,25 g de derivado) em solvente terc-butanol



A Tabela 5 lista os parâmetros cinéticos obtidos neste trabalho e aqueles previamente relatados para outros sistemas reacionais. Uma comparação profunda é difícil, porque os sistemas reacionais (tipo de lipase, suporte de imobilização, temperatura, solventes orgânicos etc.) são diferentes. Mas, em geral, a ordem de grandeza dos parâmetros é consistente. De qualquer forma, é importante lembrar que os modelos matemáticos devem ser usados com cuidado, levando em consideração as condições experimentais utilizadas em sua construção e validação. Nesse sentido, pode-se mencionar que a modelagem cinética apresentada aqui poderia ser aprimorada do ponto de vista experimental e matemático. Do ponto de vista experimental, pode-se pensar na realização de outros tipos de ensaios cinéticos, principalmente os de velocidade inicial de esterificação, variando a concentração de açúcar em uma concentração fixa de ácido (e vice-versa). Esse tipo de ensaio cinético pode adicionar informações para melhorar a estimativa de parâmetros (e a avaliação de suas regiões de confiança).

Tabela 5 - Constantes cinéticas para o modelo cinético Ping-Pong Bi-Bi de esterificação enzimática de ácidos carboxílicos com carboidratos em meio orgânico

Mecanismo	Açúcar	Ácido	Biocatalisador	T°C	RMS	Solvente orgânico	Constantes cinéticas (mmol / L) ^(a)			Referência
							$K_{a\text{çúcar}}$	$K_{\text{ácido}}$	K_i ^(b)	
Ping Pong Bi Bi com inibição pelo substrato	Lactose	Cáprico	NER-CRL ^(c)	60	---	Acetona	19919	31	49×10^{-2}	(Z Aidan <i>et al.</i> , 2011)
	Frutose	Láurico	CALB-IM Novozym 435	50	1: 1	2-Metil-2-Butanol	7240	35	44×10^{-1}	(Li <i>et al.</i> , 2015)
	Frutose	Láurico	CALB-IM Novozym 435	50	1: 1	2-metil-2-butanol	6507	11588	---	(DANG; OBIRI; HAYES, 2005)
Ping-Pong Bi-Bi sem inibição	Frutose	Oleico	Lipozyme IM ^(d)	65	1: 1	<i>Terc</i> -butanol	401	387	---	(DANG; OBIRI; HAYES, 2005)
	Frutose	Oleico	CALB-IM-T2-350	45	1: 1	<i>Terc</i> -butanol	1378±1696	3298±1015	---	
	Frutose	Oleico	PFL-octil-Sílica	45	1: 1	<i>Terc</i> -butanol	10000	12107	---	
	Frutose	Láurico	PFL-octil-Sílica	45	1: 1	2-metil-2-butanol	10000	8668	---	Este trabalho
	Lactose	láurico	PFL-octil-Sílica	45	1: 1	<i>Terc</i> -butanol	12000	8668	---	
	Frutose	Oleico	CALB-IM-T2-350	45	1: 2	<i>Terc</i> -butanol	1378±1696	3298±1015	---	
Frutose	Oleico	CALB-IM-T2-350	55	1: 2	<i>Terc</i> -butanol	1378±1696	3298±1015	---		

^(a)Para Zaidan *et al.* (2011) e Li *et al.* (2015), os valores originais de $K_{a\text{çúcar}}$ e $K_{\text{ácido}}$ foram convertidos para mmol/L para facilitar a comparação

^(b)Constante de inibição enzimática

^(c)Lipase de *Candida rugosa* imobilizada em mica nanoporosa

^(d)Lipase comercial de *Rhizomucor miehei* imobilizada em grânulos de resina microporosa aniônica

5.2 DESENVOLVIMENTO DA MODELAGEM EM REDES NEURAS ARTIFICIAIS

As redes neurais foram treinadas para prever a taxa de consumo de xilose no processo de síntese de biossurfactantes. Cada rede neural foi treinada usando dados experimentais das variáveis de entrada temperatura e concentração do açúcar.

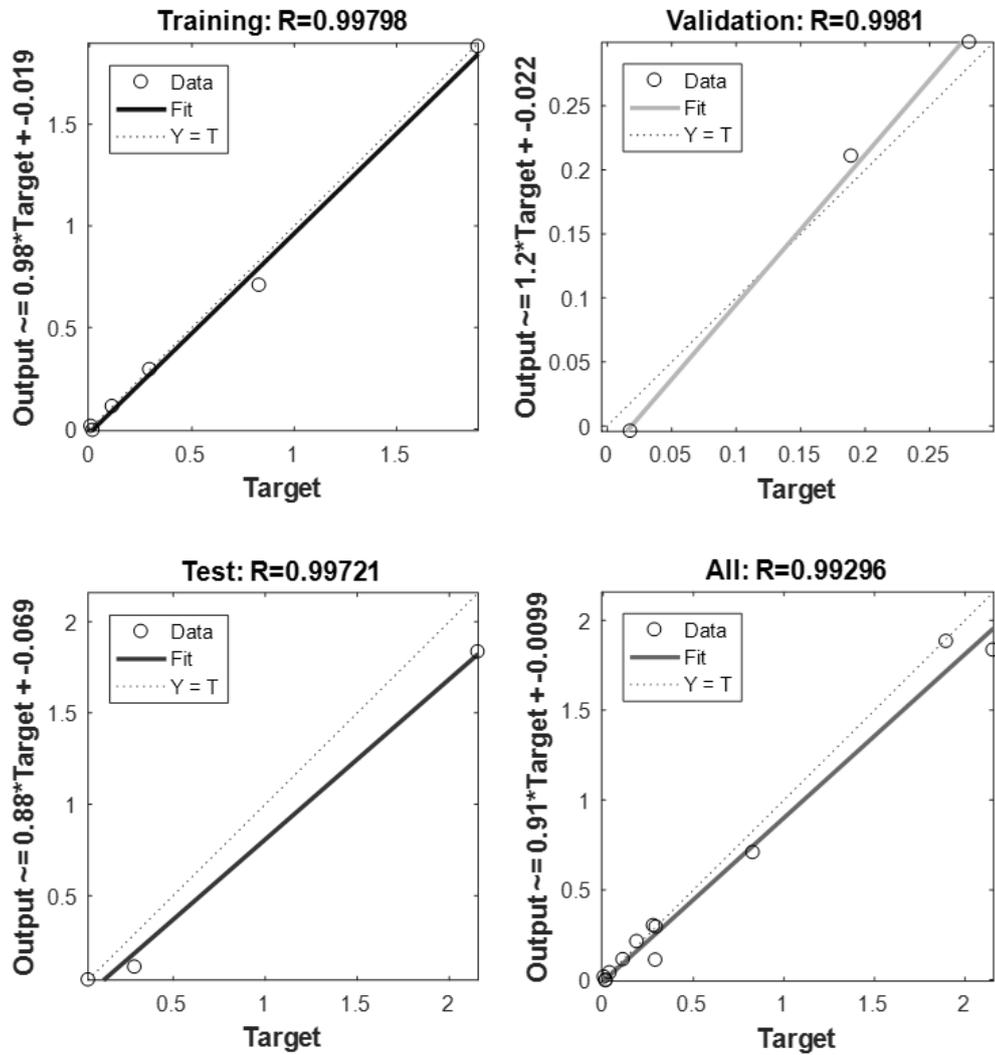
Os vetores de variáveis de entrada e saída disponíveis foram divididos aleatoriamente para treinar (60%), testar (20%) e validar (20%) a rede. A etapa de treinamento foi realizada para que a rede aprendesse o comportamento dos dados enquanto a validação é uma previsão comparada com alguns dados visando avaliar a capacidade de generalização da rede. O teste é feito durante a etapa de treinamento, para avaliar o desempenho do processo de ajuste, é um critério de parada do programa.

A avaliação do desempenho da rede treinada foi feita pelo valor do coeficiente de determinação, R-quadrático, acarretado pela comparação do valor da saída da rede (*outputs*) e o valor experimental da variável de saída (*target*). Para que uma rede seja considerada adequada é necessário que o valor R seja de mesma ordem de grandeza nas etapas de treino, teste e validação, o que indicaria um bom desempenho nos três conjuntos de dados.

De acordo com o tópico 4.2.1, foram construídas quatro redes neurais com 2 neurônios na camada oculta e uma rede com 5 neurônios. As redes foram treinadas até que houvesse uma boa aproximação do modelo aos dados de treinamento, teste e validação aliado a bons valores de R-quadrático. Treinamentos em excesso, ao invés de melhorar, resultavam em piora nos valores de R e/ou grande descolamento do modelo (representado por retas com angulações muito distintas dos 45° ideais).

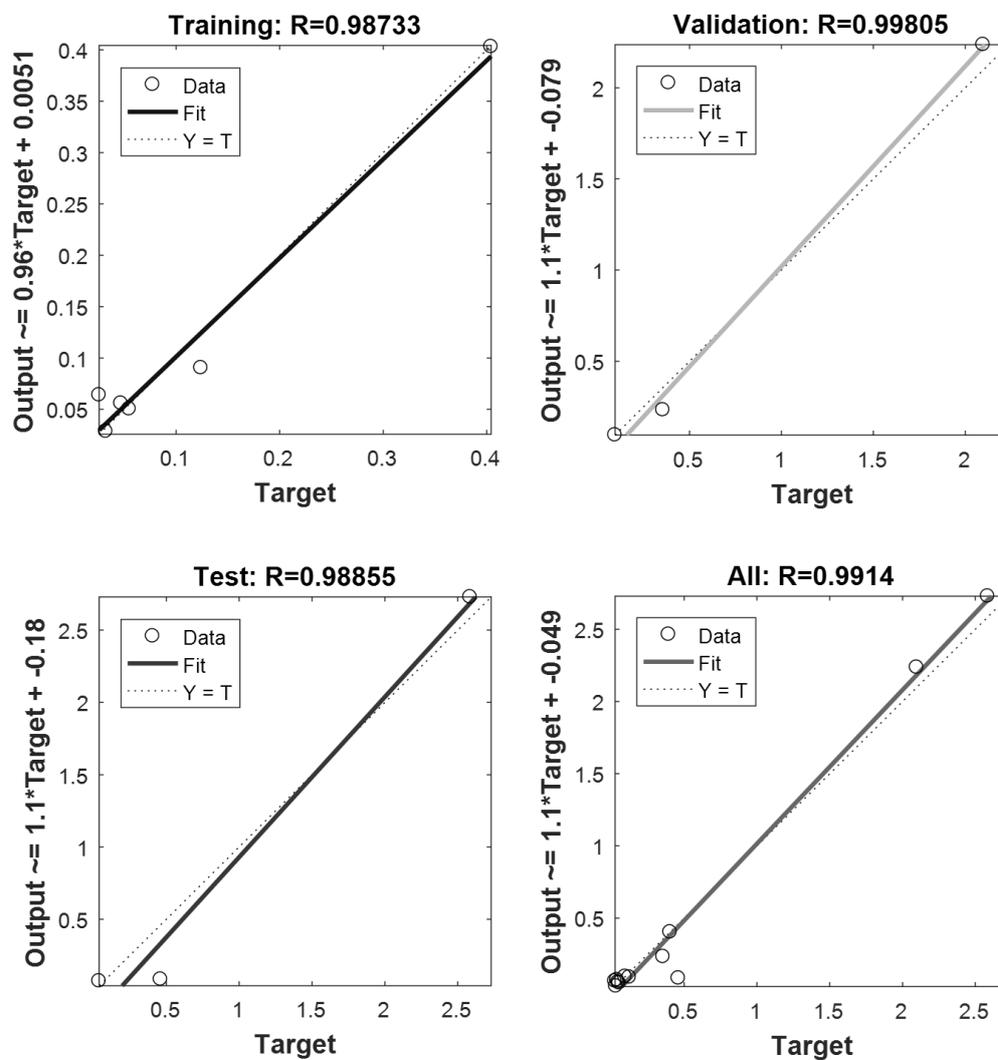
As Figuras 16-20 apresentam os gráficos dos valores de saída da rede em função dos valores esperados (dados experimentais) para cada uma das etapas referidas anteriormente além do gráfico que considera todos os dados.

Figura 16 - Gráficos de regressão para dados de treinamento, validação e teste da RNA-1, empregada na previsão dos dados da síntese de oleato de xilose com CALB-IM-T2-350



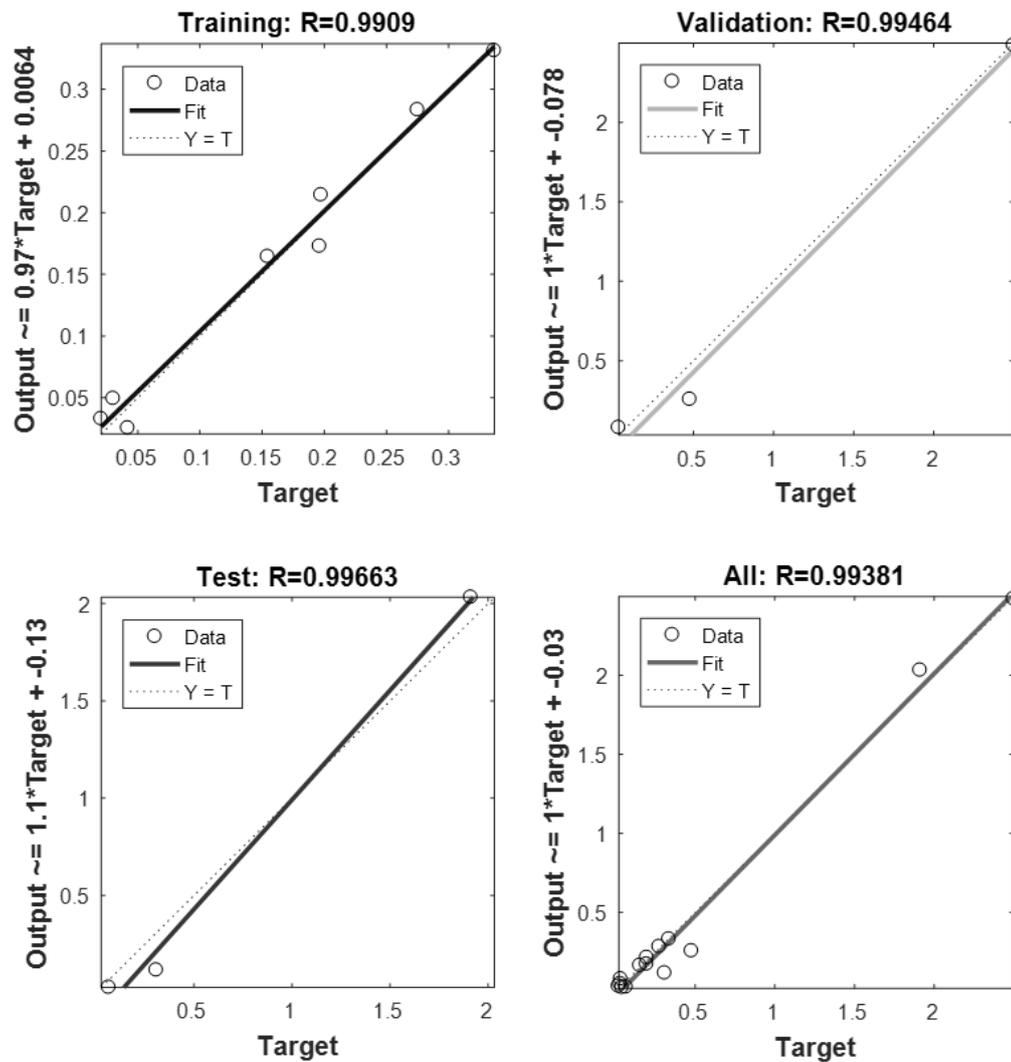
Fonte: Acervo pessoal

Figura 17 - Gráficos de regressão para dados de treinamento, validação e teste da RNA-2, empregada na previsão dos dados da síntese de laurato de xilose com CALB-IM-T2-350



Fonte: Acervo pessoal

Figura 18 - Gráficos de regressão para dados de treinamento, validação e teste da RNA-3, empregada na previsão dos dados da síntese de laurato de xilose com CALB-SMMP-OCTIL

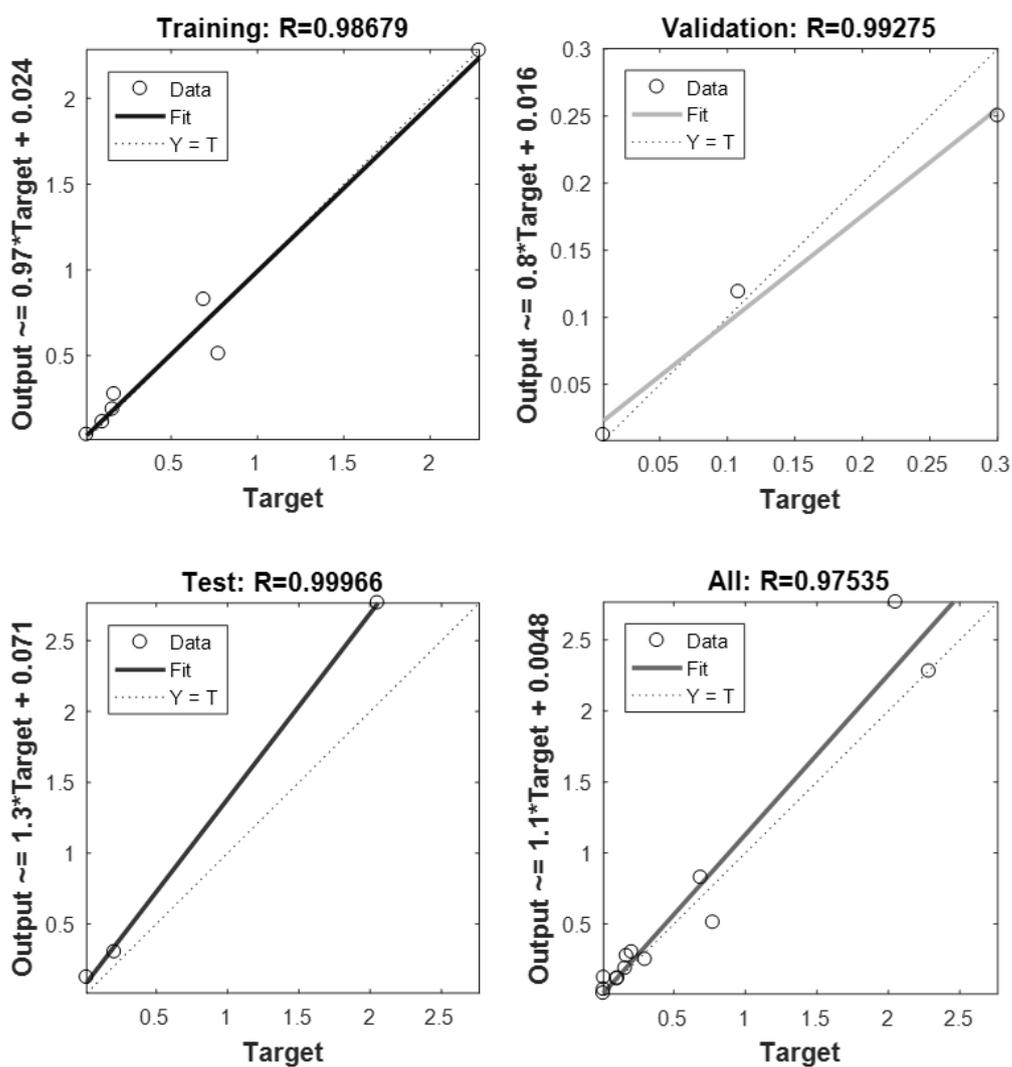


Fonte: Acervo pessoal

De modo geral, nota-se boa correlação entre os dados experimentais e os valores de saída calculados pelas redes. Verifica-se valores de R-quadrático acima de 0,97 para todos os casos analisados, a maioria com valores de R maior que 0,99, portanto bastante satisfatórios. A linha pontilhada presente nas imagens representa a situação ideal em que o resultado previsto pela rede é igual ao resultado esperado ($output = target$). Portanto, a indicação de alta correlação entre a saída da rede e os dados experimentais é reforçada pela notória aproximação de uma angulação de 45° na inclinação da reta de regressão, principalmente nos plotes que consideram todos

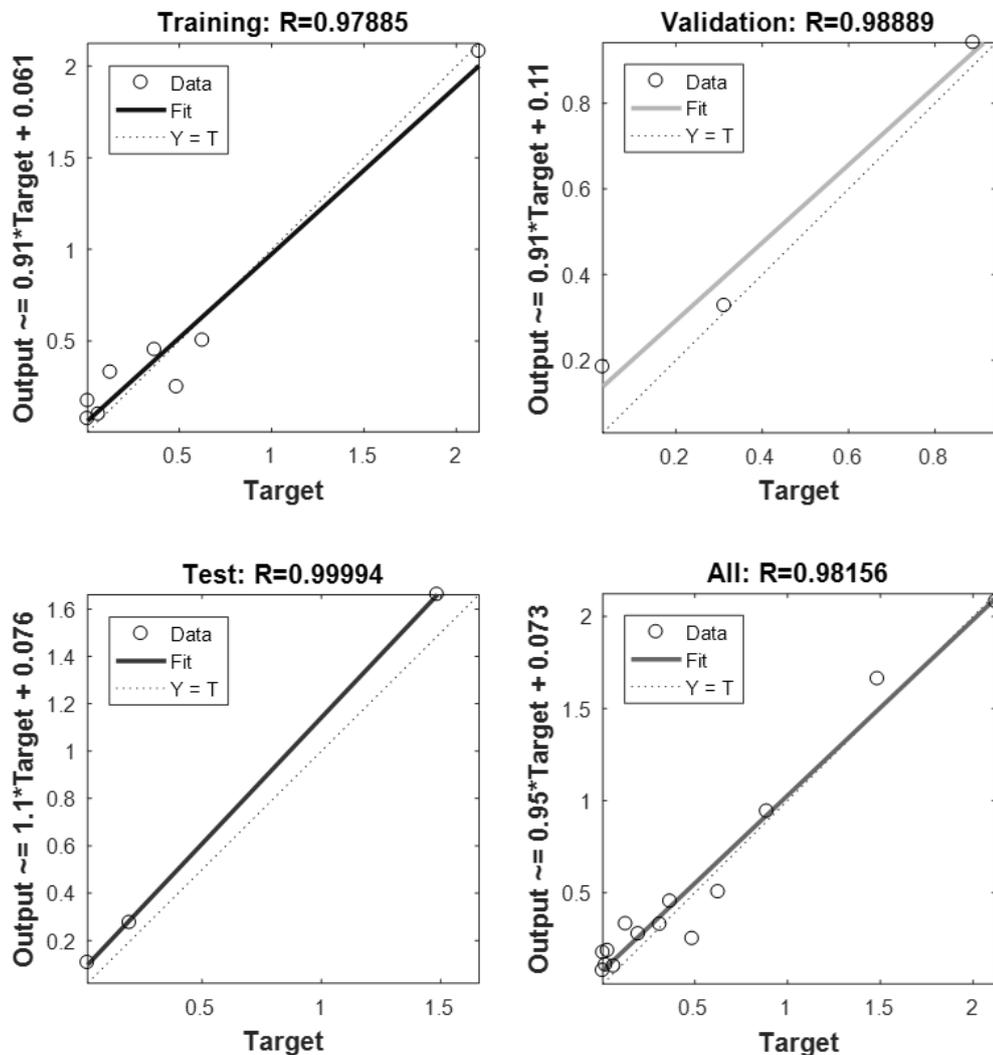
os dados disponíveis, e neste caso também é observado que os pontos estão bem distribuídos ao redor da linha de regressão.

Figura 19 - Gráficos de regressão para dados de treinamento, validação e teste da RNA-4, empregada na previsão dos dados da síntese de oleato de xilose com CALB-SMMP-OCTIL-GLU



Fonte: Acervo pessoal

Figura 20 - Gráficos de regressão para dados de treinamento, validação e teste da RNA-5, empregada na previsão dos dados da síntese de laurato de xilose com CALB-SMMP-OCTIL-GLU



Fonte: Acervo pessoal

Ao realizar o treinamento que comprovasse a eficiência da rede, eram salvos os dados referentes aos parâmetros da RNA, visto que os valores específicos de pesos sinápticos e vieses (*bias*) mudam a cada treino da rede (em virtude de diferentes inicializações, a cada treinamento) e determinam a estrutura da rede neural modelada. A Tabela 6 mostra os valores dos pesos entre as variáveis de entrada, temperatura (T) e concentração de xilose ([X]), e os neurônios da camada oculta, enquanto a tabela 7 apresenta os valores dos pesos entre os neurônios da camada oculta e a camada de saída.

Tabela 6 - Valores dos pesos entre as variáveis da camada de entrada e os neurônios da camada oculta ao final do treinamento

Rede Neural	Variável	0	1	2
	Neurônio	Bias	T	[X]
RNA-1	1	-2,8756	0,5120	0,2213
	2	-0,6383	0,1864	2,2519
RNA-2	1	-4,7801	-1,0376	-2,3595
	2	1,2128	-1,0985	-3,0461
RNA-3	1	2,7665	-3,0798	-0,6186
	2	-1,6290	-0,4833	3,4474
	3	0,004160	-2,7056	1,5299
	4	-1,9060	-2,4636	-1,7699
	5	3,2927	2,2792	-1,9237
RNA-4	1	-0,6758	2,7119	0,2711
	2	0,9028	-0,1867	-1,5022
RNA-5	1	-0,8268	0,5557	2,0855
	2	2,1906	1,9355	0,0747

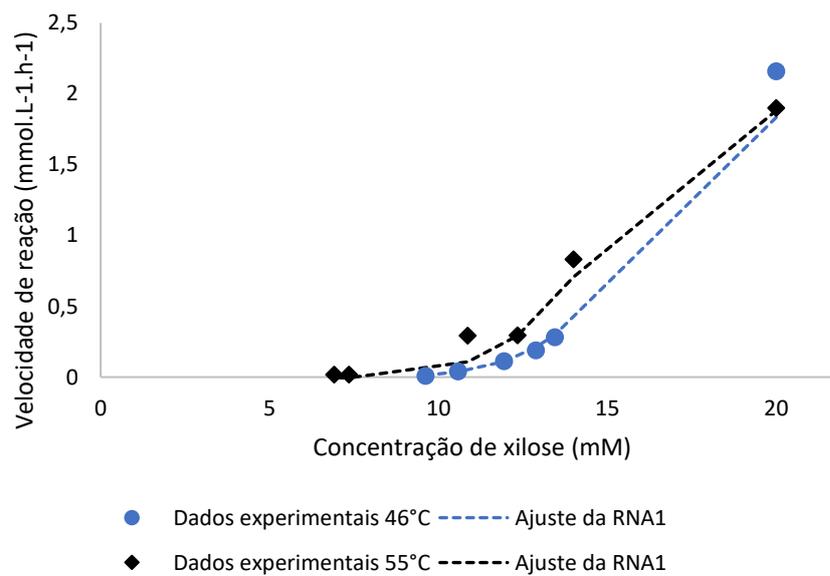
Tabela 7 - Valores dos pesos entre os neurônios da camada oculta e da camada de saída

Rede Neural	Neurônios da Camada Oculta					
	Bias	1	2	3	4	5
RNA-1	-0,3559	-0,2448	-0,2448	---	---	---
RNA-2	-0,9773	-1,0504	-1,0449	---	---	---
RNA-3	0,3490	-0,3523	0,8733	-0,1588	0,2815	-0,2286
RNA-4	0,4409	0,0193	-1,4660	---	---	---
RNA-5	-0,0372	0,9320	0,1130	---	---	---

Finalizadas as etapas de construção, treinamento e validação, os valores obtidos como saída das redes foram utilizados na elaboração de gráficos de cinética. A seguir, as Figuras 21-25 mostram gráficos da cinética enzimática indicando as

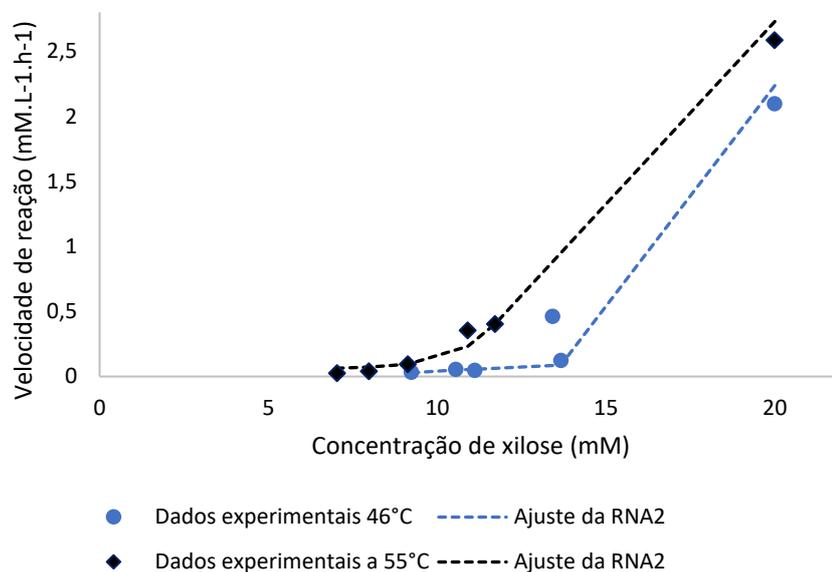
velocidades calculadas a partir dos dados experimentais e as velocidades calculadas pela modelagem das redes (linha pontilhada). Vale ressaltar que cada RNA foi construída a partir de dados de síntese enzimática em duas condições de temperatura, 46°C e 55°C, como destacam as imagens. O eixo das ordenadas dos gráficos apresentados representa o valor da velocidade da reação ($\text{mmol. L}^{-1}. \text{h}^{-1}$). O eixo das abscissas indica a concentração do açúcar cujo valor inicial nos ensaios experimentais era de 20 mM e, como já era esperado, neste ponto se tem o maior valor para velocidade de reação e tal comportamento foi reproduzido pelos ajustes.

Figura 21 - Modelagem cinética da síntese de oleato de xilose catalisada por CALB-IM-T2-350 em diferentes temperaturas (RNA-1)



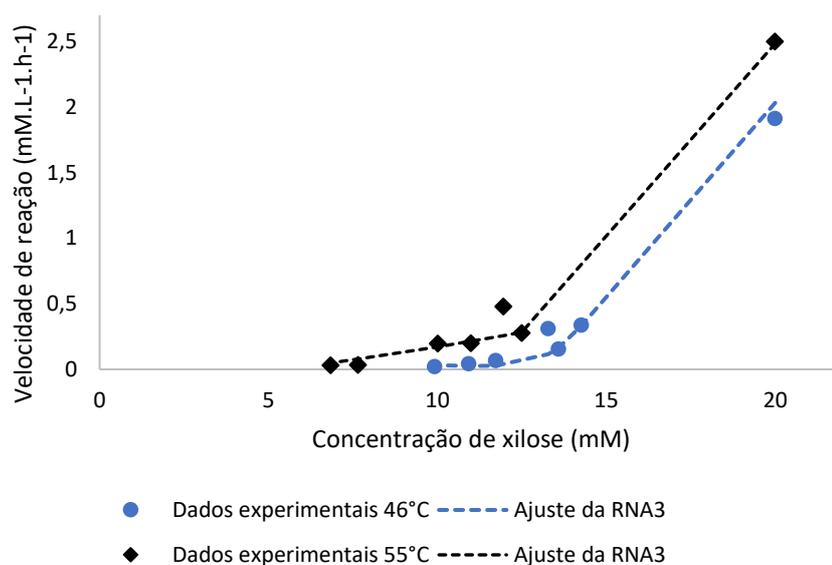
Fonte: Acervo pessoal

Figura 22 - Modelagem cinética da síntese de laurato de xilose catalisada por CALB-IM-T2-350 em diferentes temperaturas (RNA-2)



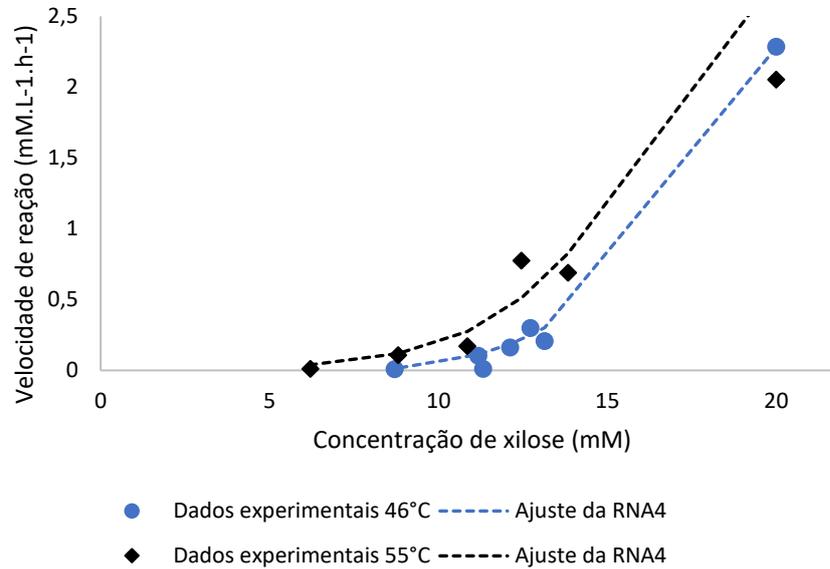
Fonte: Acervo pessoal

Figura 23 - Modelagem cinética da síntese de laurato de xilose catalisada por CALB-SMMP-OCTIL em diferentes temperaturas (RNA-3)



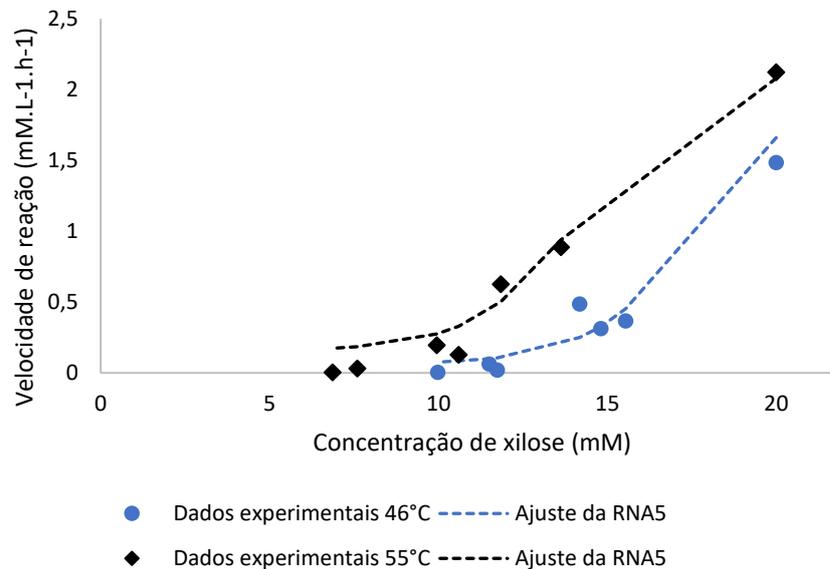
Fonte: Acervo pessoal

Figura 24 - Modelagem cinética da síntese de oleato de xilose catalisada por CALB-SMMP-OCTIL-GLU em diferentes temperaturas (RNA-4)



Fonte: Acervo pessoal

Figura 25 - Modelagem cinética da síntese de laurato de xilose catalisada por CALB-SMMP-OCTIL-GLU em diferentes temperaturas (RNA-5)



Fonte: Acervo pessoal

As Figuras 22, 23 e 25 são referentes aos ajustes de dados da esterificação de xilose com ácido láurico, formando laurato de xilose. Para os três diferentes

biocatalisadores avaliados se verifica um ajuste bastante consistente das RNAs aos dados experimentais fornecidos. Nesses casos também é notável a diferença no comportamento dos dados (experimentais e simulados) de acordo com a temperatura. As curvas referentes a 55°C apresentaram maiores valores de velocidade que as curvas referentes aos processos a 46°C, em todo o perfil. Indica-se, assim, a possibilidade em se obter o comportamento da síntese de laurato de xilose, dados de velocidade e concentração do açúcar, por meio da interpolação dos dados entre 46°C e 55°C, em cada um dos biocatalisadores e nas condições operacionais estudadas neste trabalho.

Os ajustes referentes à síntese de oleato de xilose estão apresentados nas Figuras 21 e 24. Nota-se que os modelos acompanharam o comportamento dos dados experimentais nas curvas em análise. A RNA-1 (Figura 21) teve um descolamento no ponto de maior concentração do açúcar no processo a 46°C, mas a curva de ajuste seguiu o comportamento esperado permanecendo abaixo da curva do processo a 55°C. De modo similar ocorreu no ajuste da RNA-4: a Figura 24 mostra o final da curva de 55°C descolada do ponto experimental, mas mantendo o comportamento esperado, permanecendo acima da curva do processo a 46°C.

Como um último esforço em modelagem neural, os dados utilizados nos ajustes das redes 1, 2, 4 e 5 foram agrupados de acordo com o tipo de biocatalisador. Foram elaboradas e treinadas duas redes, cujas características estão apresentadas na Tabela 8 a seguir.

Tabela 8 - Especificações das duas redes neurais construídas para os dados agrupados por tipo de biocatalisador

Rede	N° neurônios da camada oculta	Biocatalisador	Ácido graxo	T (°C)
RNA-6	5	CALB-IM-T2-350	Oleico	46
				55
			Láurico	46
				55
RNA-7	3	CALB-SMMP-OCTIL- GLU	Oleico	46
				55
			Láurico	46
				55

Na etapa de construção das redes, como uma de suas entradas, foram utilizados os índices 1 e 2 para indicar os ácidos oleico e láurico, respectivamente, para discriminar o tipo de ácido graxo referente a cada conjunto de dados.

Ao treinar as redes, foram obtidas as Figuras 26 e 27 referentes às análises de regressão. As figuras apresentam os valores R quadrático obtidos a partir da relação entre a variável de saída das redes e os alvos para as etapas de treinamento, validação, teste e um gráfico final que considera todos os dados para cada rede.

Figura 26 - Gráficos de regressão para dados de treinamento, validação e teste da RNA-6 empregada na previsão dos dados de síntese de ésteres de xilose com CALB-IM-T2-350

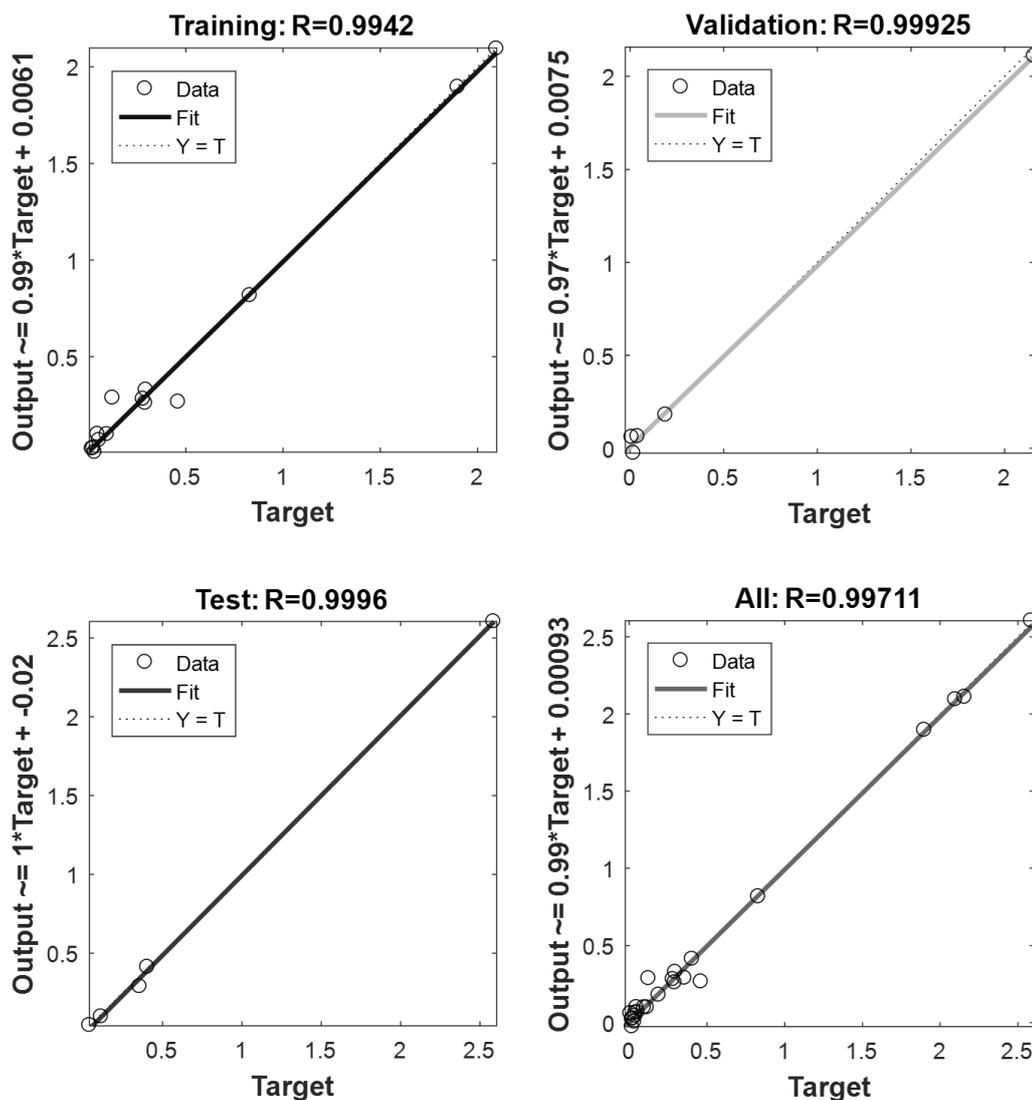
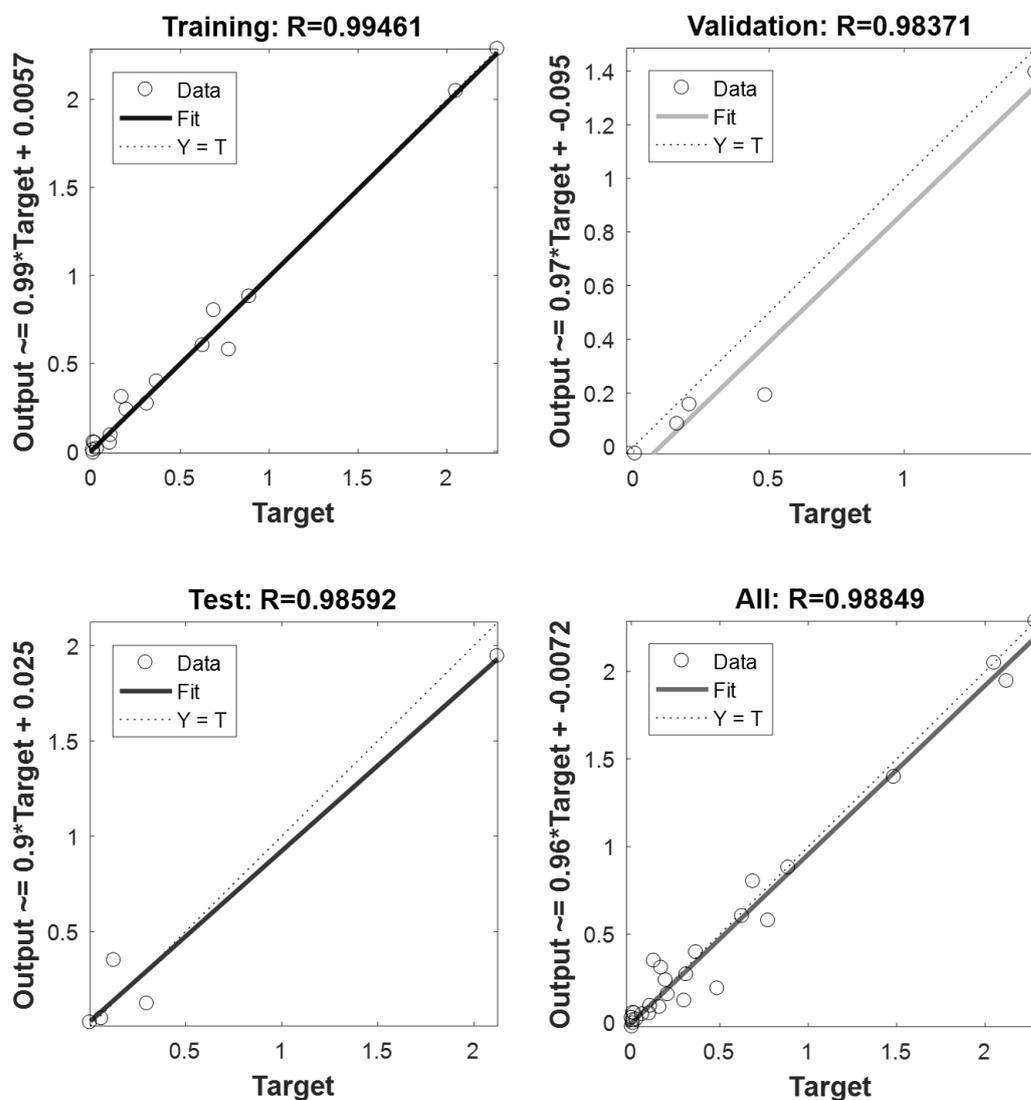


Figura 27 - Gráficos de regressão para dados de treinamento, validação e teste da RNA-7 empregada na previsão dos dados de síntese de ésteres de xilose com CALB-IM-SMMP-OCTIL-GLU



Fonte: Acervo pessoal

Observa-se que os R-quadráticos obtidos foram superiores a 0,98, o que sugere boa capacidade de previsão, mas com valores muito similares aos das redes apresentadas anteriormente, não podendo ser esse o único critério utilizado para definir a melhor combinação de dados para construção e treinamento das redes.

Os valores dos pesos entre as variáveis de entrada - tipo de ácido graxo (AG), temperatura (T) e concentração de xilose ([X]) - e os neurônios da camada oculta,

referentes às RNAs 6 e 7, estão indicados na Tabela 9. A Tabela 10 apresenta os valores dos pesos entre os neurônios da camada oculta e a camada de saída.

Tabela 9 - Valores dos pesos entre as variáveis da camada de entrada e os neurônios da camada oculta ao final do treinamento

Rede	Variável	0	1	2	3
Neural	Neurônio	Bias	AG	T	[X]
RNA-6	1	2,7086	-0,6900	-1,4313	2,2693
	2	-1,0959	2,1885	1,1882	1,0128
	3	-0,0483	-1,8220	-1,3696	-0,7718
	4	1,9436	1,1514	-0,2394	-3,6637
	5	2,6091	0,9288	-1,2843	1,5338
RNA-7	1	1,6781	0,0733	0,3566	-2,3361
	2	0,5717	2,1088	-3,4300	-2,8888
	3	3,6140	1,5409	-1,6906	2,3197

Tabela 10 - Valores dos pesos entre os neurônios da camada oculta e da camada de saída

Rede Neural	Neurônios da Camada Oculta					
	Bias	1	2	3	4	5
RNA-6	0,0454	0,3495	0,5391	0,2174	-0,8053	-0,2370
RNA-7	-0,3061	-0,6991	-0,4197	0,4302	---	---

Os gráficos de cinética elaborados após o treinamento final das redes para cada biocatalisador estão apresentados nas Figuras 28 e 29. Nas imagens estão indicados os pontos experimentais (velocidades) e os ajustes feitos pela modelagem das redes (linha pontilhada). Vale ressaltar que cada RNA nesta etapa do estudo e, portanto, cada gráfico, foi construída a partir de dados de síntese em duas temperaturas, 46°C e 55°C, e dois tipos de ácidos graxos, oleico e láurico.

Figura 28 - Modelagem cinética de sínteses de ésteres de xilose catalisadas por CALB-IM-T2-350 em diferentes temperaturas e ácidos graxos (RNA-6)

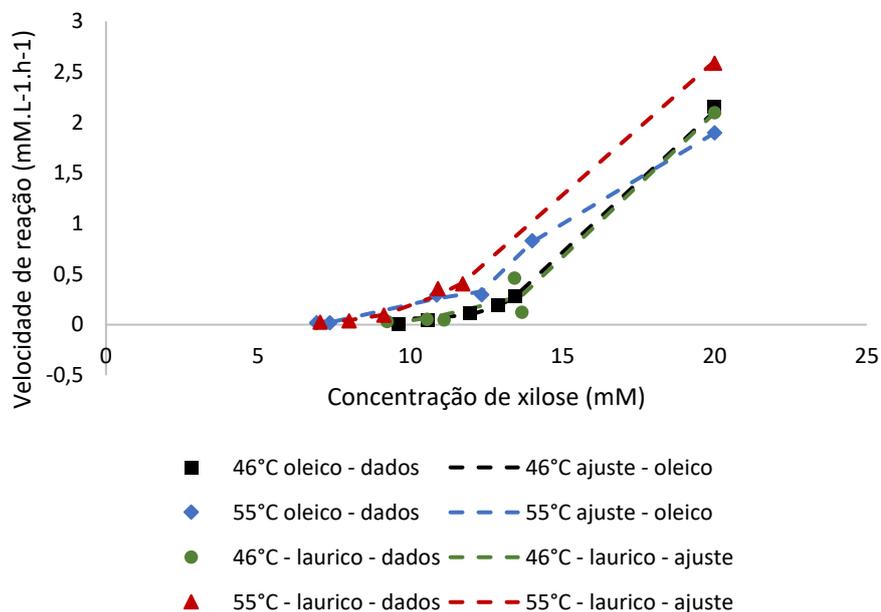
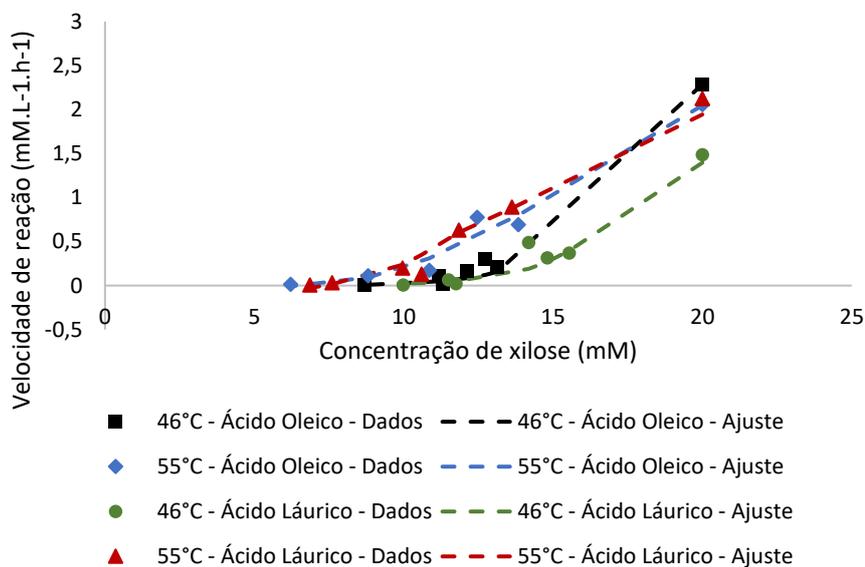


Figura 29 - Modelagem cinética de sínteses de ésteres de xilose catalisadas por CALB-IM-SMMP-OCTIL-GLU em diferentes temperaturas e ácidos graxos (RNA-7)



A modelagem por redes neurais realizada a partir da combinação dos dados por tipo de biocatalisador, CALB-IM-T2-350 e CALB-IM-SMMP-OCTIL-GLU, mostrou bom ajuste das RNA-6 e RNA-7 aos dados experimentais e resultou em uma melhor apresentação dos dados previstos, facilitando a comparação entre o comportamento

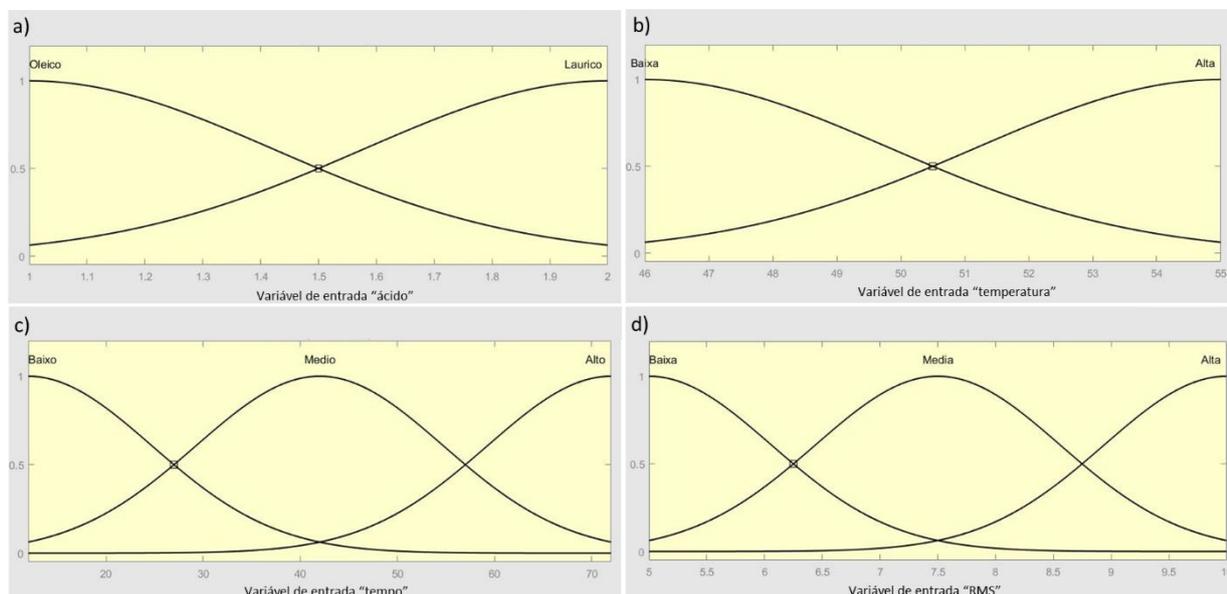
das curvas de acordo com a temperatura e/ou de acordo com o tipo de ácido. Na Figura 28, por exemplo, referente a reações catalisadas por CALB-IM-T2-350, verifica-se uma sobreposição das curvas de reação a 46°C para ambos os ácidos, indicando não haver influência do tipo de ácido graxo quando a reação corre nesta temperatura. Em geral, é possível notar maiores velocidades de reação para as reações a 55°C, inclusive atingindo os menores valores de concentração de xilose. Para o biocatalisador CALB-IM-SMMP-OCTIL-GLU, indicado na Figura 29, as curvas mostram que as reações que ocorrem a 55°C tiveram maiores velocidades de reação e que, nesta temperatura, não houve influência do tipo de ácido graxo.

Pode-se considerar as redes neurais artificiais como uma ferramenta útil no estudo de reações de esterificação de ácidos graxos com açúcares, com boa capacidade de previsão de dados. Especificamente aqui, neste trabalho, redes neurais como ferramenta para a modelagem cinética (das velocidades de reação). Por outro lado, no estudo de modelagem de RNAs com dados de esterificação catalisada por CALB (Novozym 435), de ácido palmítico com xilitol, Adnani *et al.* (2011) utilizaram a melhor arquitetura de rede definida (*feed forward* com duas camadas ocultas com 6 e 7 neurônios, respectivamente) para construir gráficos da produção do éster em função das condições operacionais (tempo, temperatura, carga enzimática, peneira molecular, volume de solvente e RMS). Dessa forma, Adnani et al. (2011) obtiveram a previsão das condições para uma alta conversão. No presente trabalho de Doutorado, por outro lado, em uma aplicação similar, com potencial na otimização das condições operacionais do processo de esterificação enzimática de xilose com ácidos graxos, foi feito uso da lógica *fuzzy* (cujos resultados são apresentados no tópico a seguir).

5.3 DESENVOLVIMENTO DE MODELAGEM EM SISTEMA DE INFERÊNCIA FUZZY

As Figuras 30 a, b, c e d correspondem aos ajustes das funções de pertinência de entrada realizados pelo ANFIS, para modelar o comportamento da conversão de xilose em função da temperatura, razão molar de substratos ácido: açúcar, tempo de reação e o tipo de ácido graxo. Vale ressaltar que as funções de pertinência de entrada foram iguais para os três modelos/biocatalisadores (CALB-IM-T2-350, CALB-SMMP-OCTIL e CALB-SMMP-OCTIL-GLU) devido às condições operacionais serem as mesmas.

Figura 30 - Resultados dos ajustes das funções de pertinência de entrada do sistema fuzzy realizado pelo ANFIS



Na Tabela 11, tem-se os valores dos parâmetros das funções de pertinência de entrada dos modelos ajustados pelo ANFIS.

Tabela 11 - Valores dos parâmetros das funções de pertinência de entrada do sistema nebuloso ajustados pelo ANFIS

Variável linguística	Valor linguístico	σ	c
AG	Oleico	0,4419	1,007
	Láurico	0,3685	2,022
T (°C)	Baixa	3,782	45,98
	Alta	3,804	55,01
t (h)	Baixo	12,72	11,98
	Médio	12,78	41,99
	Alto	12,72	72,01
RMS	Baixa	1,232	5,099
	Média	0,6619	7,688
	Alta	1,056	10

Fonte: Acervo pessoal

Para cada modelo, referente a cada tipo de biocatalizador, foram ajustadas 36 regras difusas definidas pelo ANFIS a partir das combinações possíveis entre os valores linguísticos das variáveis linguísticas de entrada. A diferença entre as regras ajustadas para cada modelo está nos valores dos parâmetros das funções lineares de saída. A seguir, as regras definidas pelo ANFIS neste estudo:

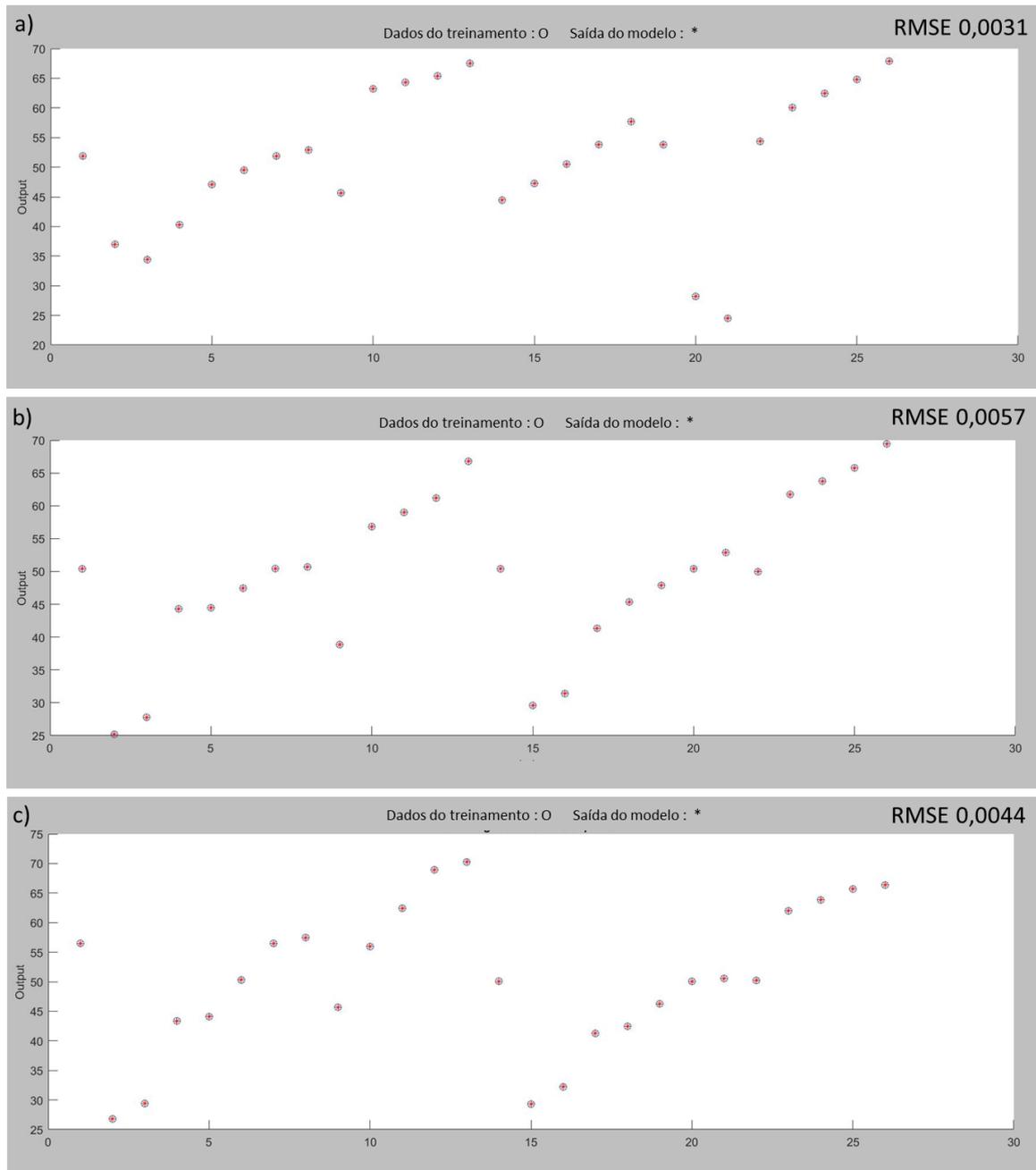
1. Se (AG é oleico) e (T é baixa) e (t é baixo) e (RMS é baixa) então (Conversão é f_1)
2. Se (AG é oleico) e (T é baixa) e (t é baixo) e (RMS é média) então (Conversão é f_2)
3. Se (AG é oleico) e (T é baixa) e (t é baixo) e (RMS é alta) então (Conversão é f_3)
4. Se (AG é oleico) e (T é baixa) e (t é médio) e (RMS é baixa) então (Conversão é f_4)
5. Se (AG é oleico) e (T é baixa) e (t é médio) e (RMS é média) então (Conversão é f_5)
6. Se (AG é oleico) e (T é baixa) e (t é médio) e (RMS é alta) então (Conversão é f_6)
7. Se (AG é oleico) e (T é baixa) e (t é alto) e (RMS é baixa) então (Conversão é f_7)
8. Se (AG é oleico) e (T é baixa) e (t é alto) e (RMS é média) então (Conversão é f_8)
9. Se (AG é oleico) e (T é baixa) e (t é alto) e (RMS é alta) então (Conversão é f_9)
10. Se (AG é oleico) e (T é alta) e (t é baixo) e (RMS é baixa) então (Conversão é f_{10})
11. Se (AG é oleico) e (T é alta) e (t é baixo) e (RMS é média) então (Conversão é f_{11})
12. Se (AG é oleico) e (T é alta) e (t é baixo) e (RMS é alta) então (Conversão é f_{12})
13. Se (AG é oleico) e (T é alta) e (t é médio) e (RMS é baixa) então (Conversão é f_{13})
14. Se (AG é oleico) e (T é alta) e (t é médio) e (RMS é média) então (Conversão é f_{14})
15. Se (AG é oleico) e (T é alta) e (t é médio) e (RMS é alta) então (Conversão é f_{15})
16. Se (AG é oleico) e (T é alta) e (t é alto) e (RMS é baixa) então (Conversão é f_{16})
17. Se (AG é oleico) e (T é alta) e (t é alto) e (RMS é média) então (Conversão é f_{17})
18. Se (AG é oleico) e (T é alta) e (t é alto) e (RMS é alta) então (Conversão é f_{18})
19. Se (AG é láurico) e (T é baixa) e (t é baixo) e (RMS é baixa) então (Conversão é f_{19})
20. Se (AG é láurico) e (T é baixa) e (t é baixo) e (RMS é média) então (Conversão é f_{20})
21. Se (AG é láurico) e (T é baixa) e (t é baixo) e (RMS é alta) então (Conversão é f_{21})
22. Se (AG é láurico) e (T é baixa) e (t é médio) e (RMS é baixa) então (Conversão é f_{22})
23. Se (AG é láurico) e (T é baixa) e (t é médio) e (RMS é média) então (Conversão é f_{23})
24. Se (AG é láurico) e (T é baixa) e (t é médio) e (RMS é alta) então (Conversão é f_{24})
25. Se (AG é láurico) e (T é baixa) e (t é alto) e (RMS é baixa) então (Conversão é f_{25})
26. Se (AG é láurico) e (T é baixa) e (t é alto) e (RMS é média) então (Conversão é f_{26})
27. Se (AG é láurico) e (T é baixa) e (t é alto) e (RMS é alta) então (Conversão é f_{27})
28. Se (AG é láurico) e (T é alta) e (t é baixo) e (RMS é baixa) então (Conversão é f_{28})
29. Se (AG é láurico) e (T é alta) e (t é baixo) e (RMS é média) então (Conversão é f_{29})
30. Se (AG é láurico) e (T é alta) e (t é baixo) e (RMS é alta) então (Conversão é f_{30})

31. Se (AG é láurico) e (T é alta) e (t é médio) e (RMS é baixa) então (Conversão é f_{31})
32. Se (AG é láurico) e (T é alta) e (t é médio) e (RMS é média) então (Conversão é f_{32})
33. Se (AG é láurico) e (T é alta) e (t é médio) e (RMS é alta) então (Conversão é f_{33})
34. Se (AG é láurico) e (T é alta) e (t é alto) e (RMS é baixa) então (Conversão é f_{34})
35. Se (AG é láurico) e (T é alta) e (t é alto) e (RMS é média) então (Conversão é f_{35})
36. Se (AG é láurico) e (T é alta) e (t é alto) e (RMS é alta) então (Conversão é f_{36})

No Apêndice A são apresentados os valores dos coeficientes das funções lineares de saída, de acordo com a Equação 8, para os três modelos FIS ajustados.

Os modelos treinados pelos ANFIS foram testados com o conjunto de dados experimentais logo após a etapa de treinamento. Foram obtidos valores de RMSE abaixo de 0,006 (um valor de zero indicaria um resultado “perfeito”). A Figura 31 mostra as distâncias entre os pontos previstos pelos modelos (em vermelho) e os respectivos alvos (em azul). Os resultados mostraram que as saídas dos modelos estavam muito próximas dos alvos (dados reais), indicando bons ajustes. A etapa de teste foi considerada como um indicativo do desempenho dos modelos treinados e que poderiam ser utilizados na previsão de dados.

Figura 31 - Resultado da etapa de teste comparando os dados alvos com os dados previstos pelos modelos para cada biocatalisador: CALB-IM-T2-350 (A); CALB-SMMP-OCTIL (B); CALB-SMMP-OCTIL-GLU (C)

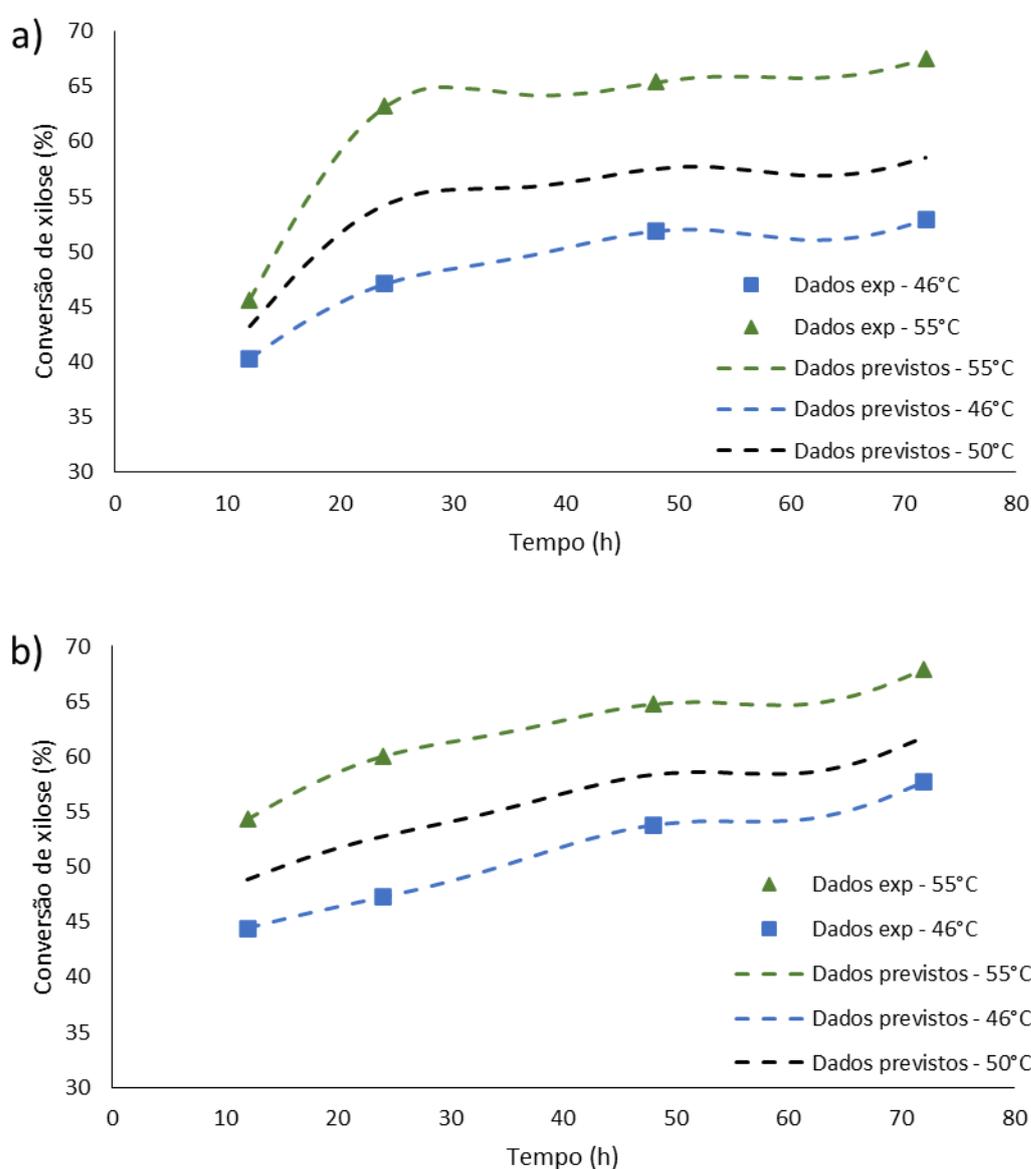


Fonte: Acervo pessoal.

A partir dos modelos nebulosos obtidos, foram construídos gráficos de conversão de xilose em função do tempo, fixando os parâmetros referentes ao tipo de ácido graxo e RMS de ácido: açúcar (em 1:0,2). As Figuras 32-34 foram elaboradas considerando pontos experimentais disponíveis nas duas temperaturas estudadas

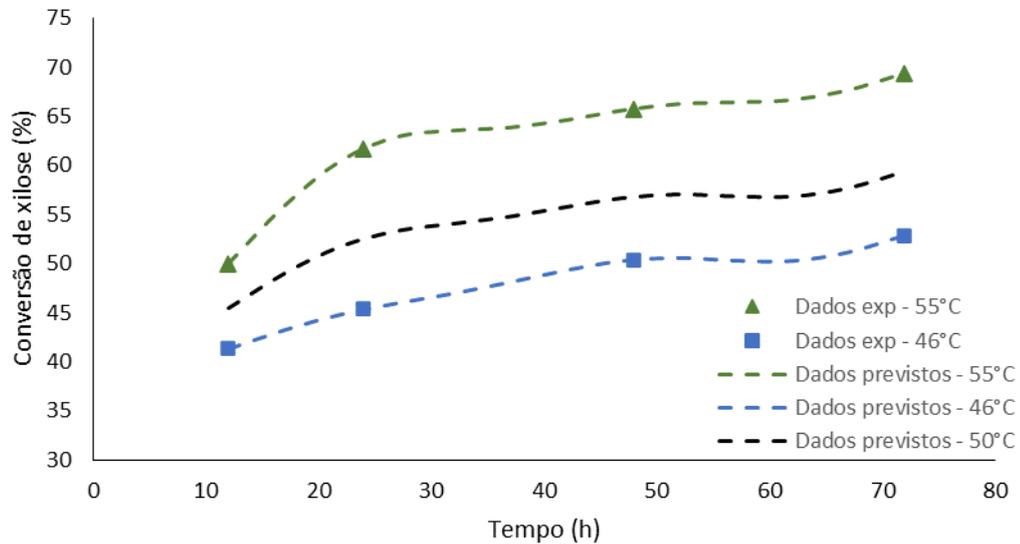
(46°C e 55°C) e dados previstos pelo modelo *fuzzy* nas temperaturas 46°C, 50°C e 55°C. Para a construção do gráfico com dados da modelagem referente ao biocatalisador CALB-SMMP-OCTIL foram utilizados apenas valores previstos com entrada (2) para tipo de ácido, referente ao ácido láurico.

Figura 32 - Modelagem nebulosa de síntese de ésteres de xilose com a) ácido oleico e b) ácido láurico, catalisadas por CALB-IM-T2-350 em diferentes temperaturas



Fonte: Acervo pessoal.

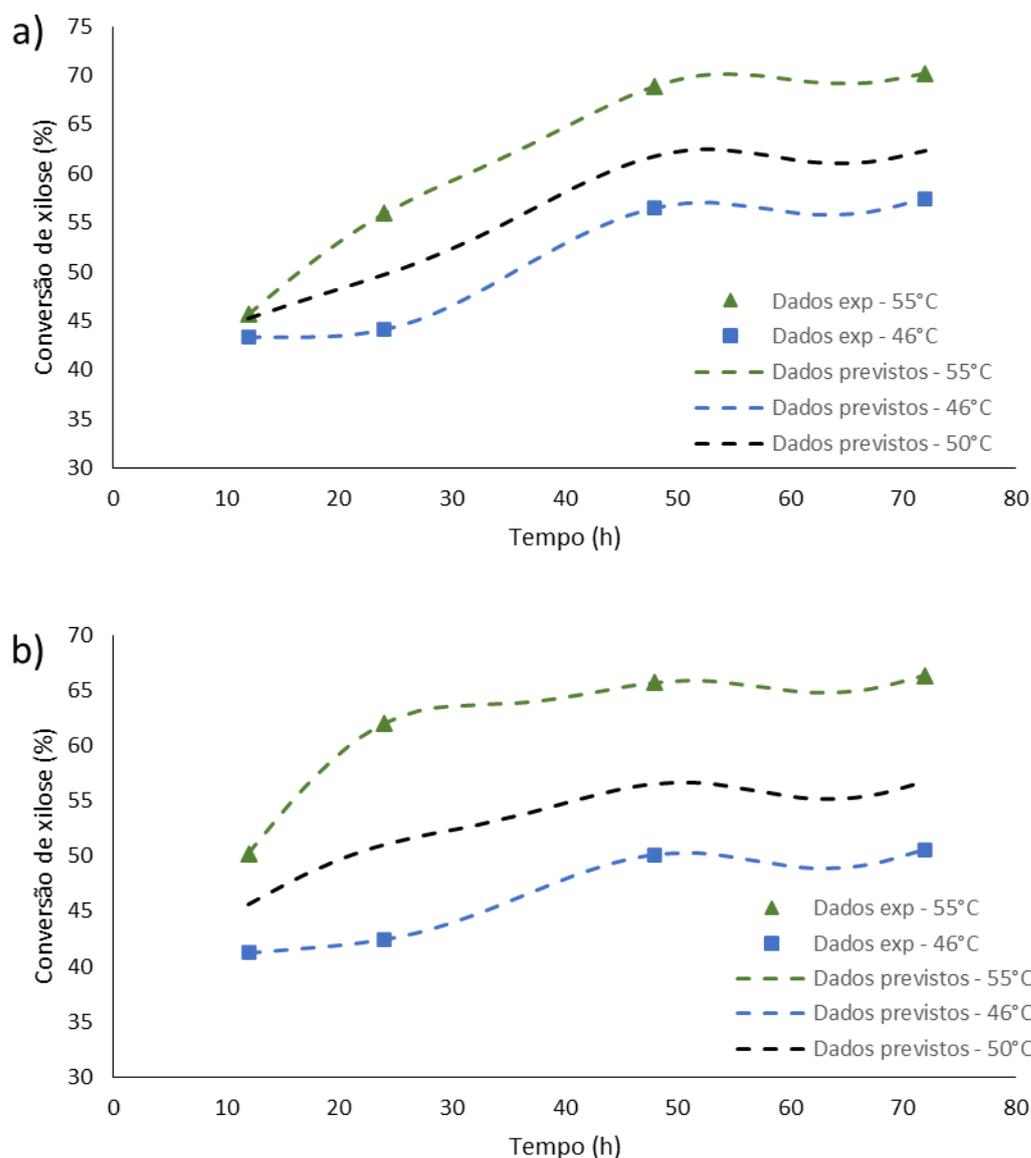
Figura 33 - Modelagem nebulosa de síntese de ésteres de xilose e ácido láurico catalisadas por CALB-SMMP-OCTIL em diferentes temperaturas



Fonte: Acervo pessoal.

Devido à baixa disponibilidade de dados, não foi possível construir gráficos da variável de saída (conversão) em função de alguma outra variável de entrada. Ainda assim, as imagens mostram que os comportamentos dos modelos treinados estiveram de acordo com os dados experimentais existentes nas duas temperaturas disponíveis e foram capazes de realizar a previsão de dados em uma temperatura de reação intermediária (50°C), demonstrando o potencial da modelagem *fuzzy* na previsão de dados para reações enzimáticas de síntese de éster de ácidos graxos com açúcares.

Figura 34 - Modelagem nebulosa de síntese de ésteres de xilose com a) ácido oleico e b) ácido láurico, catalisadas por CALB-SMMP-OCTIL-GLU em diferentes temperaturas

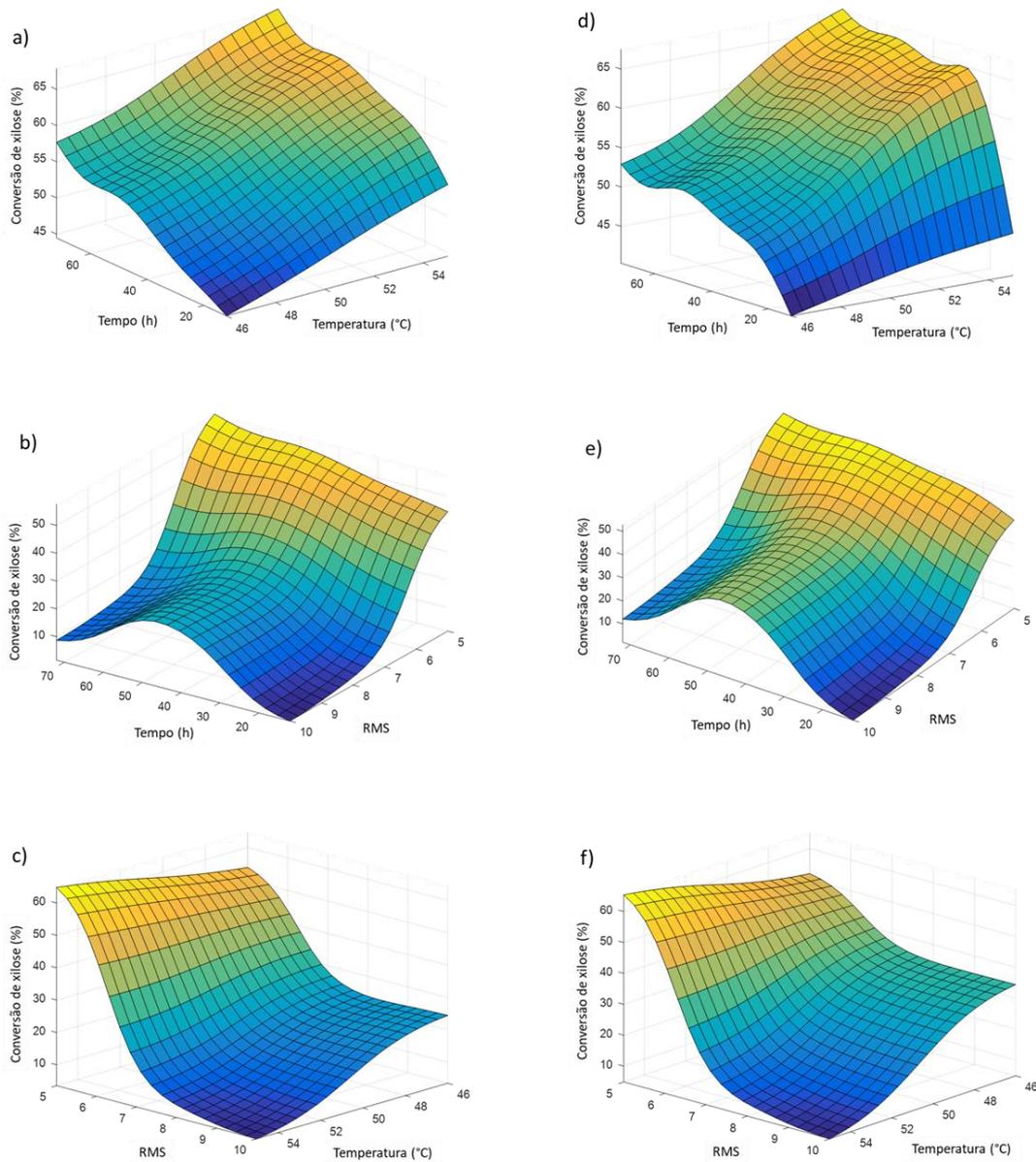


Fonte: Acervo pessoal.

Visando demonstrar também o alto potencial da modelagem nebulosa em estudos de otimização das condições operacionais (até mesmo como uma abordagem alternativa aos modelos de regressão em planejamento experimental), foram construídos gráficos de superfície de resposta a partir de combinações entre as variáveis de entrada. As Figuras 35, 36 e 37 apresentam as superfícies de resposta

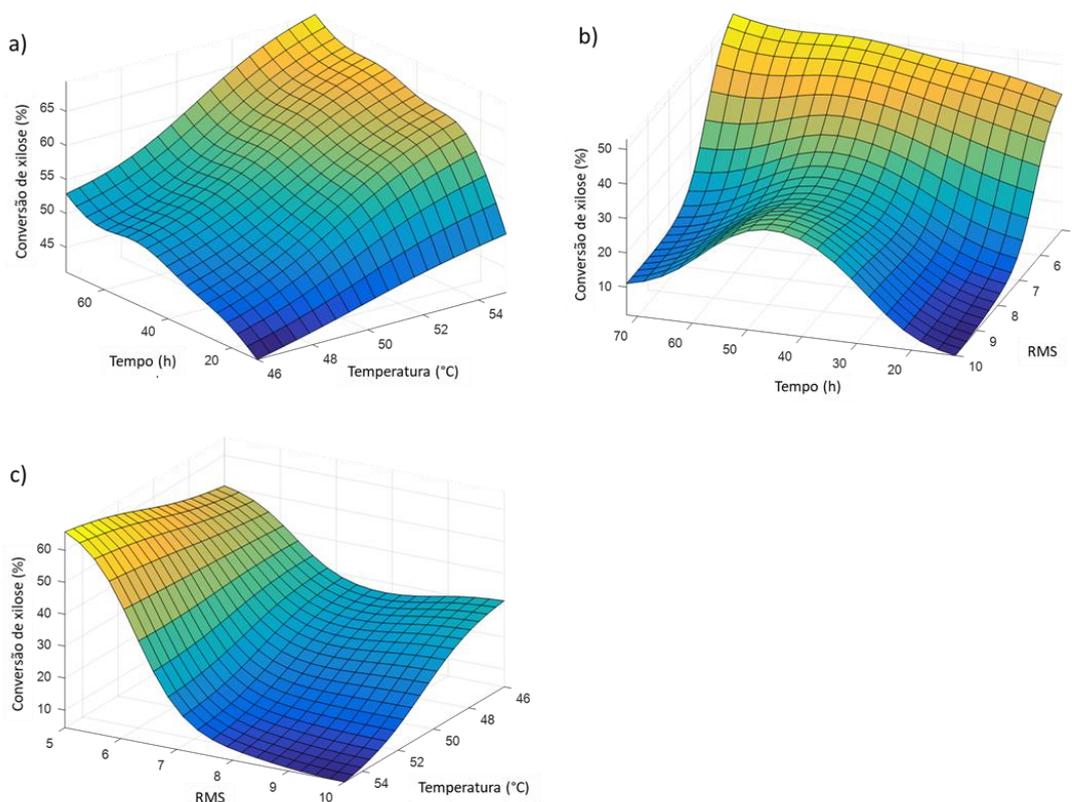
elaboradas pelo ANFIS a partir dos três modelos nebulosos em estudo, referentes aos três tipos de biocatalisadores.

Figura 35 - Superfícies desenvolvidas pelo modelo nebuloso referente aos dados de esterificação de xilose com ácido oleico (a, b, c) e ácido láurico (d, e, f), para CALB-IM-T2-350



Fonte: Acervo pessoal.

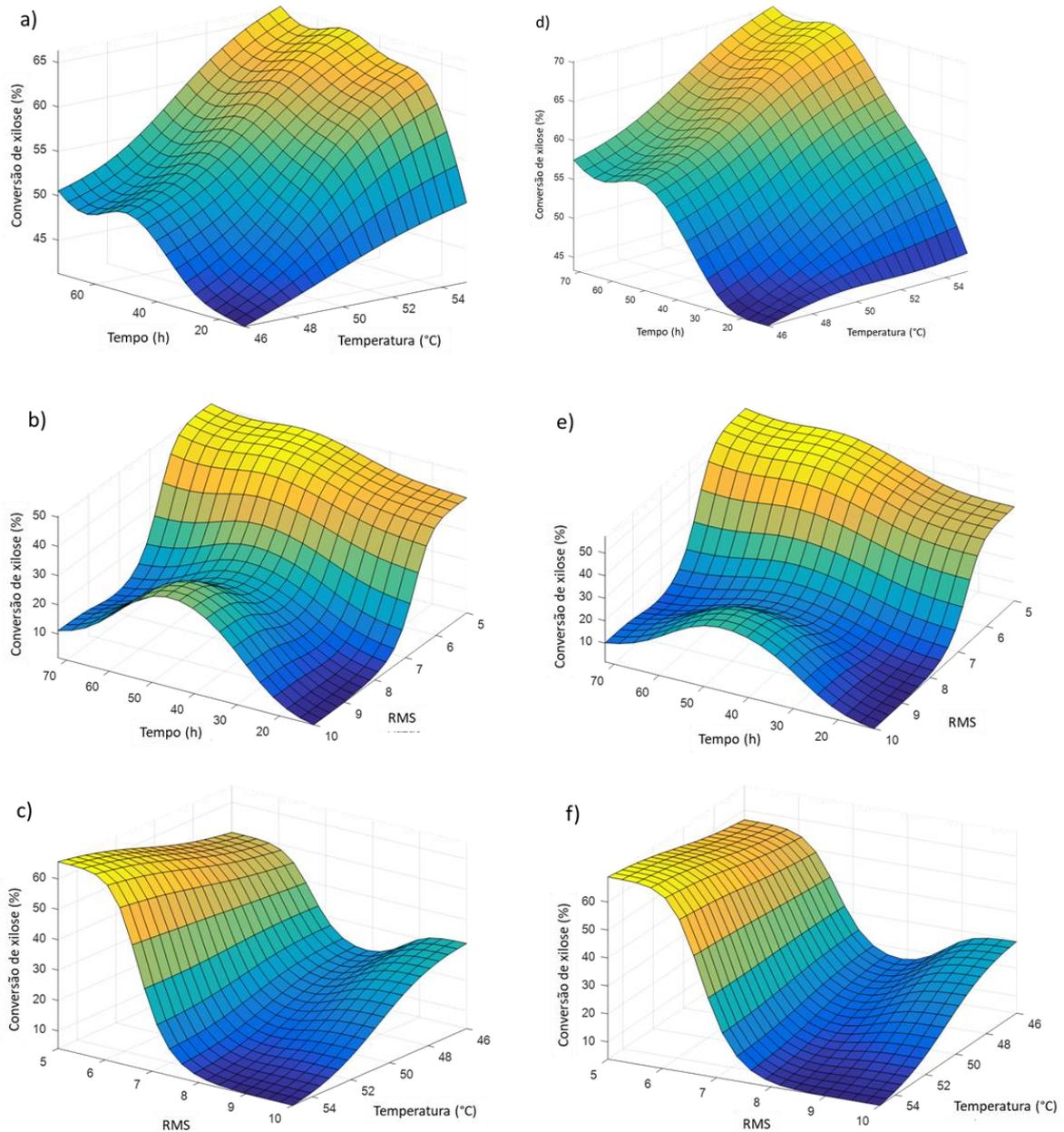
Figura 36 - Superfícies desenvolvidas pelo modelo nebuloso referente aos dados de esterificação de xilose com ácido láurico, para CALB-SMMP-OCTIL



Fonte: Acervo pessoal.

O desenvolvimento das superfícies de resposta para os modelos nebulosos construídos foi inspirado no estudo de Chaibakhsh; Chaibakhsh; Rahman, (2011), que realizaram a modelagem *fuzzy* com dados de reação de síntese de éster de ácido graxo com álcool, finalizando o estudo com uma etapa de otimização paramétrica e apresentação dos resultados por gráficos de superfícies *fuzzy*. Os autores validaram o resultado da otimização com a realização de um experimento que mostrou a alta concordância entre os dados previstos e reais, sendo que o erro obtido foi de cerca de 2,2%.

Figura 37 - Superfícies desenvolvidas pelo modelo nebuloso referente aos dados de esterificação de xilose com ácido oleico (a, b, c) e ácido láurico (d, e, f), para CALB-SMMP-OCTIL-GLU



Fonte: Acervo pessoal.

No presente trabalho, foi feita uma análise similar, com o diferencial de se tratar de dados da esterificação de ácidos graxos com açúcar. Apesar da não disponibilidade de dados para uma varredura completa das condições operacionais das reações aqui estudadas, é possível notar uma semelhança nos resultados apresentados pelas superfícies de resposta com os resultados definidos por Lima *et*

al. (2016). Para as condições referentes aos três biocatalisadores avaliados e nas duas condições de tipo de ácido graxo, nota-se que os maiores valores de conversão de xilose são atingidos a partir das 45h de reação, em altas temperaturas (55°C) e na menor condição de RMS (1:0,2). Assim, as Figuras 35, 36 e 37 apontam a modelagem nebulosa como uma abordagem que pode ser adequadamente empregada para estimar as condições ideais em processos de sínteses enzimáticas de biossurfactantes.

6. CONCLUSÕES

O modelo matemático semi-mecanístico com base no mecanismo de Ping-Pong Bi Bi sem inibição ajustou-se bem aos dados experimentais de esterificação de ácido carboxílico e carboidratos em sistemas orgânicos. O modelo também foi validado para um sistema de reação sob condições experimentais semelhantes, mas com uma carga de enzima diferente. O modelo obtido mostrou uma boa capacidade de predição. Na modelagem empírica, usando dados experimentais e sem ser necessário buscar demais informações sobre os princípios da reação, as redes neurais foram capazes de prever o comportamento do processo de esterificação de xilose em sínteses de biossurfactantes com uso de três diferentes biocatalisadores. Ao agrupar os dados, em relação ao tipo de biocatalisador, obteve-se um maior número de dados para treinamento e validação da rede, o que se mostrou favorável ao desempenho das duas RNAs construídas nesta fase do trabalho, apresentando valores de R-quadráticos superiores a 0,98. Em uma última etapa, foram construídos modelos nebulosos com capacidade em realizar a previsão dos dados de reação nas condições estudadas bem como em condições intermediárias de temperatura. Os modelos apresentaram valores de RMSE abaixo de 0,006, com grande proximidade entre as saídas dos modelos e as saídas desejadas. Em acréscimo, o ANFIS mostrou o potencial da ferramenta para varredura das condições experimentais como uma abordagem alternativa aos modelos de regressão utilizados em etapas de planejamento experimental e otimização.

Embora a produção de ácidos graxos de açúcares catalisadas por lipases ser amplamente relatada na literatura, poucos trabalhos têm explorado a modelagem da esterificação entre os ácidos carboxílicos e os carboidratos. Assim, este trabalho acrescenta conhecimentos ao assunto, estudando diferentes abordagens de modelagem matemática aplicadas à produção enzimática de alguns biossurfactantes.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A modelagem matemática semi-mecanística das reações enzimáticas de esterificação, conforme apresentada na primeira etapa deste trabalho, pode ser uma ferramenta muito útil para a simulação e, também, análise da viabilidade econômica dos processos. O processo de hidroesterificação, por exemplo, considera a hidrólise de monoacilgliceróis (MAG), diacilgliceróis (DAG) e triacilgliceróis (TAG) de destilado da desodorização do óleo de soja por ação de lipase solúvel seguido por esterificação de ácidos graxos livres (AGL, como oleico e láurico) com açúcares (como frutose e lactose), usando enzimas imobilizadas (como a CALB e a PFL), e separação/purificação dos produtos. Muitas vezes, em estudos de viabilidade econômica, utilizam-se modelos estequiométricos simples (como em vários estudos que estão sendo feitos no grupo de pesquisa LaDABio – UFSCar). Por outro lado, modelos do tipo Ping Pong Bi Bi podem ser incorporados nestes estudos de análise econômica, no sentido de aprimorar a modelagem do processo em análise.

No caso da aplicação de redes neurais artificiais para previsão do processo de esterificação de ácidos oleico e láurico com xilose, pode-se acoplar as redes neurais treinadas a balanços de massa de reator(es), em modelo híbrido, para inferir sobre as concentrações do reagente ao longo do tempo. Neste caso, o método clássico de Runge Kutta pode ser usado para integração das equações diferenciais dos balanços materiais. Computacionalmente, deve-se construir um algoritmo incorporando balanços materiais, velocidades de reações neurais e integração numérica passo a passo segundo o método de Runge Kutta.

No caso da aplicação da lógica nebulosa para modelagem e otimização da conversão da esterificação de ácidos graxos com açúcares (xilose) em função de parâmetros operacionais de processo (tempo, temperatura, razão molar de substratos e tipo de ácido), pode-se considerar ainda um estudo complementar ao que foi aqui apresentado, embasado num novo conjunto de dados experimentais provenientes de uma análise clássica de planejamento experimental, ajuste de modelos de regressão e análise de superfícies de resposta, visando à comparação entre as previsões de condições operacionais ótimas fornecidas pelos modelos *fuzzy* com a metodologia clássica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADNANI, Atena *et al.* Artificial neural network analysis of lipase-catalyzed synthesis of sugar alcohol ester. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 1, p. 42–48, 2011.

AN, Dong *et al.* Synthesis, surface properties of glucosyl esters from renewable materials for use as biosurfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 577, n. May, p. 257–264, 2019.

ANTWI, Philip *et al.* Feedforward neural network model estimating pollutant removal process within mesophilic upflow anaerobic sludge blanket bioreactor treating industrial starch processing wastewater. **Bioresource Technology**, v. 257, n. February, p. 102–112, 2018.

BROEK, Lambertus A. M. van den; BOERIU, Carmen G. Enzymatic synthesis of oligo- and polysaccharide fatty acid esters. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 1, p. 65–72, 2013.

BULSARI, A. Some analytical solutions to the general approximation problem for feedforward neural networks. **Neural Networks**, v. 6, n. 7, p. 991–996, 1993.

CAJAL, Yolanda *et al.* Effect of the lipid interface on the catalytic activity and spectroscopic properties of a fungal lipase. **Biochimie**, v. 82, n. 11, p. 1053–1061, 2000.

CAMPOS, J. M.; STAMFORD, T. L. M.; SARUBBO, L. A. Characterization and application of a biosurfactant isolated from *Candida utilis* in salad dressings. **Biodegradation**, v. 30, n. 4, p. 313–324, 2019.

CHAIBAKHSH, A.; CHAIBAKHSH, N.; RAHMAN, M. B. Abdul. Application of Fuzzy Modeling and Optimization in Enzymatic Esterification Process. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, v. 2, n. 6, p. 408–415, 2011.

COLLA, Luciane Maria *et al.* Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocesses. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 101, n. 21, p. 8308–8314, 2010. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.086>

COSTA, Siddhartha Georges Valadares Almeida De Oliveira; NITSCHKE, Márcia; CONTIERO, Jonas. Produção de biotensoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 34–38, 2008.

DANDEKAR, P. P.; PATRAVALE, V. B. Enzymatic synthesis of fructose ester from Mango Kernel Fat. **Indian Journal of Chemical Technology**, v. 16, n. 4, p. 317–

321, 2009.

DANG, Hung T.; OBIRI, Oriana; HAYES, Douglas G. Feed batch addition of saccharide during saccharide-fatty acid esterification catalyzed by immobilized lipase: Time course, water activity, and kinetic model. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 7, p. 487, 2005.

DE LIMA, Lionete Nunes *et al.* Mono- and heterofunctionalized silica magnetic microparticles (SMMPs) as new carriers for immobilization of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. S491–S499, 2016.

DE LIMA, Lionete Nunes *et al.* Performance of different immobilized lipases in the syntheses of short- and long-chain carboxylic acid esters by esterification reactions in organic media. **Molecules**, v. 23, n. 4, 2018.

DRAKONTIS, Constantina Eleni; AMIN, Samiul. Design o sustainable lip gloss formulation with biosurfactants and silica particles. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 42, p. 573–580, 2020.

DUMAS, Marc; BONTE, Frédéric. (12) **United States Patent**. US 6,495,147 B1. Concessão: 2002.

DUTTA, RAJIV. **Fundamentals of Biochemical Engineering**. v. 2; 1 ed. India: Ane Books India, 2008.

ENAYATI, Mojtaba *et al.* Synthesis and characterization of lactose fatty acid ester biosurfactants using free and immobilized lipases in organic solvents. **Food Chemistry**, v. 266, n. February, p. 508–513, 2018.

FACELI, K.; LORENA, A. C.; GAMA, J.; CARVALHO, A. C. P. L. F. Métodos baseados em otimização. In: **Inteligência Artificial: Uma abordagem de aprendizado de máquina**. 1 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2011, p. 107-121.

GLOBAL MARKET INSIGHTS. Biosurfactants Market Trends 2020-2026/ Growth Projections. 2020. Disponível em: <https://www.gminsights.com/industryanalysis/biosurfactants-market-report>

GOMIDE, Fernando; GUDWIN, Ricardo. Modelagem, Controle, Sistemas e Lógica Fuzzy. **SBA Controle & Automação**, v. 4, n. 3, p. 97–115, 1994.

GUMEL, A. M. *et al.* Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 2079–2090, 2011.

HASHMI, Asma; SALEEM, Muhammad. Diagnosis Blood Test for Liver Disease using Fuzzy Logic. **International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR)(2015)**, v. 20, n. 1, p. 151–183, 2015.

- HAYKIN, S. **Redes Neurais: Princípios e Prática**. 2 ed., Porto Alegre: Bookman, 2007.
- HERNANDEZ, Karel; GARCIA-GALAN, Cristina; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Simple and efficient immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene-divinylbenzene beads. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 1, p. 72–78, 2011.
- JAEGER, Karl Erich; REETZ, Manfred T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396–403, 1998.
- KARIM, M. N.; RIVERA, S. L. Comparison of feed-forward and recurrent neural networks for bioprocess state estimation. **Computers and Chemical Engineering**, v. 16, p. S369–S377, 1992.
- KAZLAUSKAS, ROMAS J. Elucidating structure-mechanism relationships in lipases: Prospects for predicting and engineering catalytic properties. **Trends in Biotechnology**, v. 12, n. 11, p. 464–472, 1994.
- KENNEDY, John F. *et al.* Enzyme-catalyzed regioselective synthesis of sugar esters and related compounds. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 81, n. October, p. 866–876, 2006.
- KHAN, Nishat R.; RATHOD, Virendra K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1793–1806, 2015.
- LEE, Seung Min; SANDHU, Guneev; WALSH, Marie K. Growth inhibitory properties of lactose fatty acid esters. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, n. 7, p. 1483–1488, 2017.
- LI, Lu *et al.* Efficient mono-acylation of fructose by lipase-catalyzed esterification in ionic liquid co-solvents. **Carbohydrate Research**, v. 416, p. 51–58, 2015.
- LI, Xuan *et al.* Fatty acid ester surfactants derived from raffinose: Synthesis, characterization and structure-property profiles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 556, p. 616–627, 2019.
- LINKO, Susan; LUOPA, J.; ZHU, Y. H. Neural networks as “software sensors” in enzyme production. **Journal of Biotechnology**, v. 52, n. 3, p. 257–266, 1997.
- LIU, Guansheng *et al.* Advances in applications of rhamnolipids biosurfactant in environmental remediation: A review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, n. 4, p. 796–814, 2018.
- MARATHE, Sandesh J.; SHAH, Nirali N.; SINGHAL, Rekha S. Enzymatic synthesis

- of fatty acid esters of trehalose: Process optimization, characterization of the esters and evaluation of their bioactivities. **Bioorganic Chemistry**, v. 94, p. 103460, 2020.
- MARTINELLE, Mats; HOLMQUIST, Mats; HULT, Karl. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1258, n. 3, p. 272–276, 1995.
- MATHWORKS. **Neural Networks Toolbox User's Guide**. Version 4 ed. The MathWorks, 2002. *E-book*.
- MATHWORKS. **Fuzzy Logic Toolbox User's Guide**. Natick, p. 367, 2016.
- MUSTAFA, Ahmad; KARMALI, Amin; ABDELMOEZ, Wael. Optimisation and economic assessment of lipase-catalysed production of monoesters using *Rhizomucor miehei* lipase in a solvent-free system. **Journal of Cleaner Production**, v. 137, p. 953–964, 2016.
- NELLES, Oliver. **Nonlinear System Identification**. Berlin: Springer, 2001.
- NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- NETA, Nair do Amaral Sampaio *et al.* Enzymatic synthesis of sugar esters and their potential as surface-active stabilizers of coconut milk emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 324–331, 2012.
- NGUYEN, P. C. *et al.* Enzymatic synthesis and characterization of maltoheptaose-based sugar esters. **Carbohydrate Polymers**, v. 218, n. January, p. 126–135, 2019.
- NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O. Biosurfactants in food industry. **Trends in Food Science and Technology**, [S. l.], v. 18, n. 5, p. 252–259, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.002>
- NITSCHKE, Marcia; PASTORE, Gláucia Maria. Biosurfactantes: Propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772–776, 2002.
- NITSCHKE, Marcia; SILVA, Sumária Sousa e. Recent food applications of microbial surfactants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 4, p. 631–638, 2018.
- NUCCI, Edson R. *et al.* Comparing the performance of multilayer perceptrons networks and neuro-fuzzy systems for on-line inference of *Bacillus megaterium* cellular concentrations. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 30, n. 6, p. 429–438, 2007.
- OTERO, Cristina *et al.* Emulsifiers from solid and liquid polyols: different strategies

for obtaining optimum conversions and selectivities. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 11, n. 4–6, p. 883–892, 2001.

PACWA-PŁOCINICZAK, Magdalena *et al.* Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 1, p. 633–654, 2011.

PAIVA, Ana L. *et al.* Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme Microb Technol**, v. 27, n. 3–5, p. 187–204, 2000.

PERINELLI, D. R. *et al.* Lactose oleate as new biocompatible surfactant for pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 124, n. December 2017, p. 55–62, 2018.

POLGÁR, L.; HALÁSZ, P. Current problems in mechanistic studies of serine and cysteine proteinases. **The Biochemical journal**, v. 207, n. 1, p. 1–10, 1982.

REIS, P. *et al.* Lipases at interfaces: Unique interfacial properties as globular proteins. **Langmuir**, v. 24, n. 13, p. 6812–6819, 2008.

REIS, P. *et al.* Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 147–148, n. C, p. 237–250, 2009.

REN, Kangzi; LAMSAL, Buddhi P. Synthesis of some glucose-fatty acid esters by lipase from *Candida antarctica* and their emulsion functions. **Food Chemistry**, v. 214, p. 556–563, 2017.

RIBEIRO, Beatriz Galdino *et al.* Biosurfactant produced by *Candida utilis* UFPEDA1009 with potential application in cookie formulation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 46, p. 14–21, 2020.

RIBEIRO, Beatriz Galdino; GUERRA, Jenyffer M. Campo.; SARUBBO, Leonie Asfora. Potential Food Application of a Biosurfactant Produced by *Saccharomyces cerevisiae* URM 6670. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. May, p. 1–13, 2020.

RUSSEL, J. B. **Química Geral**. São Paulo: Makron Books, 1994. v. 2

SACHDEV, Dhara P.; CAMEOTRA, Swaranjit S. Biosurfactants in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 1005–1016, 2013.

SAHARAN, Baljeet Singh; SAHU, R. K.; SHARMA, Deepansh. A Review on Biosurfactants : Fermentation , Applications , Current. **Genetic Engineering and Biotechnology Journal**, v. 2011, n. 29, p. 1–42, 2011.

SHULER, Michael L.; KARGI, Fikret. **Bioprocess Engineering Basic Concepts**. 2. ed. Prentice Hall PTR, 2001.

- SILVA, Ana Carolina Borges *et al.* An experimental and computational study of biosurfactant production from soy molasses. **Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis**, v. 128, n. 2, p. 847–865, 2019.
- SIMÕES, M. G.; SHAW, I. S. Controladores fuzzy baseados em regras. In: **Controle de modelagem fuzzy**. 2 ed., São Paulo: Blucher, 2007
- SOULTANI, Samia; ENGASSER, Jean Marc; GHOU, Mohamed. Effect of acyl donor chain length and sugar/acyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, [S. l.], v. 11, n. 4–6, p. 725–731, 2001.
- SOUZA, LÍVIA TEREZA DE ANDRADE SOUZA *et al.* Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**. 1. ed. p. 529–530.
- SOUZA, R; Aplicação da lógica nebulosa no controle de reatores bioquímicos para a produção de Cefalosporina C em regime de batelada alimentada. 1999. 143 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, 1999.
- STAUCH, Benjamin; FISHER, Stuart J.; CIANCI, Michele. Open and closed states of Candida antarctica lipase B : protonation and the mechanism of interfacial activation. **Journal of Lipid Research**, v. 56, p. 11, 2015.
- STERGIOU, Panagiota-Yiolanda *et al.* Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1846–1859, 2013.
- TANSCHKEIT, Ricardo. Sistemas Fuzzy. In: **Inteligência computacional aplicada a administração, economia e engenharia em Matlab**. São Paulo, Thomson Learning, 2007. p. 229–264.
- TANSCHKEIT, R.; GOMIDE, F.; TEIXEIRA, M. M. Modelagem e controle nebuloso. In: Aguirre, Luis Antonio. **Enciclopédia de automática: controle e automação**, vol. 3. 1 ed. São Paulo: Blucher, 2007. p. 284 - 325
- THANGARAJ, Baskar; SOLOMON, Pravin Raj. Immobilization of Lipases – A Review. Part I: Enzyme Immobilization. **ChemBioEng Reviews**, [S. l.], v. 6, n. 5, p. 157–166, 2019.
- TORRES, Alice de Carvalho Lima *et al.* Mathematical modeling of enzymatic syntheses of biosurfactants catalyzed by immobilized lipases. **Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis**, v. 130, n. 2, p. 699–712, 2020.
- UPPENBERG, Jonas *et al.* The sequence, crystal structure determination and

refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**, v. 2, n. 4, p. 293–308, 1994.

VESCOVI, Vinicius; SANTOS, Jéssica Bravin Carmello; TARDIOLI, Paulo Waldir. Porcine pancreatic lipase hydrophobically adsorbed on octyl-silica: A robust biocatalyst for syntheses of xylose fatty acid esters. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 35, n. 4, p. 298–305, 2017.

YAN, Y. *et al.* Procedure for selective esterifications of polyols. German patent DE 19924221 A1. **Biotechnol. Letters**, v. 21, p. 1051–1054, 2001.

ZADEH, Lotfi A. Outline of a New Approach to the Analysis of Complex Systems and Decision Processes. **IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics**, v. SMC-3, n. 1, p. 28–44, 1973.

Z Aidan, Uswatun Hasanah *et al.* Kinetic Behaviour of Free Lipase and Mica-Based Immobilized Lipase Catalyzing the Synthesis of Sugar Esters. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 75, n. 8, p. 1446–1450, 2011.

APÊNDICE

A. Valores dos coeficientes das funções lineares de saída do sistema de inferência nebuloso ajustado pelo ANFIS

Tabela 12 - Valores dos coeficientes das funções lineares de saída do FIS referente ao biocatalisador CALB-IM-T2-350 ajustados pelo ANFIS

Função	a	b	c	d	e
f ₁	0,0167	0,7134	0,7701	0,0773	0,0154
f ₂	0,0012	0,0528	0,0567	0,0061	0,0011
f ₃	0,0002	0,0091	0,0095	0,0020	0,0002
f ₄	0,0153	0,6641	0,4759	0,0745	0,0143
f ₅	0,0099	0,4408	0,4464	0,0672	0,0096
f ₆	0,0100	0,4409	0,4601	0,0954	0,0096
f ₇	0,0087	0,3856	0,4949	0,0417	0,0082
f ₈	0,0022	0,0998	0,1099	0,0145	0,0022
f ₉	0,0019	0,0836	0,0872	0,0181	0,0018
f ₁₀	0,0078	0,3621	2,2990	0,0337	0,0067
f ₁₁	0,0005	0,0232	0,1442	0,0022	0,0004
f ₁₂	0,0000	0,0006	0,0006	0,0001	0,0000
f ₁₃	0,0141	0,7146	0,6357	0,0659	0,0131
f ₁₄	0,0014	0,0696	0,0658	0,0080	0,0014
f ₁₅	0,0006	0,0276	0,0288	0,0060	0,0006
f ₁₆	0,0135	0,7086	0,4449	0,0648	0,0130
f ₁₇	0,0009	0,0490	0,0327	0,0048	0,0009
f ₁₈	0,0001	0,0052	0,0055	0,0011	0,0001
f ₁₉	0,0400	0,9481	0,2668	0,1021	0,0204
f ₂₀	0,0027	0,0642	0,0218	0,0072	0,0014
f ₂₁	0,0003	0,0062	0,0065	0,0013	0,0001
f ₂₂	0,0328	0,7813	0,4372	0,0858	0,0168
f ₂₃	0,0119	0,2876	0,2764	0,0429	0,0062
f ₂₄	0,0125	0,3007	0,3137	0,0651	0,0065
f ₂₅	0,0147	0,3531	0,6061	0,0382	0,0076
f ₂₆	0,0028	0,0673	0,0851	0,0095	0,0015
f ₂₇	0,0024	0,0570	0,0595	0,0123	0,0012
f ₂₈	0,0335	0,9188	0,6266	0,0845	0,0169
f ₂₉	0,0021	0,0577	0,0349	0,0053	0,0011
f ₃₀	0,0000	0,0004	0,0004	0,0001	0,0000
f ₃₁	0,0312	0,8698	0,4678	0,0800	0,0160
f ₃₂	0,0026	0,0693	0,0448	0,0073	0,0013
f ₃₃	0,0008	0,0188	0,0196	0,0041	0,0004
f ₃₄	0,0174	0,4947	0,6145	0,0454	0,0091
f ₃₅	0,0012	0,0338	0,0414	0,0033	0,0006
f ₃₆	0,0001	0,0036	0,0037	0,0008	0,0001

Tabela 13 - Valores dos coeficientes das funções lineares de saída do FIS referente ao biocatalisador CALB-SMMP-OCTIL ajustados pelo ANFIS

Função	a	b	c	d	e
f ₁	0,0242	1,0670	-0,1311	0,1158	0,0232
f ₂	0,0016	0,0710	-0,0037	0,0079	0,0015
f ₃	0,0002	0,0073	0,0076	0,0016	0,0002
f ₄	0,0174	0,7658	0,3952	0,0842	0,0165
f ₅	0,0060	0,2555	0,2413	0,0383	0,0055
f ₆	0,0082	0,3527	0,3680	0,0764	0,0077
f ₇	0,0059	0,2597	0,5496	0,0277	0,0055
f ₈	0,0013	0,0556	0,0754	0,0080	0,0012
f ₉	0,0016	0,0668	0,0697	0,0145	0,0015
f ₁₀	0,0048	0,2121	2,2840	0,0205	0,0041
f ₁₁	0,0003	0,0135	0,1430	0,0013	0,0003
f ₁₂	0,0000	0,0005	0,0005	0,0001	0,0000
f ₁₃	0,0119	0,5991	0,6461	0,0554	0,0111
f ₁₄	0,0011	0,0504	0,0593	0,0055	0,0010
f ₁₅	0,0005	0,0221	0,0230	0,0048	0,0005
f ₁₆	0,0139	0,7237	0,4267	0,0661	0,0132
f ₁₇	0,0009	0,0477	0,0292	0,0045	0,0007
f ₁₈	0,0001	0,0042	0,0044	0,0009	0,0001
f ₁₉	0,0338	0,8148	0,4596	0,0879	0,0176
f ₂₀	0,0024	0,0568	0,0349	0,0064	0,0012
f ₂₁	0,0004	0,0008	0,0087	0,0018	0,0002
f ₂₂	0,0297	0,7129	0,4089	0,0788	0,0153
f ₂₃	0,0140	0,3289	0,3223	0,0498	0,0071
f ₂₄	0,0170	0,4021	0,4196	0,0871	0,0087
f ₂₅	0,0143	0,3416	0,5330	0,0369	0,0073
f ₂₆	0,0032	0,0752	0,0854	0,0108	0,0016
f ₂₇	0,0032	0,0762	0,0795	0,0165	0,0017
f ₂₈	0,0243	0,6654	1,4180	0,0614	0,0123
f ₂₉	0,0015	0,0420	0,0890	0,0039	0,0008
f ₃₀	0,0000	0,0005	0,0006	0,0001	0,0000
f ₃₁	0,0291	0,8088	0,5583	0,0744	0,0149
f ₃₂	0,0026	0,0683	0,0534	0,0075	0,0013
f ₃₃	0,0011	0,0252	0,0262	0,0054	0,0005
f ₃₄	0,0216	0,6122	0,5545	0,0560	0,0112
f ₃₅	0,0015	0,0416	0,0382	0,0040	0,0008
f ₃₆	0,0002	0,0048	0,0005	0,0010	0,0001

Tabela 14 - Valores dos coeficientes das funções lineares de saída do FIS referente ao biocatalisador CALB-SMMP-OCTIL-GLU ajustados pelo ANFIS

Função	a	b	c	d	e
f ₁	0,0222	0,9584	-0,0462	0,1037	0,0207
f ₂	0,0001	0,0031	0,0029	0,0005	0,0001
f ₃	0,0002	0,0075	0,0078	0,0016	0,0002
f ₄	0,0146	0,6278	0,6187	0,0709	0,0135
f ₅	0,0034	0,1392	0,1452	0,0212	0,0030
f ₆	0,0087	0,3683	0,3843	0,0798	0,0080
f ₇	0,0081	0,3554	0,5496	0,0386	0,0076
f ₈	0,0006	0,0262	0,0274	0,0040	0,0006
f ₉	0,0016	0,0693	0,0723	0,0150	0,0015
f ₁₀	0,0116	0,0577	1,1220	0,0534	0,0107
f ₁₁	0,0000	0,0003	0,0005	0,0000	0,0000
f ₁₂	0,0000	0,0005	0,0005	0,0001	0,0000
f ₁₃	0,0114	0,0560	0,8360	0,0518	0,0103
f ₁₄	0,0002	0,0007	0,0009	0,0013	0,0002
f ₁₅	0,0005	0,0223	0,0233	0,0044	0,0005
f ₁₆	0,0126	0,6422	0,4721	0,0588	0,0118
f ₁₇	0,0000	0,0018	0,0018	0,0003	0,0000
f ₁₈	0,0001	0,0042	0,0044	0,0009	0,0001
f ₁₉	0,0371	0,8674	0,0620	0,0938	0,0187
f ₂₀	0,0002	0,0051	0,0056	0,0008	0,0001
f ₂₁	0,0004	0,0082	0,0086	0,0018	0,0002
f ₂₂	0,0272	0,6381	0,4494	0,0740	0,0137
f ₂₃	0,0103	0,2392	0,2496	0,0365	0,0052
f ₂₄	0,0175	0,4068	0,4244	0,0880	0,0084
f ₂₅	0,0121	0,2868	0,4875	0,0316	0,0061
f ₂₆	0,0019	0,0450	0,0471	0,0069	0,0010
f ₂₇	0,0033	0,0765	0,0799	0,0166	0,0017
f ₂₈	0,0220	0,6007	1,4590	0,0555	0,0111
f ₂₉	0,0000	0,0005	0,0007	0,0001	0,0000
f ₃₀	0,0000	0,0005	0,0005	0,0001	0,0000
f ₃₁	0,0274	0,7512	0,5368	0,0693	0,0138
f ₃₂	0,0006	0,0147	0,0153	0,0023	0,0003
f ₃₃	0,0011	0,0247	0,0258	0,0053	0,0005
f ₃₄	0,0206	0,5687	0,4780	0,0520	0,0104
f ₃₅	0,0001	0,0029	0,0030	0,0004	0,0001
f ₃₆	0,0002	0,0046	0,0048	0,0010	0,0001